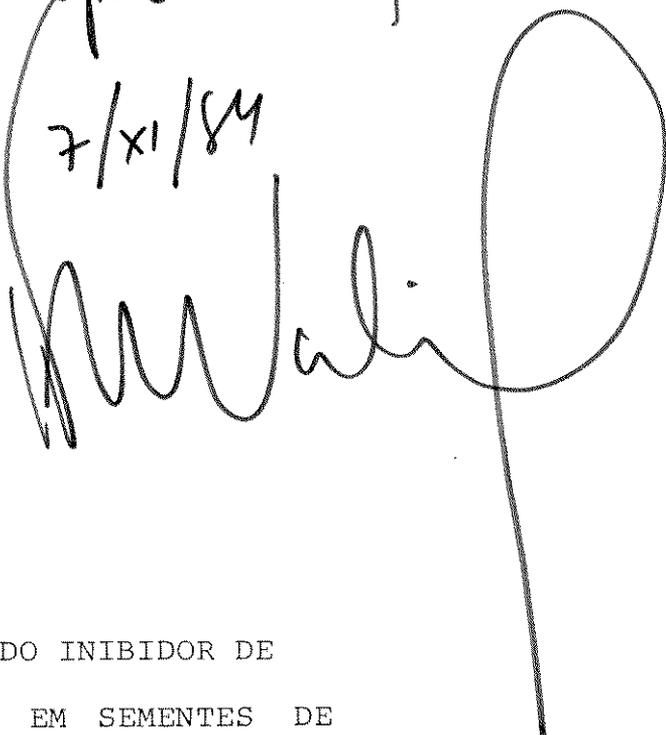


TOSHICO ONIKI INENAMI

Este exemplar corresponde à Redação
final da Tese defendida pelo Sr. Toshiko
O. Inehaki e aprovada pela Comissão
Julgadora.

7/xi/84



ESTUDO DO INIBIDOR DE
GERMINAÇÃO EM SEMENTES DE
MYROXYLON PERUIFERUM L.f.
(CABRIÚVA) - LEGUMINOSAE

CAMPINAS

1984

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

TOSHICO ONIKI INENAMI

ESTUDO DO INIBIDOR DE GERMINAÇÃO EM SEMENTES
DE MYROXYLON PERUIFERUM L.f. (CABRIÚVA) - LEGUMINOSAE

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual
de Campinas para a obtenção do
título de Mestre em Ciências Bio
lógicas na área de Biologia Vege
tal.

Orientador: Prof.Dr. Ivany Ferraz Marques Válio

Campinas

1984

Aos meus pais,
aos meus irmãos
e ao meu filho, Sérguei.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Ivany Ferraz Marques Válio, do Departamento de Fisiologia Vegetal, do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, pela orientação, apoio e interesse durante todas as etapas do trabalho.

À Profa. Dra. Eva Gonçalves Magalhães, do Instituto de Química da Universidade de Campinas, pela orientação na parte fitoquímica do trabalho e pelo carinho.

Aos Professores Dr. Ladaslav Sodek, Dra. Maria de Fátima A. Pereira, Dra. Rosely R. Sharif, pelas valiosas sugestões e revisão científica da tese.

Aos amigos e professores Dr. Luiz Koodi Hotta e Rosane Nisembaum, do Laboratório de Estatística da Universidade Estadual de Campinas, pela estatística dos resultados e pela revisão do trabalho.

Ao Prof. Dr. Aderbal Farias Magalhães, do Instituto de Química, da Universidade Estadual de Campinas, pelo auxílio na parte de cromatografia e identificação.

À Rosa Toyoko Shiraishi, do Instituto de Química, pela obtenção do espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e pelo apoio.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia Vegetal, da Universidade Estadual de Campinas, João, Sebastiana, Aríbis e em particular à Neuza e Dulce, pelo auxílio na coleta de sementes.

Aos funcionários do Instituto de Química em especial Lourival e Dna. Nena pela colaboração durante o desenvolvimento do trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo , pelas bolsas de estudo concedidas durante a execução deste trabalho.

A todos os colegas da Pós-Graduação, pelo companheirismo e em especial às amigas Ana Maria Vianna, Marlene Aparecida S. Massei e Wanda Magnani Braggio, pelo carinho e força que transmitiram.

À M. Júlia, pela paciente datilografia deste trabalho.

Às amigas Sueli e Dna. Clara, que me apoiaram constantemente para a elaboração deste trabalho.

ÍNDICE GERAL

| | |
|--|----|
| I. INTRODUÇÃO | 1 |
| II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA: ALGUNS ASPECTOS RELEVANTES | 4 |
| III. MATERIAL E MÉTODOS | 22 |
| 1. Material | 22 |
| 2. Embebição | 22 |
| 3. Testes de Germinação | 22 |
| 3.1. Condições de luz | 23 |
| 3.2. Temperaturas constantes | 24 |
| 3.3. Lixiviação com água | 24 |
| 4. Métodos de Extração para Bioensaio | 24 |
| 4.1. Obtenção dos extratos | 24 |
| 4.2. Purificação dos extratos | 25 |
| 4.3. Cromatografia em camada delgada | 25 |
| 4.4. Bioensaio para inibidor | 27 |
| 5. Métodos de Extração para Isolamento e Identificação do Inibidor | 28 |
| 5.1. Obtenção do extrato | 28 |
| 5.2. Cromatografia de adsorção em coluna .. | 29 |
| 5.3. Cromatografia preparativa com desenvolvimento contínuo | 30 |
| 5.4. Cromatografia em camada delgada | 31 |

| | |
|--|----|
| 5.5. Série eluotrópica de solventes | 32 |
| 5.6. Métodos de identificação | 33 |
| 6. Lixiviação com Acetona | 34 |
| 7. Efeito de Cumarina | 34 |
| 8. Caracterização e Quantificação da Cumarina em Sementes de <u>M. peruiferum</u> | 35 |
| 8.1. Macerados | 35 |
| 8.2. Papel substrato | 36 |
| 8.3. Sementes lixiviadas com acetona | 37 |
| 8.4. Cromatografia de adsorção em coluna .. | 37 |
| 8.5. Cromatografia gás líquido | 38 |
| 9. Análise Estatística | 38 |
| IV. RESULTADOS | 39 |
| Embebição | |
| 1. Embebição de Frutos, Sementes e Envoltórios das Sementes | 39 |
| Germinação | |
| 2. Influência da luz e da temperatura | 41 |
| 3. Efeito da lixiviação em água corrente | 47 |
| Ensaio Biológicos | |
| 4. Bioensaio de germinação de sementes de <u>alfa</u> <u>ce</u> | 52 |
| Fitoquímica | |
| 5. Detecção, separação, isolamento e <u>purifica</u> <u>ção</u> da substância inibidora | 57 |

| | |
|--|----|
| 6. Influência da lixiviação com acetona e efeito de cumarina | 59 |
| Caracterização e Quantificação da Cumarina | |
| 7. Cromatografia gás-líquido da cumarina que ocorre em sementes de <i>Myroxylon peruiferum</i> . | 64 |
| V. DISCUSSÃO | 68 |
| VI. RESUMO | 74 |
| VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 76 |
| APÊNDICE I | 84 |
| APÊNDICE II | 87 |

...

I. INTRODUÇÃO

Myroxylon peruiferum é conhecida popularmente como pau-de-bálsamo, bálsamo ou cabriúva. Essa espécie pertence à Ordem Rosales, tribo Soforeas, família Leguminosae e sub-família Faboideae (= Papilionoideae). Sua distribuição compreende a Colômbia, a Bolívia e o Brasil. M. peruiferum caracteriza-se por ser uma árvore que atinge cerca de 20 a 30 m. de altura, apresentando a casca cinza-claro, íntegro-rugosa. A floração ocorre de setembro a novembro. As flores são brancas e o cálice é campanulado, truncado. A corola é quase rotácea de 5 pétalas pequenas, separadas e caducas. Já o estandarte é maior. Os estames são em número de 10 livres, com filamentos incluídos no cálice; as antenas são largas, agudas, exsertas e o ovário é linear, glabro. A frutificação ocorre de novembro a dezembro. O fruto é uma sâmara. A semente é apical, oblíqua, grossa e a ala é basal, delgada, com nervo grosso sub-marginal. A superfície da semente é sulcada por profundos canais resiníferos. A madeira é dura, de excelente qualidade e economicamente importante em trabalhos de carpintaria (Burkart, 1952).

Os bálsamos terapeuticamente mais utilizados são os do Peru e de Tolu que são obtidos de Myroxylon balsamum (L.) Harms var. pereiraë (Royle) Baillon e Myroxylon balsamum (L.) Harms var. genuinum Baillon existentes nos países centro americanos. Diferem da espécie produtora de bálsamo de nossa flora tanto em seu aspecto morfo

lógico quando no aroma do bálsamo. Essa espécie teve uso na medicina popular desde o início da colonização. Comumente, é usado contra acarinos e nos tratamentos de feridas e vias respiratórias.

Existem trabalhos antigos que se referem de maneira muito superficial a Myroxylon peruiferum. Segundo Tschirch, há meio século atrás, o bálsamo extraído de M. peruiferum forma uma resina sólida, semelhante à do bálsamo de Tolu, contendo ácido cinâmico e traços de ácido benzóico (Akisue, 1972a).

Mais recentemente, Akisue (1971), descreveu a morfologia e a histologia da folha e caule de M. peruiferum, órgãos portadores de elementos secretores. Na casca primária do tronco encontrou canais e glândulas secretoras. A presença de bálsamo nos tubos crivados mais externos da casca lesada, foi confirmada através de reações histoquímicas.

Akisue (1971), também descreveu uma série de experimentos com a finalidade de encontrar melhor rendimento em bálsamo. Já em 1972a, ele efetuou caracterizações físicas e químicas, diversas reações e análise qualitativa dos componentes do bálsamo, empregando métodos de cromatografia em camada delgada. Nessa análise, fracionou o bálsamo em ácidos fortes, ácidos fracos, fenóis fortes, fenóis fracos, lactonas, aldeídos, cetonas, álcoois primários, álcoois secundários e outros. Entre os componentes, foram identificados o ácido benzóico, o ácido cinâmico, a vanilina, o benzoato de benzila, o cinamato de benzila, o nerolidol e o álcool benzílico. Também, efe

tuou caracterização física e química do óleo essencial do bálsamo e análise qualitativa de alguns componentes. O óleo essencial obtido por destilação do bálsamo, contém ácido benzóico, vanilina, benzoato de benzila, cinamato de benzila, cinamato de metila, nerolidol, álcool benzílico e farnesol (Akisue, 1972b).

O óleo essencial extraído da madeira do tronco de M. peruiferum, mostrou conter nerolidol, vanilina e flavonóides (Maranduba et al., 1979).

Através da análise química do bálsamo de cabriúva, do óleo essencial deste bálsamo, da casca da planta (Akisue, 1971, 1972a, 1972b) e do óleo essencial da madeira do tronco (Maranduba, et al., 1979), foram constatadas várias substâncias fenólicas.

Essas substâncias fenólicas são conhecidas como substâncias inibidoras de crescimento e germinação. Isto nos levou a suspeitar da ocorrência dessas substâncias nas sementes e/ou nos envoltórios das sementes de Myroxylon peruiferum.

O objetivo deste trabalho foi verificar a possível presença desses compostos fenólicos nos envoltórios das sementes ou nas próprias sementes e correlacioná-los com o processo de germinação. Concomitantemente, procurou-se verificar, também alguns fatores do meio externo que atuariam na germinação das sementes de cabriúva.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:
ALGUNS ASPECTOS RELEVANTES

As sementes servem para propagar a espécie e assegurar sua sobrevivência. A formação da semente, sua dispersão e adaptação às condições locais, consequentemente, garantem não só o estabelecimento da plântula, mas também um ciclo de vida completo, incluindo a produção de novas sementes. Várias são as influências da planta mãe no comportamento posterior da semente durante e próxima à germinação. Também, apesar das grandes populações de sementes mostrarem um certo grau de uniformidade, o comportamento das sementes individuais mostra uma grande variabilidade. Essa variabilidade é necessária para garantir a dispersão da germinação das sementes no tempo e no espaço (Mayer, 1980/1981).

A germinação da semente de plantas superiores pode ser considerada como um número consecutivo de etapas, que induz uma semente quiescente, com um baixo conteúdo de água, a mostrar um aumento na sua atividade metabólica geral e iniciar a formação de uma plântula a partir do embrião. O passo exato em que a germinação termina e o crescimento começa é extremamente difícil de ser definido. Isto é particularmente complicado, porque identifica-se a germinação pela protrusão de alguma parte do embrião através da casca de sementes, que já é em si, um resultado do crescimento.

Para uma semente germinar, ela deve ser colocada em condições favoráveis de temperatura, suprimento de água e composição de gases. Essas condições variam de acordo com as espécies e são determinadas por condições que predominaram durante a sua formação e também por fatores hereditários.

O primeiro processo que ocorre durante a germinação é a absorção de água pela semente. Essa embebição é determinada por três fatores: composição química da semente, disponibilidade de água no meio e permeabilidade do tegumento da semente.

A embebição é um processo físico, que está relacionado com as propriedades dos colóides. Não está relacionado com a viabilidade das sementes. Durante a embebição, as moléculas do solvente entram na semente, causando solvatação das partículas coloidais. Além disso, ocupam os espaços capilares livres e os espaços intermoleculares dos colóides. A expansão do colóide resulta na produção de pressões consideráveis chamadas pressões de embebição. A magnitude da pressão de embebição é também uma indicação do poder de retenção de água da semente e portanto determina a quantidade de água disponível para reidratação dos tecidos durante a germinação.

Assim que uma semente está hidratada, ocorrem muitas mudanças químicas: a hidrólise de certos materiais, o transporte de materiais de uma parte da semente para outra e especialmente do endosperma para o embrião, ou dos cotilédones para as partes de crescimento e a síntese de novos materiais a partir da hidrólise de produtos armazenados (Mayer e Poljakoff-Mayber, 1975).

A germinação de muitas sementes é sensível à luz, algumas exigindo luz para germinação e outras sendo impedidas de germinar pelo tratamento da luz. Este fenômeno, conhecido desde o fim do século dezoito, foi denominado fotoblastismo, por Evenari em 1956 (Mayer e Poljakoff-Mayber, 1975).

As sementes cuja germinação é estimulada pela luz são consideradas fotoblásticas positivas, enquanto aquelas cuja germinação é inibida pela luz são as fotoblásticas negativas. Existem ainda as sementes não-fotoblásticas, com a germinação que não é afetada de nenhum modo pela presença ou ausência da luz.

Desde 1956, muitas pesquisas têm sido centradas no controle da germinação de sementes e tornou-se claro que as definições acima são significativamente de um senso mecanístico. Agora, é sabido que os efeitos inibitórios e estimulatórios da luz são simplesmente duas facetas de um mecanismo comum. Contudo, muitas sementes não sensíveis à luz podem se tornar sensíveis através de vários tratamentos de estresse.

A causa da unificação de conceitos foi devido ao fato de que diferentes regiões espectrais da luz branca são responsáveis pelos efeitos estimulatórios e inibidores da germinação. Comprimentos de onda abaixo de 290 nm inibiam a germinação de todas as sementes testadas. Comprimentos de onda entre 290 nm e 400 nm não apresentavam efeitos nítidos sobre a germinação. Entre 560 e 700 nm, em especial a luz vermelha, comumente ocorria promoção de germinação (Mayer e Poljakoff-Mayber,

1975).

Flint e McAllister (1935,1937 In Smith, 1975) mostraram que a germinação de sementes de alface sob luz vermelha poderia ser estimulada e que sob vermelho extremo a germinação poderia ser inibida. Desde que na promoção e na inibição, pode ser demonstrada a fotorreversibilidade do vermelho e vermelho extremo, foi proposto em 1952, por Borthwick e colaboradores (In Frankland, 1980) que existia um fotorreceptor envolvido. Esses autores explicaram esse efeito através do fotorreceptor, a presentado em duas formas: a forma inativa (FV) que ab sorve o vermelho e a forma ativa (FVE) que absorve o ver melho-extremo. Esse pigmento fotorreceptor responsável pela percepção do estímulo da luz, foi denominado fito cromo (Frankland,1980).

De acordo com Mohr (1972) o modo pelo qual o estímulo captado pelo fitocromo é convertido em respos ta fisiológica ainda não está totalmente esclarecido. O fitocromo poderia agir como controlador de atividade gê nica, ativando ou reprimindo genes, regulando dessa for ma a síntese protéica.

Segundo Hsiao e Vidaver (1971), a fotoconver são do fitocromo é a demanda que há entre o rearranjo inter-molecular das moléculas hidratadas. Esses autores consideram que o envolvimento do fitocromo na germina ção poderia ser separado em uma fase de indução onde o fitocromo é fotoconvertido e uma fase de expressão onde a ação do fitocromo influenciaria processos metabólicos, resultando na germinação.

A resposta das sementes à luz é modificada por vários fatores internos e externos; o estresse osmótico, a presença de promotores ou inibidores de crescimento, a tensão de O_2 podem alterar a duração e a intensidade da luz exigidas para obter uma certa resposta. Mesmo o espectro de radiação à qual a planta mãe foi exposta durante a formação da semente afeta a resposta das sementes à luz. Em geral, todos os fatores internos e externos que afetam a germinação interagem de algum modo (Mayer e Poljakoff-Mayber, 1975).

O efeito da luz é frequentemente dependente da temperatura (Kendrick e Frankland, 1981).

O conceito da existência, para todas as espécies de plantas, dos limites de temperatura superiores (máxima) e inferiores (mínima) em que pode ocorrer a germinação das sementes foi primeiramente formulada por J. Sachs em 1860 (Koller, 1972). Esse pesquisador foi quem primeiro estudou os efeitos de temperaturas constantes na germinação de muitas plantas cultivadas. O termo temperatura "ótima" era usado para descrever aquela temperatura intermediária em que era obtida a melhor germinação.

Com a crescente compreensão das propriedades das enzimas e da natureza das reações enzimáticas, tornou-se evidente que qualquer processo fisiológico em que um passo é mediado por enzimas, só pode ocorrer entre certos limites de temperatura. Foi reconhecido que o fator tempo estava envolvido em tais processos (Koller, 1972).

Atualmente, para Bewley e Black (1982), quando as sementes são colocadas para germinar em uma faixa de temperatura, um ótimo logo torna-se evidente. A temperatura ótima varia de espécie para espécie.

A determinação da taxa de germinação é de grande valor para caracterizar as respostas da semente à temperatura.

A população de uma espécie é heterogênea em relação à germinação. O significado biológico disto pode ser o alto potencial de germinação que é combinado com a distribuição temporal mesmo quando as condições de temperatura são ótimas.

Em relação a temperaturas extremas, é possível que as sementes que germinam a temperaturas mais altas não possam germinar a temperaturas mais baixas, isto é, elas são termofílicas e criofílicas respectivamente. Isto implica que há sub-populações com características de temperatura ótima.

Quanto à velocidade de germinação de Magonia pubescens, as sementes sem envoltório apresentam velocidade máxima a 29°C, para 50% de germinação. Como também a temperatura de 29°C está entre aquela de máxima germinabilidade (100%), o ótimo de temperatura se localiza a 29°C. Acima e abaixo dessa temperatura, cresce a média dos tempos individuais de germinação. A temperatura mínima de velocidade de germinação das sementes sem envoltório é atingida a 4°C e a máxima a 42°C (Salgado Labouriau, 1973).

Quanto à capacidade de germinação de M. pubescens, as sementes sem envoltório apresentam germinabilidade de 100% na faixa de 20°C a 34°C. A dependência da temperatura na germinabilidade das sementes sem envoltório revela uma heterogeneidade fisiológica que é ressaltada quando se medem as velocidades de germinação (Salgado Labouriau, 1973).

Em sementes de mamona, a faixa de temperatura para a germinação parece estar entre 25°C e 40°C (Lagôa, 1983).

A temperatura ou a faixa de temperatura em que diferentes sementes germinam é determinada pela origem das sementes, diferenças genéticas e também a idade das sementes. Os níveis de substâncias de crescimento endógenas tem também um papel na determinação da faixa em que as sementes germinam (Mayer e Poljakoff-Mayber, 1975).

A temperaturas relativamente baixas, o metabolismo dos embriões é pequeno, portanto é exigido pouco oxigênio para assegurar este estágio de metabolismo, permitindo que ocorra a germinação. A temperaturas mais altas, a taxa metabólica potencialmente maior do embrião exige mais oxigênio (Côme e Tissaoui, 1972).

As respostas para temperaturas não podem ser explicadas somente pelos efeitos da respiração. Outros processos metabólicos são acelerados quando a temperatura aumenta acima do mínimo. Alguns desses processos provavelmente contribuem para o aumento da taxa de germinação que acompanha o aumento da temperatura. As membra

nas das células são especialmente sensíveis a aumentos de temperatura. Isto está incluído no conceito de desnaturação devido ao importante papel das lipoproteínas (Bewley e Black, 1982).

Então, cada semente contém todos os substratos e mecanismos bioquímicos que são exigidos para atuar na variedade de processos bioquímicos interrelacionados na germinação (Koller, 1972).

Existem muitas razões possíveis para que uma semente (ou unidade de dispersão) apesar de viável não germine. Uma dessas razões pode ser devido ao fenômeno da dormência apresentada pelas sementes. A dormência é considerada, quando o meio é adequado para a germinação e as sementes falham em responder a essas condições favoráveis.

Basicamente, existem dois tipos de dormência que envolvem diferentes mecanismos: a dormência do embrião e a dormência imposta pelo tegumento.

O controle da dormência do embrião envolve os cotilédones e os inibidores da germinação. Neste caso podem-se considerar os embriões morfologicamente imaturos.

As estruturas de revestimento das sementes podem impedir a germinação devido a interferência na absorção de água, interferência com as trocas gasosas ou presença de inibidores químicos. Podem agir ainda como barreira contra a liberação de inibidores do embrião e modificação da luz que atinge o embrião ou exercer um

Segundo Côme (1970, In Lousa, 1973), os inibidores podem ser extraídos dos órgãos em que se encontram pela água ou solventes orgânicos. Em muitas sementes que possuem inibidores, esses são facilmente removidos por uma simples lavagem das sementes em água corrente.

O fenômeno da lixiviação pode remover um promotor, um inibidor de germinação ou não ter efeito na germinação. Também às vezes, a lixiviação pode alterar o suprimento de oxigênio disponível para o embrião.

A lixiviação das sementes de Datura stramonium reduziu a germinação, podendo este efeito ser devido à remoção de algum promotor. A água da lixívia dessas sementes, promoveu a germinação de Datura e de sementes de Cucumis ancuria (Villar, 1982).

Também a lixiviação das sementes de Ricinus communis provocou uma inibição da germinação. A água da lixívia também promoveu a germinação dessas sementes. O efeito dessa lixiviação pode também ser devido à remoção de algum promotor, assim como a diminuição do suprimento de oxigênio. Essa última hipótese é pouco provável devido a lavagem ter sido intermitente (Lagôa, 1983).

As plantas contêm substâncias que inibem os processos de crescimento e germinação nas plantas. A classe dessas substâncias é denominada de inibidores naturais de crescimento. Podem ser encontrados não somente em órgãos dormentes, mas também em partes da planta em crescimento como folhas, sementes, caules e raízes.

Os inibidores naturais de crescimento podem ser representados principalmente por inibidores fenólicos e

componentes terpenóides (Kefeli, 1978).

Entre os inibidores fenólicos, encontram-se vários tipos de substâncias: derivados do ácido benzóico como os ácidos salicílico, p-hidroxibenzóico e gálico, derivados do ácido cinâmico como os ácidos p-cumárico, cumarina, escopoletina e alguns depsídeos como o ácido clorogênico e floridizina (Kefeli e Kadyrov, 1971).

Até o ano de 1960, os compostos naturais fenólicos pareciam ser o principal grupo de inibidores. Contudo, em 1963, Ohkuma et al isolaram um novo inibidor de natureza terpenóide, o ácido abscísico.

É interessante mencionar que em 1953, Bennet-Clark e Kefford, através de análise de extratos vegetais, mostraram uma zona de atividade inibitória nos cromatogramas de papel. Essas substâncias localizadas nesta faixa do cromatograma foram denominadas inibidor β . Depois disso vários autores detectaram o inibidor β em extratos vegetais e tentaram identificá-lo. Enquanto para alguns, a inibição era devida a várias substâncias inibidoras fracas, outros sugeriram que a inibição era devida principalmente a uma única substância ativa cuja ocorrência se daria em baixas concentrações (Robinson e Wareing, 1964).

Em 1963, Ohkuma et al. isolaram e identificaram o ácido abscísico em extratos de frutos de algodão. Agora, sabe-se que o principal composto na região do inibidor β é o ácido abscísico.

O ácido abscísico é um inibidor, consideravelmente mais forte que os compostos fenólicos (Kefeli e Kadyrov, 1971).

O ácido abscísico é um inibidor sesquiterpeno e é considerado um hormônio vegetal. Está envolvido em fenômenos bioquímicos como capacidade de inibir a indução da giberelina na síntese de enzimas proteolíticas. Também, o ácido abscísico, promove alterações bioquímicas na senescência e abscisão (Addicott e Lyon, 1969).

Em relação aos fenômenos fisiológicos, está envolvido na senescência, abscisão, dormência, inibição e estimulação do crescimento, estabelecimento e desenvolvimento do fruto, floração, movimento estomático, etc. (Milborrow, 1974).

Já foram isoladas e identificadas algumas substâncias relacionadas com o ácido abscísico; o ácido faseico, o metil éter do ABA, a teaspirona e o isômero 2-trans- do ácido abscísico, Essas parecem as primeiras substâncias de um grupo interrelacionadas química e fisiologicamente (Leopold e Kriedemann, 1975).

Os organismos inferiores também possuem substâncias reguladoras de crescimento. Em 1969, Válio et al. isolaram e identificaram pela primeira vez o ácido lunulárico, um inibidor natural de crescimento da hepática Lunularia cruciata. O inibidor ácido lunulárico é um dihidrostilbeno e ocorre em algas marinhas e de água doce (Pryce, 1972). Foi sugerido que o ácido lunulárico pode ser o equivalente biológico do ácido abscísico em algas hepáticas.

No grupo dos inibidores fenólicos, os mais conhecidos e estudados são a cumarina e seus derivados.

Desde que Vogel em 1920 (Abernethy, 1969) iso

lou a cumarina, novas cumarinas foram reconhecidas como produtos amplamente distribuídos em plantas. Vogel associou o odor forte de botão de trevo (Melilotus officinalis) com aquele do feijão "tonka" (Dipteryx odorata). Embora na época, ele não tivesse obtido prova rigorosa que essas duas fontes produziam o mesmo composto, os procedimentos experimentais mostraram que certas propriedades eram comuns. É sabido agora que o composto de ambas as fontes é cumarina.

Por muitos anos, as cumarinas ocorrendo naturalmente eram as únicas conhecidas, até aparecerem os métodos sintéticos de Perkin e Von Pechmann (Abernethy, 1969).

As cumarinas ocorrem em todas as partes da planta: raízes, flores e frutos e são encontradas em várias famílias de Fanerógenas e Criptógamas.

Spath e Keppel (In Soine, 1964) listaram as espécies e as partes associadas com cumarinas. Em geral, elas são encontradas em Poae, Orchidaceae, Leguminosae, Umbelliferae, Rutaceae e Labiatae. Mais recentemente, foram encontradas como produtos metabólicos de bactérias e fungos.

Os progressos nos procedimentos de isolamento e análise estrutural, particularmente na última década, levaram a um aumento marcante no número de cumarinas. Muitas dessas cumarinas são referidas na literatura somente por seus nomes triviais, derivados do nome da espécie de onde foram extraídas. Até recentemente, utilizou-se de sua natureza lactônica, para separá-la dos

extratos de planta contendo outros produtos naturais (Murray, 1978).

Apesar de amplamente distribuídas, as cumarinas raramente ocorrem em altas concentrações nos tecidos de plantas. O isolamento e identificação das cumarinas exigem grande quantidade de material. Além disso, desde que as cumarinas ocorrem como misturas, são necessários exaustivos métodos para sua purificação. Hoje, a identificação desses componentes conta com técnicas espectroscópicas, particularmente a ressonância magnética nuclear (Steck e Bailey, 1969).

Há vinte anos, a química dos produtos naturais preocupava-se apenas em isolar e tentar elucidar a estrutura dos compostos presentes em um material natural. As pesquisas tinham seus objetivos escolhidos, na tentativa de solucionar problemas puramente químicos, sem nenhuma referência ao seu significado biológico. Atualmente, o estudo químico está associado a uma atividade biológica.

Os métodos espectrofotométricos auxiliam na identificação e determinação quantitativa de compostos em extratos de plantas. O espectro de absorção do ultravioleta da cumarina e uma série de derivados foram utilizados para identificação de extratos brutos de raízes (Goodwin e Pollock, 1953). Válio (1973) dosou a cumarina extraída de sementes de Coumarouna odorata através de espectrofotometria do ultra-violeta, em comprimentos de onda de 275 nm, usando como padrão soluções de cumarina de 0 a 100 µg/ml. A concentração da cumarina perma

neceu constante nos cotilédones e aumentou nos embriões durante a germinação.

A cumarina é conhecida como inibidora natural de germinação desde 1914 (Sigmund , In Mayer e Evenari, 1952).

A cumarina induz dormência em sementes de alface sensíveis à luz (Nutile, 1945, In Berrie, 1968).

Sementes de alface expostas à cumarina durante a embebição leva à dormência que é dependente da temperatura. O efeito da cumarina em sementes de alface é maior a 25°C e inefetivo em temperaturas inferiores a 20°C. Na temperatura de 25°C, há evidência de que a cumarina seria metabolizada mais rapidamente (Berrie, 1968).

Mayer e Evenari (1952), trabalhando com sementes de alface e trigo, mostraram que qualquer mudança na estrutura da molécula de cumarina leva a uma destruição parcial da atividade da cumarina como inibidora da germinação. As características estruturais que são determinantes são: a presença da dupla ligação no anel da lactona e a ocorrência da estrutura de lactona. A remoção da dupla ligação reduz a atividade. A destruição da atividade da lactona tem um efeito semelhante.

A atividade inibitória da cumarina é explicada através da estrutura específica de sua molécula (Mayer e Poljakoff-Mayber, 1975).

A cumarina parece não apresentar atividade inibitória da semente que a contém. Válio (1973) observou que as sementes de Coumarouna odorata germinam a 33°C no escuro ou na luz, apesar dos altos níveis de cumarina

endógena. A cumarina aplicada a 0,4 e 4 mm^{nao} inibiu a germinação de Coumarouna, mas intensificou o crescimento dos embriões. Uma única semente de Coumarouna colocada no centro de uma placa de Petri, inibiu a germinação de sementes adjacentes como alface, rabanete e tomate.

A presença de cumarina no solo, de vasos com plântulas, sugere que ela é exsudada pela radícula. A cumarina pode inibir a germinação e crescimento de outras espécies em sua vizinhança, eliminando assim a competição durante os primeiros estádios de crescimento (Válio, 1973).

Willians e Hoagland em 1982, testaram os compostos ácido cafeico, ácido clorogênico, cumarina ácido p-cumárico, ácido ferúlico, ácido fumárico, ácido gálico, ácido hidrocinnâmico, ácido p-hidroxibenzóico, juglona e pirocatecol, na germinação de 9 espécies de plantas cultivadas e nativas. A germinação foi testada nas concentrações de 10^{-3} M e 10^{-5} M, sob condições controladas à 25°C e no escuro. Na concentração de 10^{-3} M, a cumarina, o ácido cinâmico, a juglona e o pirocatecol inibiram a germinação, mas p-hidroxibenzaldeído e o ácido p-hidroxibenzóico não foram efetivos e os outros tiveram efeitos intermediários. O efeito foi pequeno para qualquer composto a 10^{-3} M.

A cumarina e alguns derivados inibiram o crescimento micelial em uma espécie de Pythium (Dietrich e Válio, 1973). A cumarina também inibiu o crescimento de outras sete espécies de fungos a partir de diferentes grupos toxonômicos. Foi mostrado também que a atividade

inibitória depende do número, posição e natureza química das substituições da molécula (Dietrich e Válio, 1973).

Amen (1968), postula que a giberelina antagoniza o efeito do inibidor endógeno. A giberelina seria importante na ativação da amilase que age, no endosperma, sobre o amido, quebrando o bloqueio que é imposto pelo inibidor.

Dietrich e Válio (1973) não conseguiram obter a reversão do efeito da cumarina através do ácido indol-3-acético, ácido giberélico ou 6-benziladenina em Pythium e outros fungos.

Alguns compostos como dinitrofenol, salicilaldeído, β -resorcialdeído, cinamaldeído, ácido cinâmico, ácido o-cumárico, escopoletina e 2-metil-naftoquinona são conhecidos como desacopladores da fosforilação oxidativa. Porém, ácido ferúlico, cumarina e hidroxicumarina nas concentrações de 10^{-3} M foram inativos (Van Sumere et al., 1972). Este é um resultado interessante desde que vários autores tinham mostrado a propriedade desacopladora da cumarina.

A caracterização e quantificação da cumarina pode ser feita também através da cromatografia gás-líquido.

O uso de cromatografia gás-líquido para separação de cumarinas foi relatada primeiramente por Brown e Shyluk em 1962. Eles proporcionaram uma grande simplificação nos procedimentos de isolamento e identificação desses compostos.

Furuya e Kojima em 1967, também mostraram como

a cromatografia gás-líquido é um meio poderoso de demonstrar a homogeneidade de cumarinas conhecidas e desconhecidas e frequentemente tem como finalidade a identificação. Portanto, a técnica cromatográfica gás-líquido pode ser aplicada na análise quantitativa de misturas de extratos de plantas.

Inúmeras cumarinas fenólicas na forma de seus acetatos foram eluídas com êxito. Foram demonstradas separações de misturas de cumarinas através de cromatografia gás-líquido da raiz de Angelica archangelica e sementes de Heracleum sibiricum. Foi salientado o aspecto qualitativo do método na raiz de Heracleum sanatum Michaux var. nipponicum Hara e Pimpinellae radix (Brown e Shyluk, 1962).

Apesar de ser frequente a ocorrência de inibidores em diversos órgãos da planta, é discutível se eles desempenham algum papel na natureza (Lousa, 1971).

Para Witthaker e Feeny (1971), os inibidores podem ser liberados pela água da chuva indo até o solo. Os inibidores presentes no solo ou no folheto, podem dificultar ou inibir a germinação de sementes, e interferir nos processos de desenvolvimento e crescimento de plântulas.

Atualmente, os estudos sobre substâncias inibidoras de crescimento são em número bastante expressivo, focalizando diferentes aspectos fitoquímicos, fisiológicos e ecológicos.

III. MATERIAL E MÉTODOS

1. Material

Os frutos de Myroxylon peruiferum foram coletados na região de Campinas.

Em quase todos os experimentos foram utilizadas somente as sementes. Serão especificados os experimentos em que foram utilizados os envoltórios das sementes. Sempre foi excluída a asa da sâmara.

2. Embebição

A embebição foi determinada utilizando-se frutos, sementes e envoltórios das sementes com 3 repetições por amostra. Cada repetição constou de 10 frutos, sementes e envoltórios das sementes que foram imersos em um béquer com água destilada.

A porcentagem de embebição de cada amostra foi calculada em função do aumento de peso após a embebição, em relação ao peso inicial.

3. Testes de germinação

A germinação foi feita em caixas plásticas de gerbox transparentes de 12 x 12 cm., revestidas com papel substrato (Germitest cel 0,5). As sementes foram um deci

das com 17 ml de água destilada, contendo Nystatin (concentração de 1 mg/60 ml de água destilada), para prevenir o aparecimento de fungos. Foram utilizadas 25 sementes por caixa gerbox com 4 repetições para cada tratamento.

Nos experimentos de lixiviação com acetona e efeito de cumarina, as caixas gerbox foram mantidas em condições desfavoráveis, para a germinação, na temperatura de 10°C. Ao controle foi dado o mesmo tratamento. Após 24 horas de embebição em água destilada, as sementes foram transferidas para seus respectivos tratamentos.

Os experimentos foram realizados em câmara de crescimento "Forma Scientific", à temperatura de 25°C.

As sementes eram consideradas germinadas, quando se observava o crescimento da radícula. Devido a dificuldade de visualizar nitidamente o início da germinação, a contagem foi iniciada no 3º ou 4º dia.

3.1. Condições de luz

A luz branca foi proveniente de lâmpadas fluorescentes.

O escuro foi obtido em caixas gerbox pretas de 12 x 12 cm., previamente testadas, vedando totalmente a entrada da luz.

A verificação da germinação das sementes mantidas no escuro, foi feita sob luz verde de segurança.

3.2. Temperaturas constantes

Foram testadas na luz e no escuro, as temperaturas de 20°C, 25°C, 30°C, 35°C e 40°C.

3.3. Lixiviação com água

As sementes foram lixiviadas intermitentemente através de um soxhlet durante 24 horas. Como controle, foram testadas sementes não lixiviadas. Ambos os tratamentos foram mantidos na luz e no escuro, na temperatura de 25°C.

4. Métodos de extração e bioensaio

4.1. Obtenção dos extratos

As extrações foram feitas a partir dos seguintes tratamentos:

- envoltórios das sementes e sementes embebidas.
- sementes não embebidas e sementes embebidas por 24, 48, 72 e 96 horas.

A maceração das sementes e dos envoltórios foi feita em almofariz com metanol 80%. Depois, cada extrato foi homogeneizado no sonificador "Polytron" e mantido em extração a 5°C durante 24 horas.

Após esse período, o macerado foi filtrado e o

resíduo foi re-extraído em metanol 80% durante 1 hora sob agitação. Novamente, filtrou-se o macerado e o resíduo foi colocado em estufa a 80°C, para obtenção do peso seco. O filtrado obtido foi adicionado ao da primeira filtração. Obteve-se assim o extrato metanólico bruto; a seguir, procedeu-se à eliminação do metanol por meio de um evaporador rotatório, sob pressão reduzida, a 37°C.

4.2. Purificação dos extratos

A etapa seguinte foi o fracionamento do extrato aquoso de acordo com a Fig. 1.

4.3. Cromatografia em camada delgada

A cromatografia foi feita em placas de 20 x 20 cm, onde se espalhou sílica-gel 60 G, Merck misturada em água destilada na proporção de 1:2 (p/v) a uma espessura de 0,5 mm. O sistema de solventes utilizado como fase móvel foi benzeno etanol 5:1 (v/v).

Cada placa foi desenvolvida no solvente, antes da aplicação do extrato, a fim de remover qualquer impureza eventual na sílica.

A ativação foi feita durante 30 minutos a 100°C.

O percurso desenvolvido pelo solvente foi de 15 cm. e a aplicação dos extratos foi feita em faixa transversal de 12 cm; e distante 2 cm da base da placa.

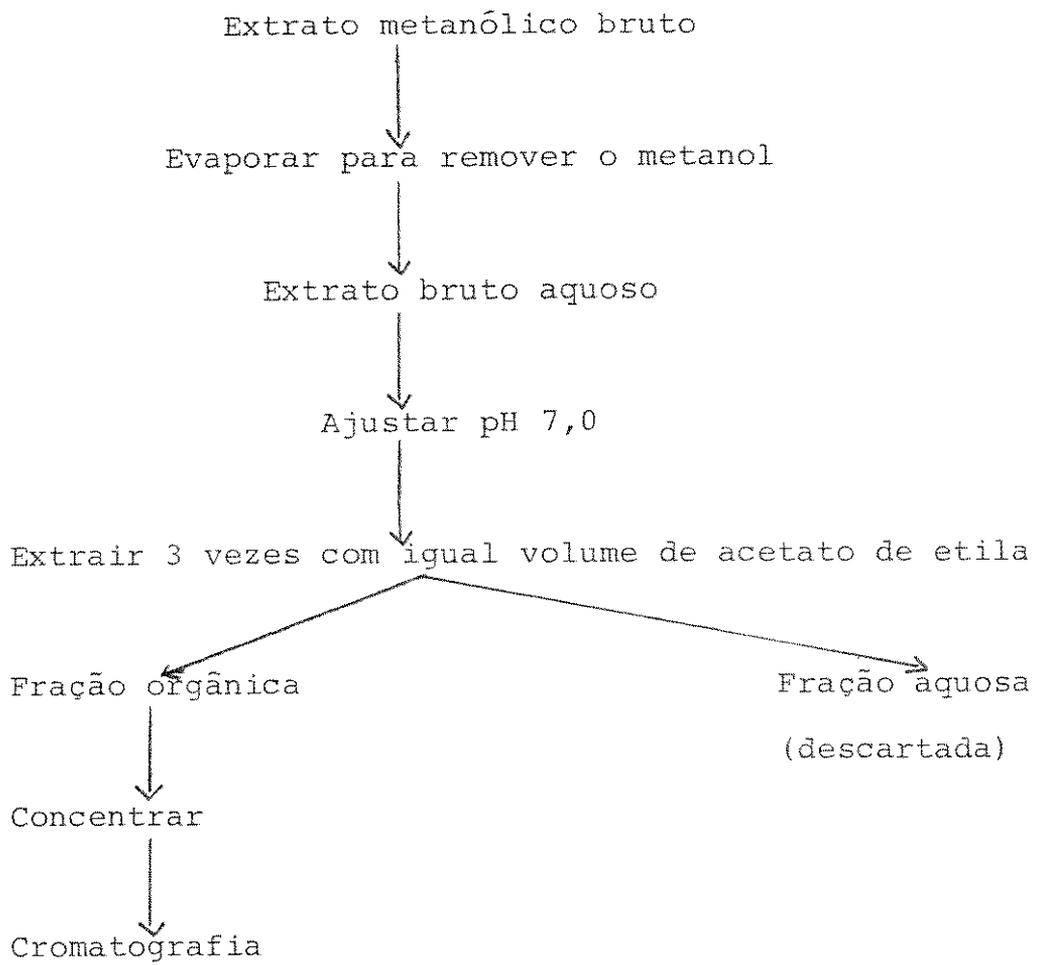


Figura 1. Esquema do processo de fracionamento

Paralelamente à aplicação dos extratos, foi feita a aplicação de um padrão, no caso cumarina (Coumarin puriss Koch Light Laboratories - Ltd. England) dissolvida em etanol.

Os cromatogramas desenvolveram-se em cubas de vidro retangulares. A cuba era mantida saturada, forrando-se suas paredes com papel de filtro. O desenvolvimento foi ascendente.

Depois que a fase móvel alcançava uma linha pré-determinada, as placas eram retiradas das cubas e colocadas para secar.

4.4. Bioensaio para inibidor

Após completa evaporação do solvente, dividiu-se cada cromatograma em 10 faixas iguais correspondentes a valores de Rfs de 0,0 a 1,0. Assim a primeira faixa correspondia aos intervalos entre os Rfs de 0,0 a 0,1. Cada faixa foi dividida no sentido transversal correspondendo a três repetições. Todos os cromatogramas, antes da montagem dos bioensaios, eram observados à luz ultravioleta longa e curta para detecção de compostos fluorescentes. O teste com germinação de sementes de alface detecta substâncias com atividade inibitória.

As faixas dos cromatogramas eram raspadas e a sílica espalhada em placas de Petri de 5 cm. de diâmetro, revestidas com duas folhas de papel de filtro. A seguir, acrescentavam-se 2,5 a 3,0 ml. de água destilada, 2 ho

ras antes de serem colocadas as sementes de alface "Grand Rapids". O controle foi feito utilizando-se uma cromatoplaça desenvolvida no mesmo solvente, sem aplicação do extrato.

As sementes foram mantidas sob luz fluorescente branca, em câmara de crescimento, "Forma Scientific" à 25°C, por 1 dia.

5. Métodos de extração para isolamento e identificação do inibidor

5.1. Obtenção do extrato

Para isolamento e identificação da substância inibidora ou complexo de inibidores, as extrações foram feitas a partir dos seguintes tratamentos:

- sementes do lote 1
- sementes do lote 2
- envoltórios das sementes do lote 1
- envoltórios das sementes do lote 2

Os lotes 1 e 2 correspondem a sementes coletadas em diferentes épocas.

Cem gramas de peso fresco de cada amostra, foram homogeneizadas em liquidificador com metanol 80%. O homogeneizado foi mantido em extração a 5°C durante 40 horas.

Após esse período, o homogeneizado foi filtrado

em funil de Büchner, forrado com dupla camada de papel de filtro, com auxílio da bomba a vácuo. O resíduo foi colocado em estufa a 80°C para obtenção do peso seco. Foi obtido assim o extrato metanólico bruto. A seguir, procedeu-se à eliminação do metanol por meio de um evaporador rotatório, sob pressão reduzida a cerca de 35°C.

A etapa seguinte foi o fracionamento do extrato aquoso de acordo com a Fig. 1.

5.2. Cromatografia de adsorção em coluna

Devido à dificuldade da separação da substância inibidora somente através de cromatografia em camada delgada, foi feita uma cromatografia em coluna.

Para a coluna foram utilizadas 95 g. de sílica-gel 60, Merck (tamanho da partícula 0,063 - 0,200 mm). A altura da coluna foi de 16 cm. e o diâmetro de 4 cm. O extrato utilizado foi o de sementes do lote 2. O extrato foi dissolvido em metanol e à solução resultante adicionou-se uma pequena quantidade de sílica-gel. Evaporou-se o solvente em evaporador rotatório até obter-se a sílica-gel bem solta e seca contendo o material toda adsorvido, que foi colocado no topo da coluna de sílica-gel, sendo eluído com hexano: clorofórmio 75:25.

Desta coluna foram coletadas 27 frações de 125 ml cada uma, reunidas em 3 grupos (F1-9, F13-15, F19-27), conforme resultado em cromatografia em camada delgada.

A substância inibidora estava contida na F13-15 e foi purificada através de duas cromatografias sucessivas em placas preparativas com desenvolvimento contínuo, quando se obteve um composto puro, isto é, apresentando uma mancha só na placa, quando revelada com luz ultravioleta, vapores de iodo e revelador de terpenos e esteróides.

5.3. Cromatografia preparativa com desenvolvimento contínuo

A cromatografia em camada delgada foi feita em placas preparativas de vidro de 20 x 20 cm., onde se espalhou sílica-gel 60, PF 254 em espessura de 1 mm.

A sílica-gel foi misturada em água destilada na proporção de 1:2 (p/v). A ativação das placas foi feita a 100°C.

Na aplicação da amostra ou fração, em placa preparativa, foi utilizada uma pipeta Pasteur com um filete de algodão na ponta pressionado com o auxílio da bomba a vácuo. A placa era colocada em um suporte com as laterais mais altas onde se apoiava uma outra placa de vidro e procedia-se à aplicação do extrato. Essa técnica não provoca fermento na camada de sílica da cromatoplaça, permitindo um melhor desenvolvimento. Para purificação final utilizou-se como fase móvel diclorometano: metanol 99:1 (v/v).

Depois que a fase móvel atingia a linha de

frente, isto é, o fim da placa, o tempo deste percurso era multiplicado por 3. Este tempo de desenvolvimento variou conforme a escolha da fase móvel.

Os cromatogramas desenvolveram-se em cubas de vidro retangulares. A cuba era mantida saturada, forrando-se suas paredes com papel de filtro. O desenvolvimento foi ascendente. A tampa da cuba tinha uma fenda para encaixe da placa preparativa. Atingido o tempo de desenvolvimento em que se completava a linha de frente, a placa era retirada da cuba e colocada para secar.

5.4. Cromatografia em camada delgada

A cromatografia em camada delgada foi feita em placas analíticas de vidro de 5 x 20 cm. Às vezes foi utilizada sílica-gel 60 PF 254 e outras vezes sílica-gel 60 Merck, distribuídas em camada de 0,25 mm. de espessura.

A sílica-gel foi misturada em água destilada na proporção de 1:2(p/v). A ativação das placas foi feita a 100°C.

A aplicação da amostra ou fração em placa analítica, foi feita com capilar.

Os cromatogramas desenvolveram-se em cubas de vidro circulares. A cuba era mantida saturada, forrando-se sua parede com papel de filtro.

5.5. Série eluotrópica de solventes

Foram experimentados diversos solventes, formando-se um sistema de fase móvel de diferentes polaridades (Tabela 1), para separação (purificação da substância inibidora)

É importante ressaltar que todos os solventes utilizados foram da Merck ou da Carlo Erba P.A.

Tabela 1. Série eluotrópica de solventes (Randerath, 1968)

n-pentano
éter de petróleo
n-hexano
n-heptano
ciclo hexano
tetracloroeto de carbono
tricloro etano
benzeno
diclorometano
clorofórmio
dietil éter
acetato de etila
piridina
acetona
n-propanol
etanol
metanol
água

aumento do poder de eluição



5.6. Métodos de identificação

O critério de pureza adotado foi a observação de uma única mancha em cromatografia em camada delgada, em diversos sistemas de solventes.

As revelações das placas foram obtidas por irradiação com uma lâmpada ultra-violeta em 254 e 366 nm. Para a detecção de substâncias orgânicas, algumas cromatoplas foram reveladas com vapores de iodo. O iodo sólido era colocado em uma cuba fechada e a cromatoplas mantinha-se na cuba, até ser revelada, isto é, até o aparecimento das manchas. O revelador específico de terpenos e esteróides contendo 500 ml. de ácido acético, 10 ml de ácido sulfúrico e 0,5 ml. de anisaldeído, que detecta caracteristicamente esses tipos de compostos também foi utilizado. O revelador de terpenos e esteróides foi usado por meio de um nebulizador. As cromatoplas após serem borrifadas com esse revelador, foram aquecidas em uma placa aquecedora, até o aparecimento das manchas.

Os métodos físicos utilizados para identificação foram os seguintes; o espectro da absorção no infravermelho (IV, cm^{-1}) foi feito num espectrofotômetro Perkin-Elmer, modelo 399B em pastilhas de KBr. ~~O padrão, no caso cumarina, foi dissolvida em etanol.~~

O espectro de absorção no ultravioleta (UV, nm) foi feito num espectrofotômetro Zeiss modelo DMR-21, em etanol, Merck, para espectroscopia.

O espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN^1H) foi feito num instrumento da Varian Associates modelo T-60. O solvente utilizado foi cloro

fórmio deuterado. A referência interna foi o tetrametil silano (TMS).

6. Lixiviação em acetona

Neste experimento as sementes foram embebidas por 24 horas, em condições desfavoráveis de temperatura (10°C). Após esse período de embebição em água destilada, as sementes foram imersas na acetona por um período de 5, 10 e 15 minutos separadamente. Após cada tratamento, as sementes foram colocadas em caixas gerbox transparentes. Os tratamentos foram testados na luz, na temperatura de 25°C .

Foi quantificada a cumarina do solvente aceto na resultante da lixiviação das sementes. Essa parte do experimento será explicitado no item da quantificação da cumarina.

7. Efeito de cumarina

Neste experimento as sementes foram embebidas em água destilada, por 24 horas, em condições desfavoráveis de temperatura (10°C). Após esse período, a cumarina foi testada na germinação de sementes de M. peruiferum em concentração de 10^{-3}M e 10^{-4}M .

8. Caracterização e quantificação da cumarina em sementes de M. peruiferum

Para este experimento, foram utilizados os macerados de sementes intactas, embriões e respectivos cotilédones.

Os tratamentos foram os seguintes:

- sementes intactas, cotilédones e embriões não embebidos.
- sementes intactas, cotilédones e embriões embebidos durante 24, 48, 72, 96 e 120 horas.

Devido à suspeita de que parte da cumarina era exsudada para o papel, foi feita a quantificação desse material:

- papel substrato em que foram colocadas as sementes por 24, 48, 72, 96 e 120 horas de embebição.

Foi também quantificada a cumarina dos lixiviados de acetona por 5, 10 e 15 minutos.

Os métodos utilizados para macerações das sementes, embriões e cotilédones, do papel substrato e das sementes lixiviadas com acetona serão descritos separadamente.

8.1. Macerados

A maceração das sementes, embriões e cotilédones

nes foi feita separadamente, em almofariz, com clorofórmio. Depois, foram homogeneizados em sonicador "Polytron" e mantidos em extração durante 3 horas sob agitação. Após esse período, o macerado foi filtrado e o resíduo foi re-extraído em clorofórmio durante mais 1 hora sob agitação. Novamente filtrou-se o macerado e o resíduo foi colocado em estufa a 80°C para obtenção do peso seco. O filtrado obtido foi adicionado ao da primeira filtragem. Obteve-se assim o extrato bruto com clorofórmio. A seguir, procedeu-se à eliminação do clorofórmio por meio de um evaporador rotatório, sob pressão reduzida, a 33°C.

8.2. Papel substrato

O papel substrato foi cortado em pequenos fragmentos depois que foram retiradas as sementes. Os fragmentos foram colocados em um erlenmeyer, juntamente com a água que estava na caixa gerbox, sendo acrescentado igual volume de clorofórmio. Esse erlenmeyer foi colocado sob agitação por um período de 3 horas. O conteúdo do erlenmeyer foi filtrado e o filtrado foi colocado em um funil de separação, onde a fração aquosa foi descartada.

A fração orgânica (clorofórmio) foi então purificada através de pequena coluna descrita no item 4.

8.3. Sementes lixiviadas com acetona

A acetona mais o exsudato das sementes lixiviadas nos períodos de 5, 10 e 15 minutos, passaram por coluna de purificação idêntica ao tratamento superior.

8.4. Cromatografia de adsorção em coluna

Para coluna foram utilizados 3900 mg de sílica-gel, Merck (tamanho da partícula de 0,2 - 0,5 mm). A altura da coluna foi de 10 cm e o diâmetro de 13 mm.

Os materiais utilizados foram:

- extratos obtidos por evaporação do solvente:
extratos clorofórmicos
- fração orgânica proveniente do papel substrato
- acetona usada para lixiviação das sementes por 5, 10 e 15 minutos de sementes lixiviadas.

Após a evaporação do solvente dos extratos clorofórmicos, adicionou-se uma pequena quantidade de sílica-gel. Essa mistura de sílica-gel e extrato foi colocada no evaporador rotatório até obter-se a sílica-gel bem solta e seca, a qual foi colocada no topo da coluna. A eluição foi feita com clorofórmio.

As amostras coletadas da coluna foram submetidas à cromatografia gás-líquido.

8.5. Cromatografia gás-líquido

Para cromatografia em fase gasosa foi utilizado um cromatógrafo Varian com detector de ionização de chama. As seguintes condições operacionais foram utilizadas: a coluna "Pirex" de 3 m x 0,2 cm, de Chromosorb WHP, 80-100 "mesh", impregnada com 3% de silicone SE-30. A coluna de vidro operou em 190°C; a temperatura do injetor foi 252°C e do detector 264°C. O atenuador foi utilizado em 4×10^{-10} .

Para comparação, foi usado um padrão de cumarina na concentração de 1000 ug/ml.

As alturas dos picos obtidos no registrador foram convertidos conforme a quantidade da amostra e apresentados na unidade de mg cumarina/g peso seco.

Análise estatística

No tratamento estatístico das tabelas referentes aos experimentos de germinação, adotou-se análise de variância e testes estatísticos não paramétricos: Wilcoxon, qui-quadrado, teste K* para comparações de mais de 2 tratamentos (Lehmann, 1975) e Wilcoxon modificado para dados censurados (Gehan, 1965).

IV. RESULTADOS

Os resultados obtidos nos experimentos de germinação foram elaborados apoiados nos tratamentos estatísticos das tabelas e gráficos. Os resultados dos bioensaios foram apresentados em tabelas e gráficos. A identificação da substância inibidora através de espectros será apresentada no apêndice. A caracterização e quantificação do inibidor foi apresentada em tabela.

Embebição

1. Embebição de frutos, sementes e envoltórios das sementes

O experimento de embebição foi realizado para observar o tempo de absorção de água, principalmente pela semente.

Pode-se verificar pela Fig. 2 que a absorção de água pela unidade de dispersão é rápida.

Os envoltórios das sementes embebem mais rapidamente devido à grande superfície de contato com a água e também devido ao tipo de material bastante poroso.

A semelhança das curvas de embebição do fruto e da semente, mostram que a parede do fruto não é barreira para a entrada de água.

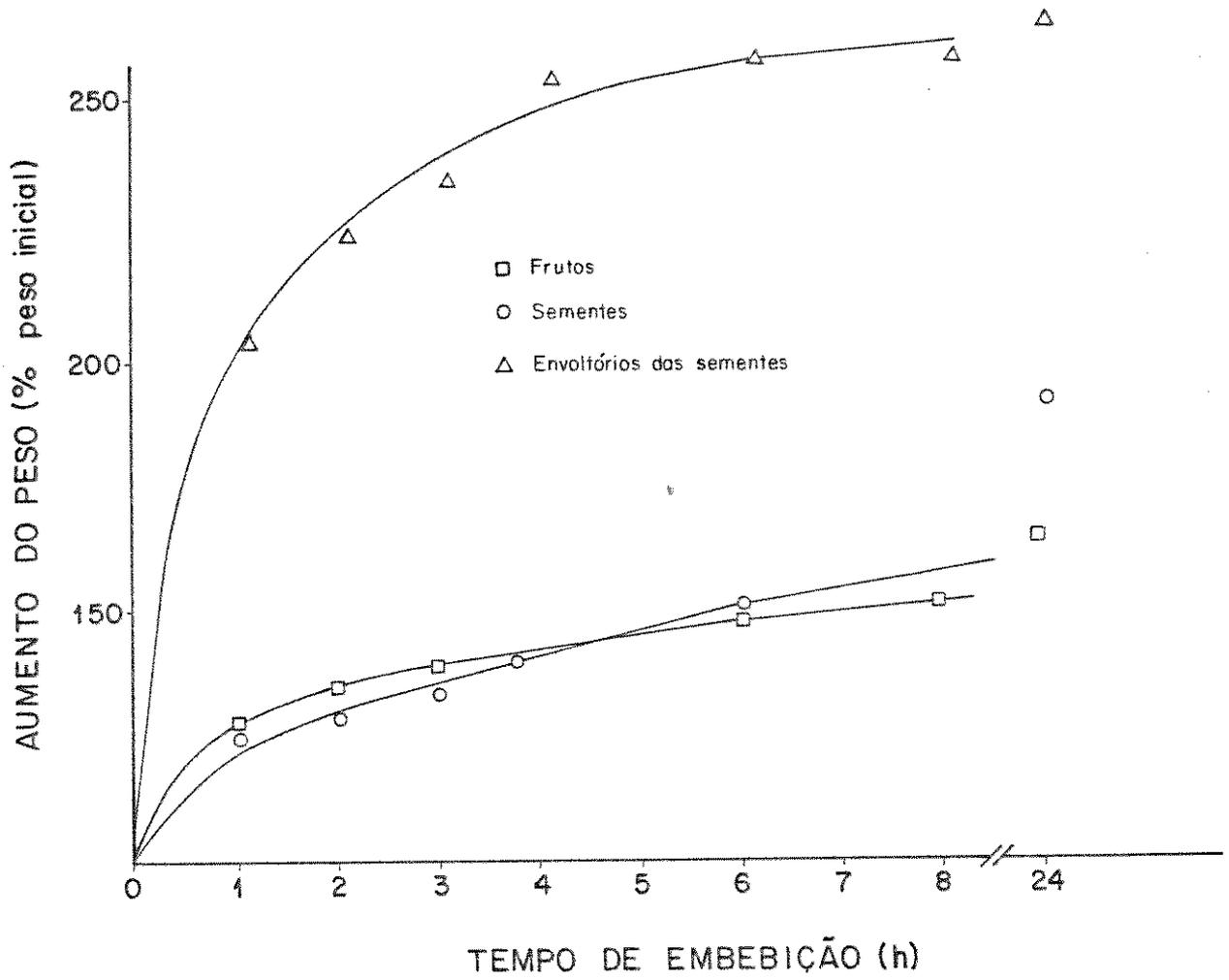


Figura 2. Curva de embebição de frutos, sementes e envoltórios das sementes de Myroxylon peruiiferum

Germinação das sementes

Foram analisados alguns fatores externos que afetam a germinação das sementes. Foram determinadas as condições de luz e temperatura em que as sementes germinam.

2. Influência da luz e da temperatura

Para verificar se as caixas gerbox exercem alguma influência sobre a velocidade de germinação, foi feito um primeiro teste estatístico. Verificou-se então se as variações entre as diferentes caixas gerbox a, b, c, d poderiam ser explicadas pelas variações experimentais ou se existiria indicação de que o fator caixa gerbox seria importante dentro de cada tratamento. Foram testados 10 tratamentos separadamente.

O teste utilizado foi o teste de independência qui-quadrado (Lehmann, 1975). Esse teste foi aplicado para cada combinação de luz (luz branca e escuro constantes) e temperatura (20°C , 25°C , 30°C , 35°C e 40°C). A estatística de teste utilizada foi para testar a hipótese nula: a taxa de germinação independe das caixas gerbox, contra a hipótese alternativa: o fator caixas gerbox é importante, pois as respostas dependem das caixas gerbox.

Para a aplicação do teste qui-quadrado os resultados foram agregados para que cada cela (número de semente germinada em cada caixa gerbox, pelos dias agregados), contivesse um número razoável de observações (mínimo em torno de 5).

A abreviatura p será utilizada para probabilidade de significância, quando expressa no seu valor numérico.

Os resultados dos testes de independência estão apresentados na Tabela 2.

TABELA 2. Resultados dos testes de independência da taxa de germinação na influência da caixa gerbox: probabilidade de significância (p) para cada combinação dos tratamentos de luz e temperatura.

| | Temperaturas | | | | |
|----------------------|--------------|-------|-------|-------|-------|
| | 20°C | 25°C | 30°C | 35°C | 40°C |
| Luz branca constante | >0,50 | ≈0,07 | >0,75 | >0,50 | >0,75 |
| Escuro constante | >0,50 | ≈0,11 | >0,50 | >0,25 | >0,50 |

A probabilidade de significância global é 0,52, considerando-se como referência a menor probabilidade de significância individual 0,07. Foi obtida através de:

$$(1 - p^*)^{10} = 1 - p \quad , \quad \text{sendo:}$$

p^* = mínimo da probabilidade individual e

p = probabilidade de significância global.

Pela análise dos resultados, observa-se que não

foi rejeitada a hipótese nula de que a taxa de germinação independe das caixas gerbox.

Como as diferenças não foram suficientes para rejeitar a hipótese nula, os resultados das 4 caixas gerbox para cada tratamento foram agregadas, passando-se para a análise das influências da temperatura e luz.

Os resultados dos experimentos com luz branca constante e escuro constante, cruzados com 5 níveis de temperatura (20°C, 25°C, 30°C, 35°C e 40°C) estão apresentados na Tabela 3, com os dados agregados para as caixas gerbox.

TABELA 3. Número de sementes germinadas de um total de 100, de Myroxylon peruiferum em luz branca e escuro constantes, nas temperaturas de 20°C, 25°C, 30°C, 35°C e 40°C.

| | | Dias de germinação | | | | | | | | | Total de germinação |
|----------------------------|------|--------------------|----|----|----|----|----|---|---|----|---------------------|
| | | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | |
| Luz branca constante | 20°C | 8 | 1 | 0 | 20 | 4 | 4 | 5 | 6 | 5 | 53 |
| | 25°C | 10 | 9 | 18 | 24 | 15 | 9 | 0 | 0 | 0 | 85 |
| | 30°C | 2 | 10 | 30 | 21 | 14 | 0 | 0 | 3 | 4 | 84 |
| | 35°C | 3 | 14 | 17 | 25 | 14 | 24 | - | | | 97 |
| | 40°C | 0 | 0 | 0 | 23 | 28 | 6 | 3 | | | 60 |
| Escuro constante | 20°C | 4 | 7 | 6 | 20 | 2 | 5 | 3 | 6 | 3 | 56 |
| | 25°C | 5 | 22 | 30 | 19 | 16 | 7 | 0 | 0 | 0 | 99 |
| | 30°C | 8 | 26 | 12 | 14 | 11 | 12 | 1 | 0 | 2 | 87 |
| | 35°C | 9 | 17 | 36 | 17 | 19 | 0 | - | | | 98 |
| | 40°C | 0 | 0 | 0 | 35 | 20 | 12 | 2 | - | | 69 |

-: significa que o experimento foi encerrado.

Devido a certas dificuldades técnicas de coleta do material, não foi possível realizar todos os experimentos com sementes escolhidas aleatoriamente de um mesmo lote. No entanto, para cada temperatura, as sementes são provenientes da mesma partida. Isto vai exigir hipóteses adicionais mais tarde, já que o efeito da temperatura pode estar confundido com as variações fisiológicas das sementes.

Como o efeito da temperatura está confundido com as variações fisiológicas das sementes, foi testado o efeito da luz para cada temperatura separadamente. Foi feito um teste unilateral por acreditar que, se o efeito da luz existir, ele deverá ser no sentido de diminuir a velocidade da germinação.

A estatística utilizada para 25°C a 35°C, foi a de Wilcoxon (Lehmann, 1975). Já para as temperaturas de 20°C e 40°C, foi utilizada a estatística de Wilcoxon modificado para dados censurados (Gehan, 1965), devido ao grande número de sementes não germinadas. O teste estatístico foi para testar a hipótese nula: não há diferença entre efeito de luz e escuro, contra a hipótese alternativa: no escuro, a germinação é mais rápida.

Pela análise dos resultados da Tabela 4, observa-se que para as temperaturas de 25°C e 35°C foi rejeitada a hipótese nula de que não há diferença entre o efeito de luz e escuro (a uma probabilidade de significância bastante baixa (0,0025 e 0, respectivamente). Aceita-se a hipótese alternativa de que as sementes germinam mais rapidamente no escuro.

TABELA 4. Teste da influência da luz para as temperaturas de 20°C, 25°C, 30°C, 35°C e 40°C.

| Temperaturas | 20°C | 25°C | 30°C | 35°C | 40°C |
|------------------------------------|-------|--------|------|----------------|--------|
| Probabilidade de significância (p) | 0,18* | 0,0025 | 0,09 | $\leq 10^{-4}$ | 0,059* |

* : Wilcoxon modificado para dados censurados.

Para a temperatura de 40°C ($p = 0,059$) e a 30°C ($p = 0,09$), a hipótese nula não poderia ser rejeitada ao nível de significância de 5%, mas seria rejeitada ao nível de 10%. No entanto, como para as temperaturas de 25°C e 35°C, as probabilidades de significância foram bastante baixas, é razoável supor que o fator luz é importante para 30°C e 40°C. Verifica-se que não se pode aceitar a hipótese de igualdade de germinação para luz e escuro ($p = 0,18$).

Pelos resultados, observa-se que o efeito da luz não é o mesmo para todas as temperaturas.

Para verificar o efeito da temperatura, considera-se a hipótese adicional de que os diferentes lotes de sementes usados não influenciam a velocidade da germinação.

Pela Tabela 3, verifica-se que as temperaturas de 20°C e 40°C não são apropriadas para a germinação de sementes, uma vez que são os tratamentos em que as respostas são menores tanto para a luz quanto para o es

curo. A verificação da germinação à temperatura de 20°C foi interrompida no 10º dia e à temperatura de 40°C no 8º dia. Observa-se que a taxa de germinação é baixa, mostrando-se demorada e lenta.

O efeito da temperatura de 25°C a 35°C será verificada separadamente. O teste de interesse foi para testar a hipótese nula: não existe diferença entre as temperaturas, contra a hipótese alternativa: existe (m) alguma(s) temperatura(s) que tende(m) a acelerar a germinação. Foi utilizado o teste estatístico K* (Lehmann, 1975).

Tanto para a luz branca constante, como para o escuro constante, não foi rejeitada a hipótese nula ($p > 0,50$ e $p = 0,18$, respectivamente). Portanto, não se pode afirmar que a taxa de germinação a 25°C, 30°C e 35°C sejam diferentes.

Este resultado de certa forma, mostra que não foi irreal a hipótese realizada anteriormente de que os lotes de sementes são aproximadamente iguais. Se fossem diferentes, seria difícil de acreditar que estas diferenças se combinassem aleatoriamente com as diversas temperaturas, para darem germinações semelhantes. Já, em temperaturas de 20°C e 40°C, as diferenças em relação ao comportamento das sementes em temperaturas de 25°C, 30°C e 35°C são suficientemente grandes para se afirmar que as temperaturas de 20°C e 40°C são realmente inadequadas para a germinação.

3. Efeito da lixiviação em água corrente

O experimento da lixiviação foi realizado na temperatura de 25°C, em luz branca e escuro constantes.

Para verificar se o fator caixa gerbox é importante dentro de cada tratamento, foi feito um teste análogo aquele utilizado no experimento anterior.

Os resultados dos testes de independência estão apresentados na Tabela 5.

TABELA 5. Resultados do teste de independência da taxa de germinação no efeito da caixa gerbox : probabilidade de significância (p).

| | Tratamentos | |
|----------------------|-------------|---------------|
| | Lixiviado | Não lixiviado |
| Luz branca constante | 0,95 | 0,048 |
| Escuro constante | 0,75 | 0,0081 |

Pelos resultados da Tabela 5, verifica-se que foi rejeitada a hipótese nula de que não há influência das caixas gerbox, por causa das probabilidades de significância baixas encontradas para sementes não lixiviadas.

No entanto, uma análise mais detalhada da Tabela 6, nos mostra que este efeito existe devido: 1. caixa gerbox a (não lixiviado, luz branca) nos 5º e 6º dias

de germinação; 2. caixa gerbox a (não lixiviado, escuro) nos 5º e 6º dias de verificação; e 3. caixa gerbox b (não lixiviado, escuro) nos 3 e 4º dias de verificação da germinação. Nota-se nestes três casos que estas diferenças ocorreram porque num certo dia houve um número muito grande (ou pequeno) de germinação e no dia seguinte ocorreu ao contrário.

TABELA 6. Germinação de sementes não lixiviadas de um total de 100, de Myroxylon peruiferum, sob luz branca e escuro constantes, na temperatura de 25°C.

| | | Dias de germinação | | | | | | | | Total de germinação |
|---------------------|---|--------------------|----|-----|-----|----|---|---|---|---------------------|
| | | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | |
| Luz branca | a | 2 | 4 | 6 | 11* | 0* | 2 | 0 | 0 | 25 |
| | b | 2 | 1 | 7 | 4 | 7 | 2 | 0 | 0 | 23 |
| | c | 3 | 3 | 5 | 3 | 3 | 2 | 3 | 2 | 24 |
| | d | 2 | 3 | 2 | 6 | 5 | 2 | 2 | 2 | 24 |
| Total | | 9 | 11 | 20 | 24 | 15 | 8 | 5 | 4 | 96 |
| Escuro constante | a | 1 | 5 | 8 | 0* | 9* | 1 | 0 | 0 | 24 |
| | b | 3 | 1* | 10* | 5 | 4 | 2 | 0 | 0 | 25 |
| | c | 2 | 6 | 11 | 2 | 2 | 1 | 1 | 0 | 25 |
| | d | 1 | 7 | 3 | 9 | 5 | 0 | 0 | 0 | 25 |
| Total | | 7 | 19 | 32 | 16 | 20 | 4 | 1 | 0 | 99 |

Como no experimento anterior, do efeito da luz e da temperatura (Tabela 3), não havia sido rejeitada esta hipótese de independência, é interessante comparar os dados atuais encontrados neste experimento, com aqueles do experimento anterior. Na Tabela 7, estão apresentados os dados do experimento anterior (experimento 2) e do atual experimento (experimento 1) agregados por caixa gerbox e acumulativos. A semelhança é quase total, e como foram realizados com caixas diferentes, pode-se concluir que não existe influência de caixa gerbox.

TABELA 7. Número de sementes germinadas de um total de 100, de Myroxylon peruiferum para sementes não lixiviadas. Resultado do experimento do efeito da luz e da temperatura. Luz branca e escuro constantes.

| | Dias de germinação | | | | | | | |
|---------------------------------------|--------------------|----|----|----|----|----|----|----|
| | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| Experimento 1 Luz branca constante | 9 | 29 | 49 | 66 | 79 | 87 | 92 | 96 |
| Experimento 2 Luz branca constante | 10 | 19 | 37 | 61 | 76 | 85 | - | |
| Experimento 1 Escuro constante | 7 | 26 | 58 | 74 | 94 | 98 | 99 | 99 |
| Experimento 2 Escuro constante | 5 | 27 | 57 | 76 | 92 | 96 | - | |

- : significa que o experimento foi encerrado.

Não se rejeitando a hipótese nula de influência das caixas gerbox na taxa de germinação de sementes, os resultados das 4 caixas gerbox **a**, b, c, d foram agregados para se analisar a influência de lixiviação para luz branca e escuro constante (Tabela 8).

TABELA 8. Efeito da lixiviação, em água corrente, na germinação de sementes de Myroxylon peruiferum. Luz branca e escuro constantes, a 25°C.

| | Dias de germinação | | | | | | | | Não germinado |
|----------------------|--------------------|----|----|----|----|----|---|---|---------------|
| | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | |
| Lixiviado | | | | | | | | | |
| Luz branca constante | 11 | 16 | 13 | 14 | 11 | 24 | 5 | 2 | 4 |
| Escuro constante | 8 | 16 | 29 | 12 | 15 | 11 | 4 | 3 | 2 |
| Não lixiviado | | | | | | | | | |
| Luz branca constante | 9 | 11 | 20 | 24 | 15 | 8 | 5 | 4 | 4 |
| Escuro constante | 7 | 19 | 32 | 16 | 20 | 4 | 1 | 0 | 1 |

Os resultados das sementes lixiviadas em água corrente, foram verificados através da análise de variância, possibilitando a estimativa do efeito de interação entre os dois fatores (lixiviação e luz). Este tratamento estatístico não foi utilizado, nos outros resultados de germinação, tanto pelo elevado número de dados

censurados, como pelo fato das sementes não virem do mesmo lote.

Considerou-se que as sementes não germinadas, germinaram no 10º dia. A escolha destes valores, embora arbitrários, não é de grande importância neste caso, seja pela baixíssima porcentagem de valores censurados (11 em 400). Desta forma, os resultados sofreriam pequenas modificações quaisquer que fossem os valores imputados, desde que eles não fossem muito diferentes de 10. Os resultados da análise de variância serão apresentados na Tabela 9.

TABELA 9. Tabela da análise de variância do experimento fatorial lixiviação (lixiviadas e não lixiviadas) x luz (luz e escuro constantes).

| Fonte de variação | Soma de quadrados | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F |
|-------------------|-------------------|--------------------|----------------|---------|
| Lixiviação | 6,76 | 1 | 6,76 | 1,88 |
| Luz | 28,09 | 1 | 28,09 | 7,82 |
| Interação | 2,25 | 1 | 2,25 | 63 |
| Resíduo | 1420,34 | 396 | 3,59 | |
| 1º Total | 1457,44 | 399 | | |

Os resultados da Tabela 9, mostram claramente que a lixiviação não tem efeito com probabilidade de sig

nificância de 0,7 (fator principal) e de 0,43 (interação com luz), Já o fator luz é altamente significativo ($p = 0,005$), e sua presença é no sentido de diminuir a velocidade de germinação.

Ensaio Biológicos

Os ensaios biológicos foram realizados para observar o efeito do extrato das sementes e dos envoltórios das sementes na germinação de sementes de alface.

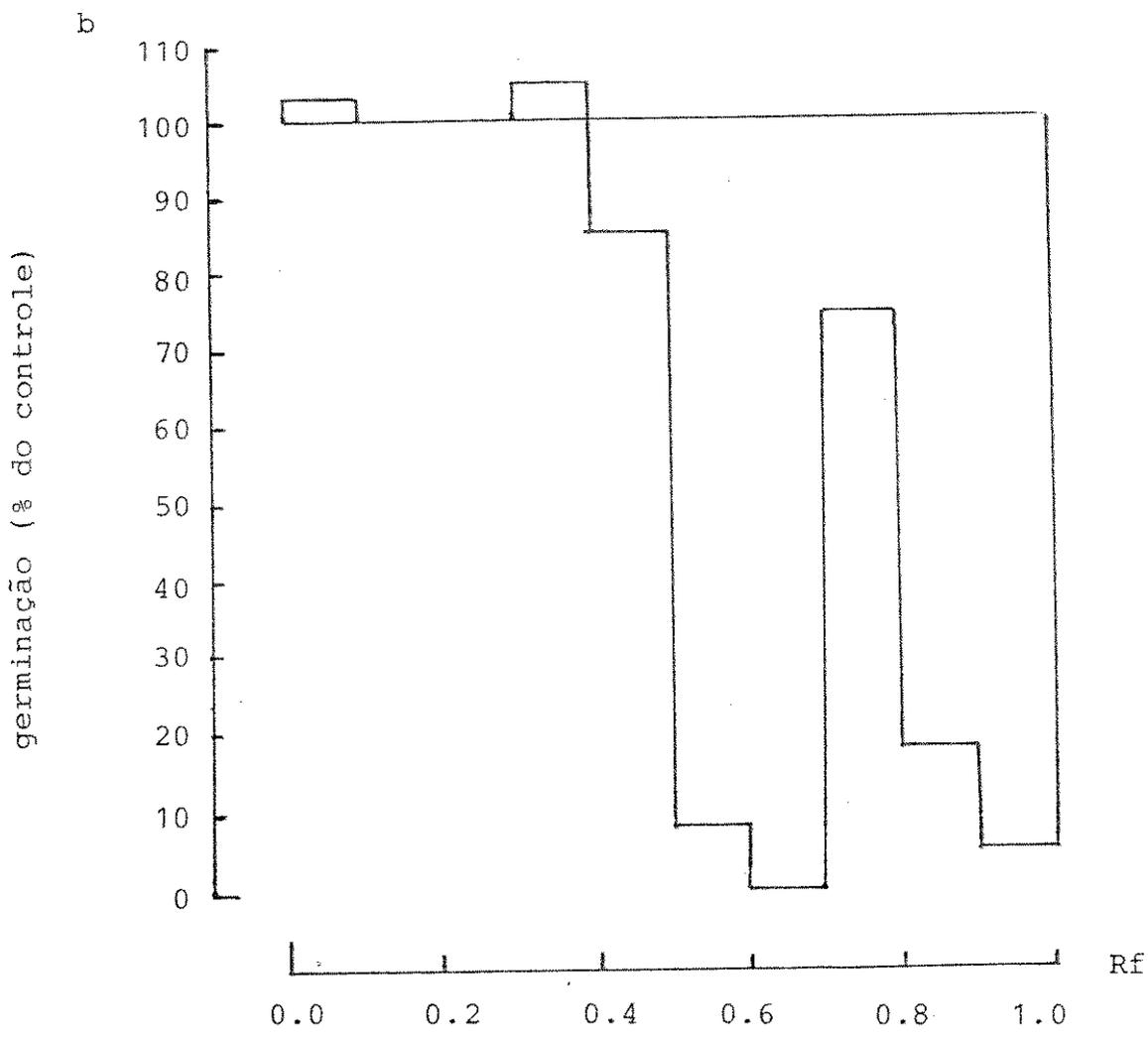
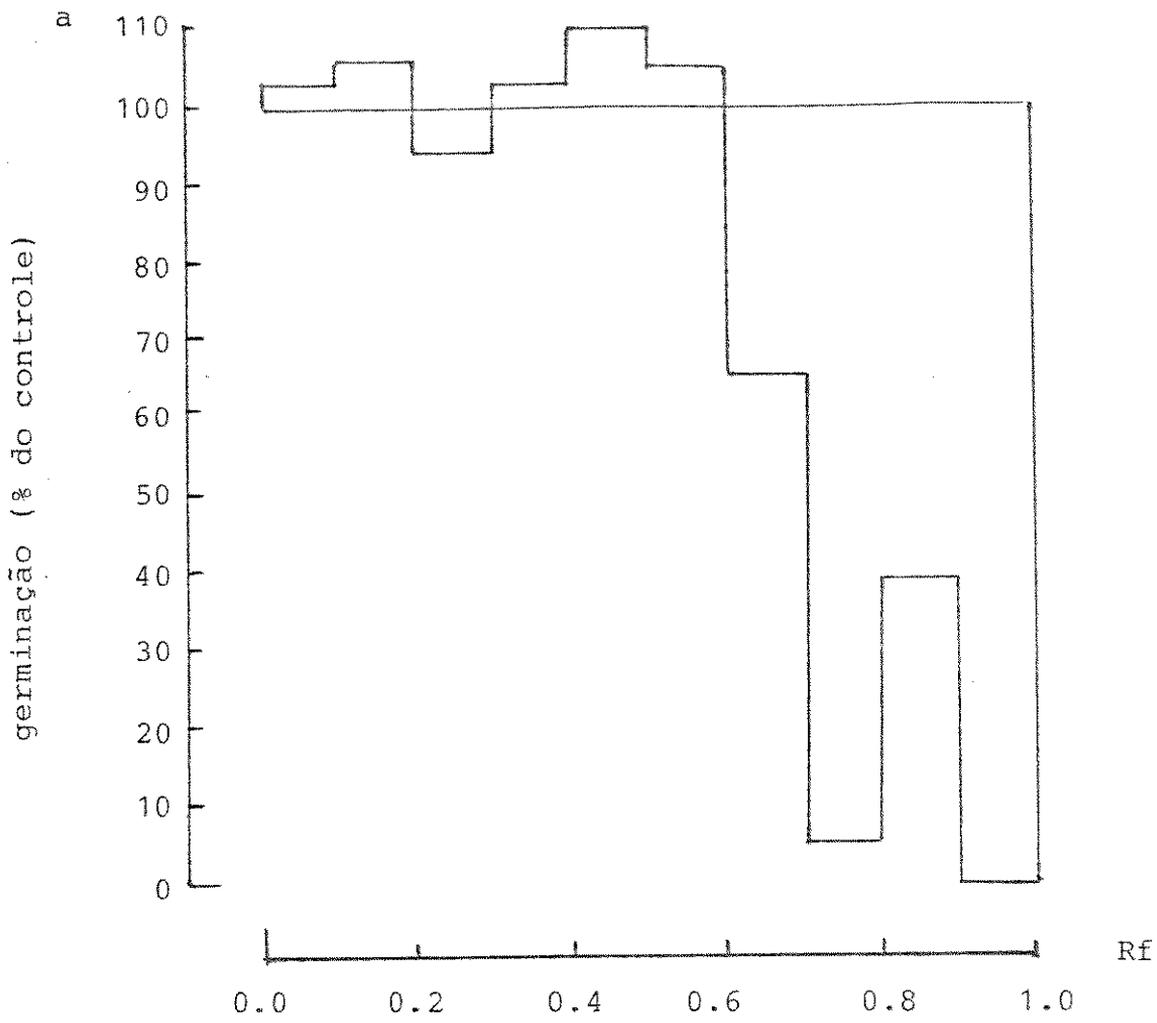
4. Bioensaio de germinação de sementes de alface

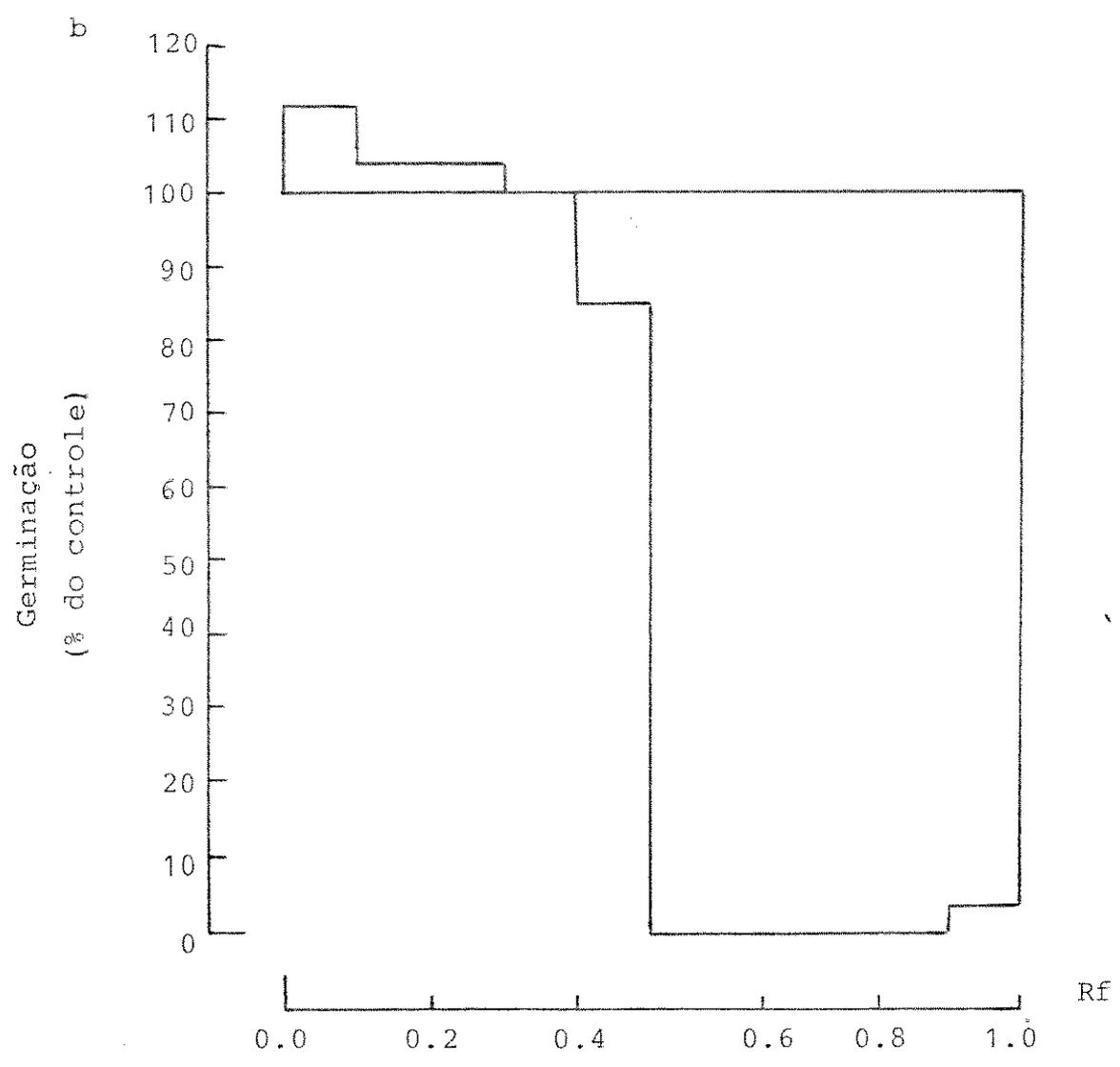
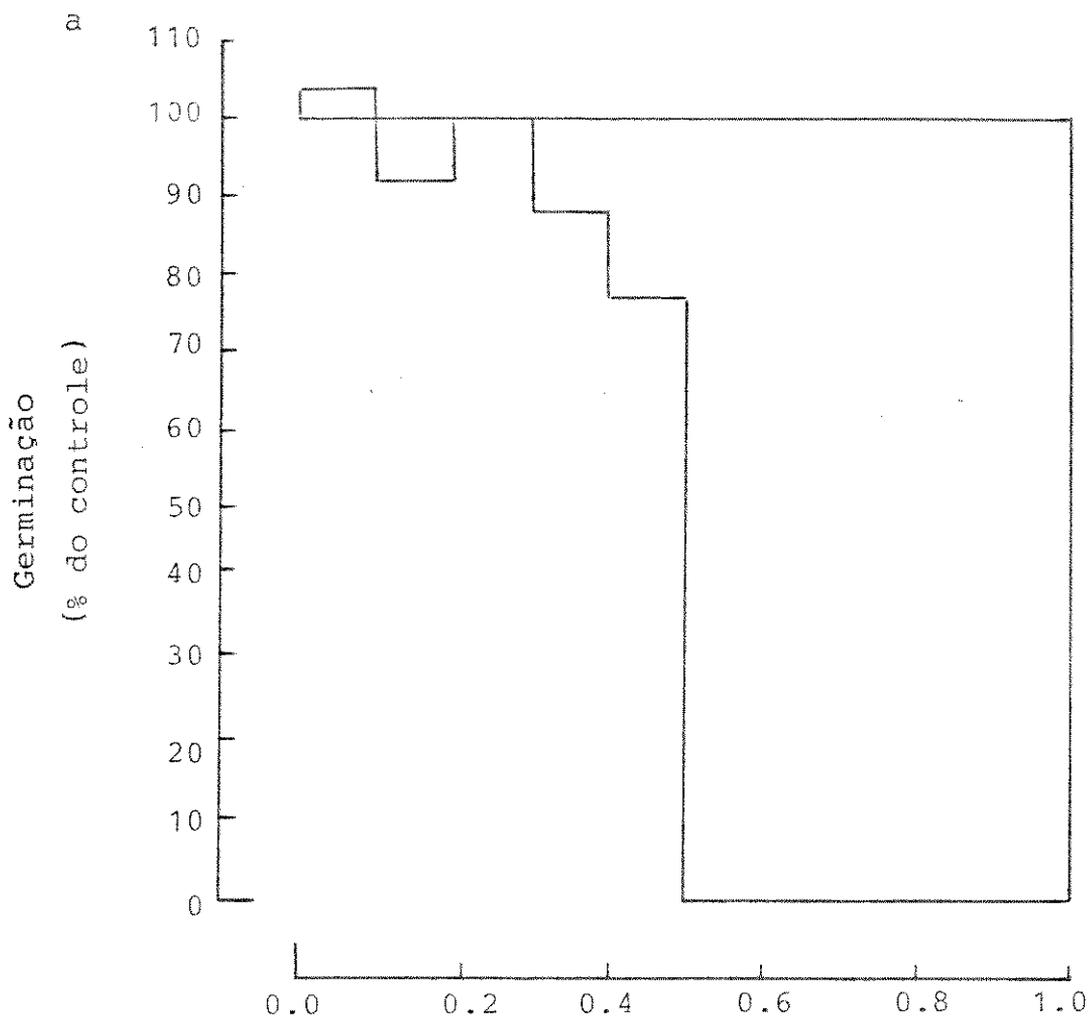
Os resultados dos bioensaios estão apresentados nas Figs. 3 e 4 e nas Tabelas (vide Apêndice II).

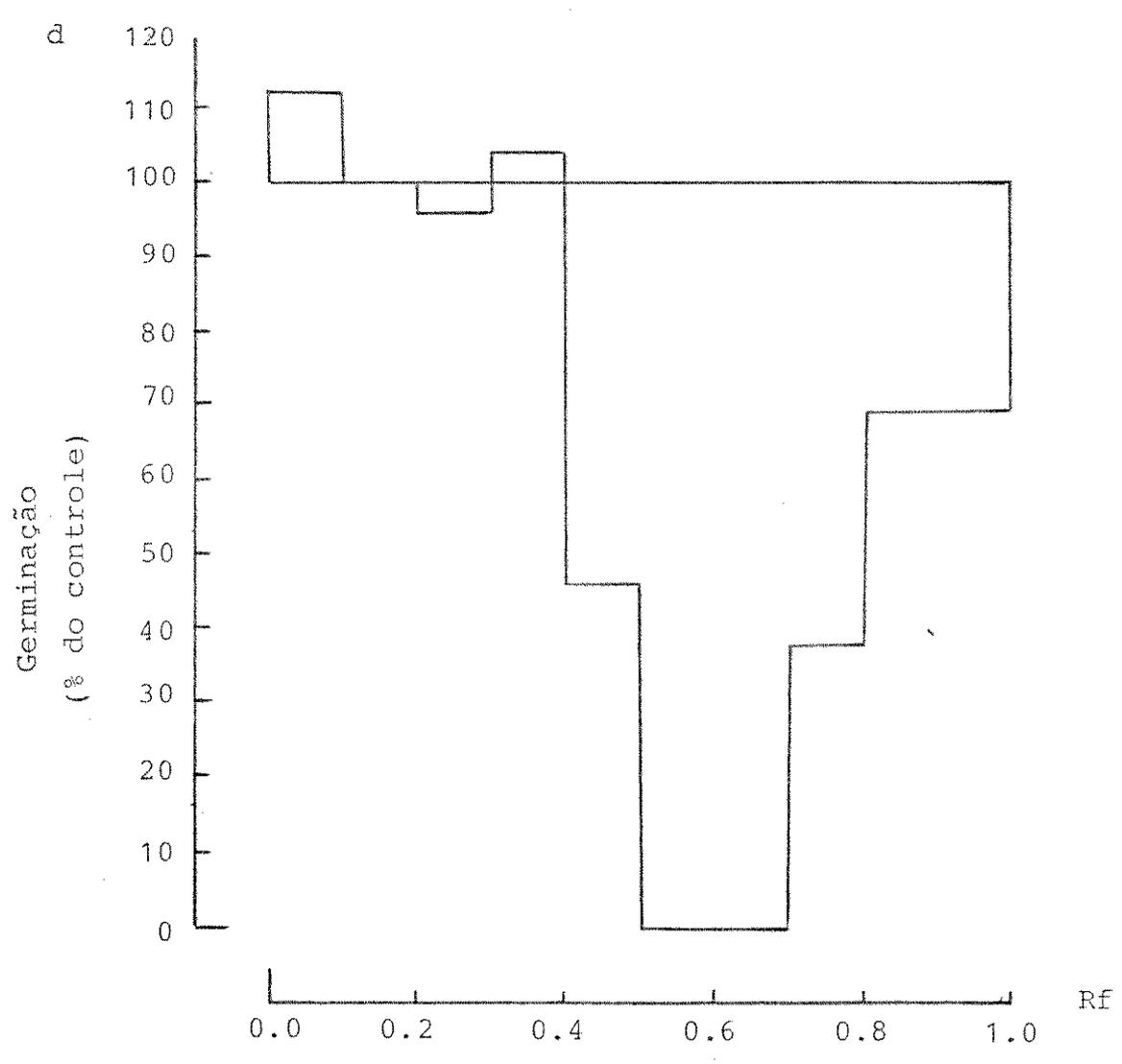
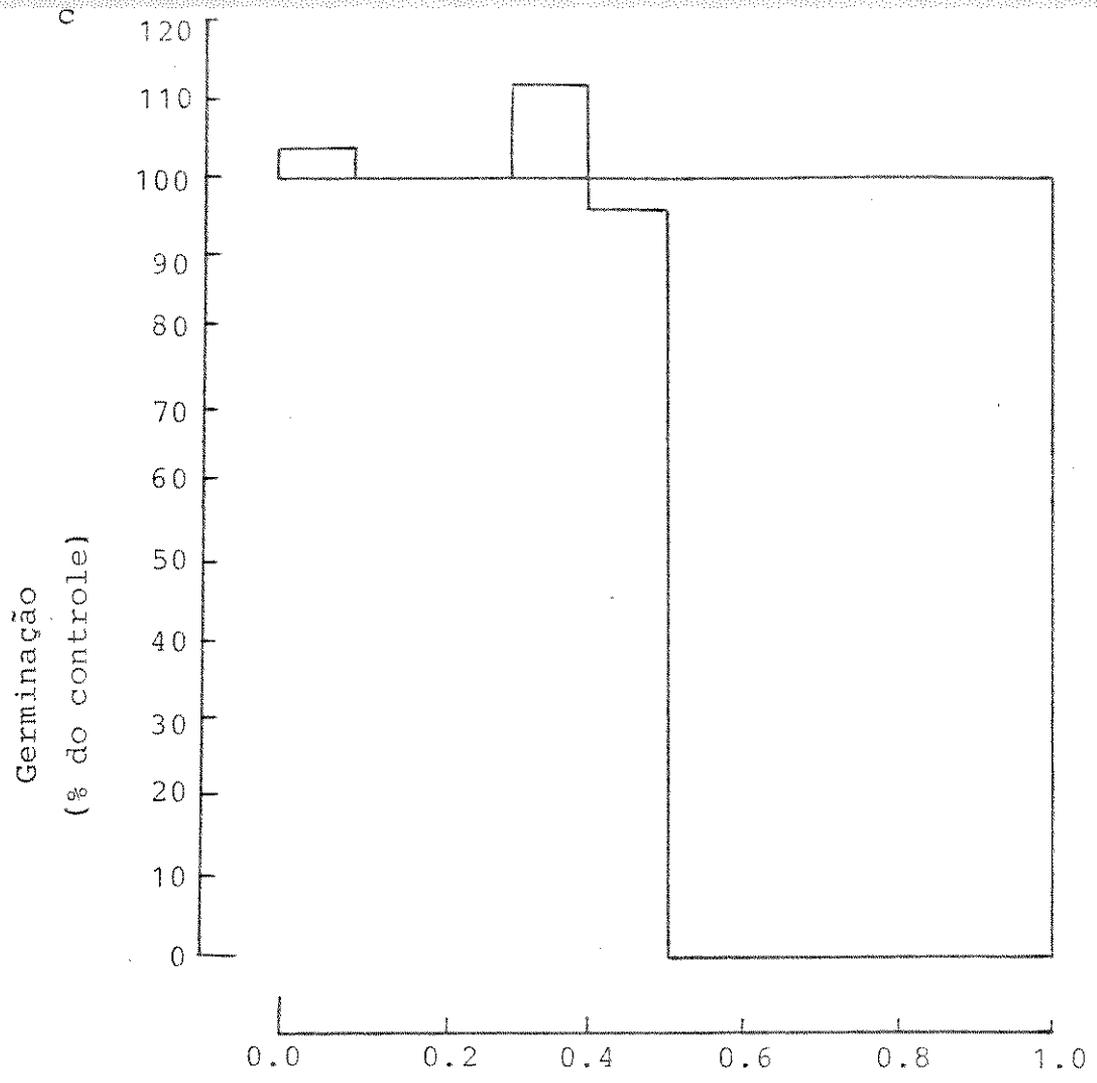
Verifica-se na fração orgânica dos envoltórios de sementes e das sementes um padrão similar de inibição, sugerindo a presença de substâncias inibidoras.

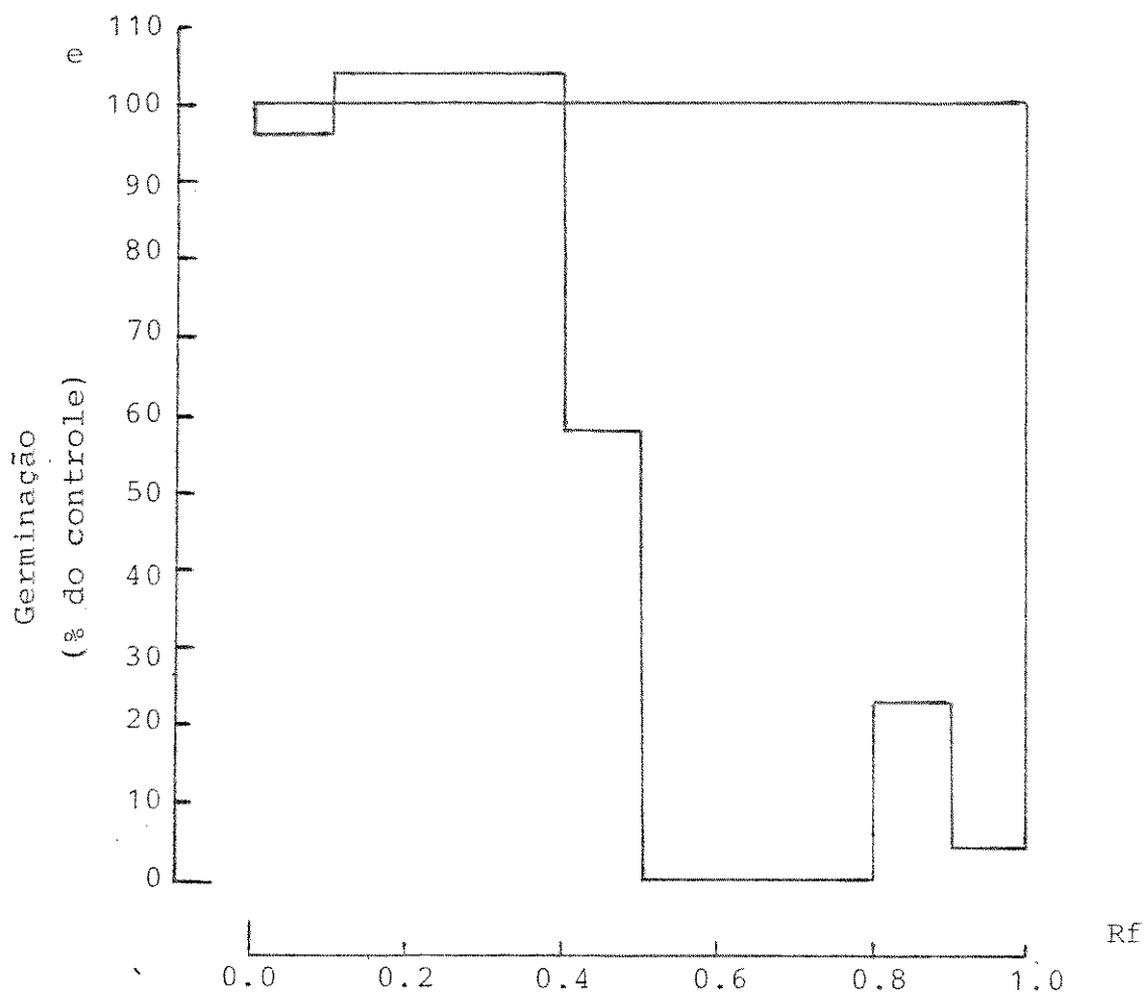
Fitoquímica

Após verificar a existência da(s) substância(s) inibidora(s) nos envoltórios de sementes e nas sementes, passou-se para o estudo químico do inibidor. Foi feita a tentativa de isolar, purificar e caracterizar essa substância.









5. Detecção, separação, isolamento e purificação da substância inibidora

Primeiramente, para verificar se o inibidor que ocorre na semente é o mesmo do envoltório de semente, foram testados ambos os extratos. Foram testados os extratos do lote 1 e 2 para investigar se nesse período de armazenamento (um ano) essa substância inibidora sofreria alguma alteração.

Os extratos foram cromatografados em placas preparativas com sílica fluorescente, usando como solvente hexano e clorofórmio 75:25. Observou-se que os extratos de sementes e envoltório de sementes dos lote 1 e lote 2 apresentavam as mesmas manchas quando reveladas em luz ultra-violeta.

A diferença observada entre extratos de sementes e de envoltórios, foi a de que nos envoltórios os compostos pareciam menos concentrados. Nessa cromatoplaça, observaram-se quatro regiões que apresentavam fluorescência. A região inibidora, observada em luz ultra violeta apresentou-se como uma mancha grande e azul-escuro, que se situava na parte superior da placa.

A sílica que constituía essa região da placa, foi raspada e eluída. Foram feitas várias placas de cromatografia para acumular uma quantidade suficiente da substância. Foi feito um espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN¹H), usando como solvente tetracloreto de carbono. Pelo resultado do espectro, a amostra (faixa azul) mostrou ser impura. Pelo espectro, preliminarmente, concluiu-se que não se tratava de

substância aromática.

O extrato utilizado foi de sementes do lote 2.

Pelos resultados dos bioensaios nas Figs. 3 e 4, observa-se que há uma faixa larga que abrange vários Rf em que ocorre a inibição. Essa faixa inibitória apresentava fluorescência azul quando em placa de sílica - gel G. Tanto nessas várias faixas de Rf como na mancha azul-escura, ficou demonstrado que a separação dos compostos não se efetuava satisfatoriamente ou que existiria mais de uma substância com poder de inibição. Foram experimentadas diversas fases móveis, com diferentes polaridades, a fim de se obter uma boa separação, o que não foi conseguido.

Devido a essa dificuldade de separação dos compostos, somente através de cromatografia em camada delgada e cromatografia preparativa contínua, foi feita então a cromatografia do extrato em coluna. Desta coluna, foram coletadas 27 frações, reunidas em 3 grupos de F1-9, F13-15 e F19 a 27.

A cromatografia em camada delgada, utilizando como fase móvel, clorofórmio e metanol 2,5:9,75(v/v), revelou que a substância inibidora estava nas frações de 13-15. Essa F13-15 foi cromatografada em placa preparativa com desenvolvimento contínuo no solvente hexano : clorofórmio 75:25. Dessa placa, obtiveram-se 4 faixas. A faixa 1 relativa à mancha azul escura foi a que inibiu a germinação de sementes. Como ainda continuava com mais de uma substância, foi feita uma purificação da faixa 1. Essa purificação foi feita em cromatografia prepa

rativa, utilizando como fase móvel; diclorometano: metanol 99:1(v/v). Após essa purificação, foi obtida apenas uma mancha livre de outras substâncias em cromatografia em camada delgada com vários sistemas de solventes. Essa mancha se mostrou única, quando também revelada em UV, vapores de iodo e revelador de terpenos e esteróides.

A identificação foi feita através de métodos físicos espectrais como RMN¹H (E₁), infravermelho (E₂), e ultravioleta (E₃), comprovando-se desta maneira que se tratava de cumarina (vide E₁, E₂, E₃ no Apêndice I).

O espectro de absorção no infravermelho, do padrão e do inibidor (E₂), mostra que as bandas coincidem o que definitivamente prova que o inibidor de Myroxylon peruiferum é cumarina (Fig. 5).

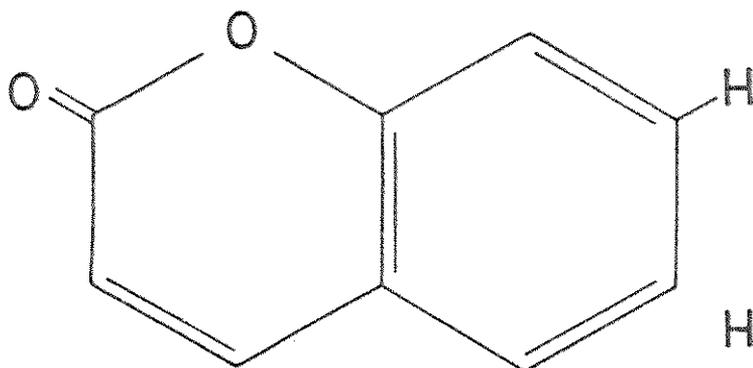


Figura 5. 2H-1-benzo-piran-2-ona (cumarina): inibidor de natureza fenólica.

6. Influência da lixiviação com acetona e efeito de cumarina

Após a constatação da presença da substância

inibidora, foi testada se a lixiviação das sementes de M. peruiferum com acetona afetaria o nível do inibidor de semente, alterando assim a germinação. Do mesmo modo, foi testado se a cumarina exógena modificaria o padrão de germinação.

As sementes utilizadas para este experimento foram escolhidas aleatoriamente de um mesmo lote.

As sementes dos tratamentos de lixiviação com acetona durante 5, 10 e 15 minutos e sementes em solução de 10^{-3} e 10^{-4} M de cumarina e o controle, foram colocados para embeber inicialmente em água. Após 24 horas, as sementes foram transferidas para seus respectivos tratamentos.

Foi feito um teste para verificar a influência das caixas gerbox sobre a germinação, dentro de cada tratamento. Foi feito um teste análogo aquele utilizado no experimento do efeito da luz e da temperatura.

Os resultados dos testes de independência estão apresentados na Tabela 11.

TABELA 11. Resultados do teste de independência da taxa de germinação no efeito da caixa gerbox = probabilidade de significância para cada combinação dos tratamentos de acetona, cumarina e controle. (Luz branca constante).

| Tratamentos | | | Efeito da cumarina | | Controle |
|------------------------|---------|---------|--------------------|-------------|----------|
| Lixiviação com acetona | | | 10^{-3} M | 10^{-4} M | |
| 5 min. | 10 min. | 15 min. | | | |
| 0,16 | 0,0085 | 0,50 | 0,75 | 0,065 | 0,50 |

A probabilidade de significância global é 0,05 considerando-se como referência a menor probabilidade de significância individual 0,0085.

Embora a probabilidade de significância global = 0,05 possa indicar uma possível influência das caixas gerbox, foi rejeitada tal hipótese porque as probabilidades de significância individual, com exceção de sementes lixiviadas com acetona durante 10 minutos e solução de 10^{-4} M de cumarina, são bastante altas.

Dada a não rejeição da hipótese de igualdade entre as caixas gerbox, os resultados foram agregados para cada tratamento. Serão analisados os efeitos da lixiviação com acetona e os efeitos da solução de cumarina.

TABELA 12. Efeito da lixiviação com acetona e efeito de cumarina na germinação de sementes de Miroxylon peruiferum sob luz branca, na temperatura de 25°C.

| | Dias de germinação | | | | | | Total de germinação |
|----------------------|--------------------|----|----|----|----|----|---------------------|
| | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | |
| Controle | 12 | 11 | 11 | 7 | 17 | 15 | 73 |
| Acetona 5 min. | 0 | 23 | 20 | 23 | 26 | 20 | 92 |
| Acetona 10 min. | 0 | 34 | 18 | 20 | 9 | 8 | 89 |
| Acetona 15 min. | 0 | 29 | 13 | 30 | 17 | 3 | 92 |
| Cumarina 10^{-3} M | 5 | 11 | 13 | 18 | 14 | 16 | 77 |
| Cumarina 10^{-4} M | 7 | 17 | 14 | 21 | 7 | 16 | 82 |

Primeiramente, foi feita uma comparação entre todos os tratamentos. Foi utilizada a estatística de teste qui-quadrado (Lehmann, 1975). Testando a hipótese nula: não há diferença entre os tratamentos contra a hipótese alternativa: pelo menos um tratamento é diferente.

Como a probabilidade de significância encontrada é bastante baixa ($p < 10^{-3}$), foi rejeitada a hipótese nula. Pode-se afirmar que os tratamentos de lixiviação com acetona durante 5, 10 e 15 minutos, a solução de 10^{-3} M e 10^{-4} M de cumarina e o controle, não apresentavam efeitos iguais.

Agora resta verificar se a lixiviação com acetona acelera a germinação.

Pela Fig. 6 observa-se que a lixiviação durante 5, 10 e 15 minutos tende a dar respostas semelhantes na germinação. Para testar essas respostas, foi utilizado o teste K^* (Lehmann, 1975). Testou-se a hipótese nula: não há diferença entre a lixiviação durante 5, 10 e 15 minutos, contra a hipótese alternativa: pelo menos um desses tempos acelera ou diminui a germinação com maiores intensidades.

Não foi rejeitada a hipótese nula, encontrando-se um alto valor de probabilidade de significância ($p > 0,50$). Aceita-se a hipótese que entre eles, o tempo de lixiviação não afeta a taxa de germinação.

Se for rejeitada a hipótese de que a acetona não influencia a germinação, comparando o controle com acetona 5 minutos, serão rejeitadas também para 10

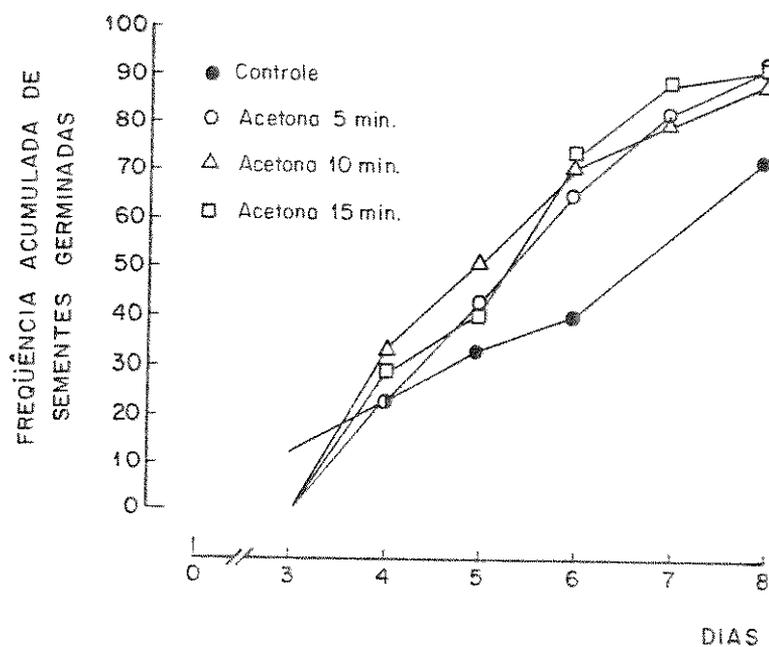


Figura 6. Frequência acumulada de sementes germinadas no decorrer dos dias para o tratamento de lixiviação com acetona e controle.

e 15 minutos. Portanto, foi comparado somente o controle e a lixiviação com acetona 5 minutos. Essa comparação foi realizada através do teste de Wilcoxon (Lehmann, 1975).

Reiterando a hipótese nula acima, foi testada: não há diferença entre acetona 5 min. e controle contra a hipótese alternativa: a germinação tende a ser mais rápida com lixiviação durante 5 min.

Como a probabilidade de significância encontrada foi bastante baixa ($p = 0,0055$), aceita-se a hipótese de que a acetona 5 min. acelera a germinação.

O efeito da cumarina, comparado com o controle foi testado, utilizando-se o teste K^* (Lehmann, 1975). Foi testada a hipótese nula: não há diferença entre os tratamentos contra a hipótese alternativa: um tende a dar respostas mais baixas, o outro mais altas.

Não foi rejeitada a hipótese nula ($p = 0,27$). Também pela Fig. 7, não há evidências de que algum tratamento com cumarina, promova ou iniba o processo de germinação.

Caracterização e Quantificação da Cumarina

7. Cromatografia gás-líquido da cumarina que ocorre em sementes de M. peruiferum

Pela cromatografia gás-líquido, comprovou-se mais uma vez a substância inibidora, como sendo cumarina.

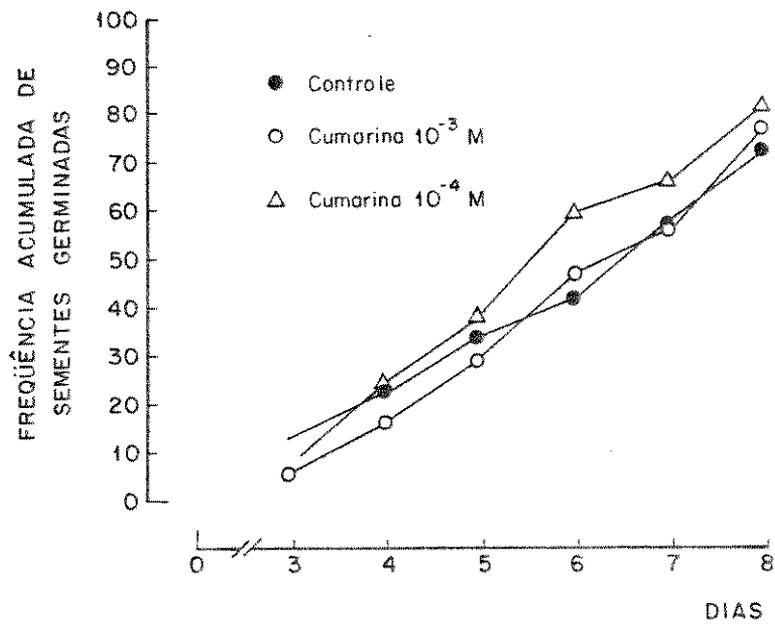


Figura 7. Frequência acumulada de sementes germinadas no decorrer dos dias para soluções de cumarina e controle.

A coluna de vidro (SE-30) operou a 190°C obtendo-se uma boa separação das outras substâncias presentes. Obteve-se o pico da cumarina padrão com um tempo de retenção relativamente curto de 2 minutos e 20 s. A cumarina padrão foi utilizada na concentração de 1000 ug/ml.

TABELA 13. Quantificação de cumarina na acetona das sementes lixiviadas durante 5, 10 e 15 minutos

| Acetona | Cumarina mg cumarina/g Peso seco |
|------------------------|-------------------------------------|
| Lixiviação por 5 min. | 4,38 |
| Lixiviação por 10 min. | 5,96 |
| Lixiviação por 15 min. | 9,84 |

TABELA 14. Quantificação de cumarina em sementes não embebidas, e sementes embebidas por 24, 48, 72, 96 e 120 horas e exsudada no papel substrato

| | mg cumarina/g Peso seco | | | | | |
|-----------------|-------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | Período de embebição | | | | | |
| | 0 h. | 24 h. | 48 h. | 72 h. | 96 h. | 120 h. |
| Semente intacta | 130,20 | 105,16 | 109,94 | 130,23 | 133,46 | 132,18 |
| Cotilédone | 52,03 | 23,47 | 26,19 | 22,92 | 25,88 | 30,70 |
| Embrião | 65,92 | 90,16 | 112,11 | 116,27 | 110,84 | 120,12 |
| Papel substrato | | 3,70 | 4,20 | 6,40 | 14,01 | 15,13 |

No experimento de lixiviação com acetona a quantidade de cumarina extraída das sementes aumenta com o aumento do tempo de lixiviação.

Na semente intacta, ocorre uma redução dos níveis de cumarina no início da embebição (24 e 48 h) estabilizando posteriormente até o final do experimento em níveis semelhantes ao da semente não embebida. Quanto aos cotilédones, há uma queda nos níveis de cumarina durante a embebição, mantendo-se porém a níveis constantes durante todo o processo. Com relação aos embriões observa-se comportamento oposto: elevam-se os níveis de cumarina com o tempo de embebição. Também, quanto maior for o tempo de embebição, ou seja, maior o tempo de contato entre sementes e papel substrato, maior foi a concentração de cumarina exsudada das sementes.

V. DISCUSSÃO

O primeiro passo que ocorre no processo de germinação é a absorção de água pela semente. A embebição dos envoltórios de sementes e das sementes de cabriúva, foi feita separadamente, para uma comparação com a embebição dos frutos.

Pela similaridade das curvas de embebição do fruto e da semente, observa-se que a estrutura dos envoltórios das sementes não causa impedimento à entrada de água, mostrando-se bastante permeável. Também, apesar da semente e do fruto serem oleaginosos, devido à presença de uma resina, a composição química dessas estruturas parece não causar grandes diferenças na permeabilidade à água.

Quando a semente seca é colocada em contato com a água, ativam-se processos metabólicos gerais a níveis de enzimas, taxa respiratória, hidrólise de materiais de reserva e metabolismo de proteínas, resultando como consequência o crescimento do embrião (Mayer e Poljakoff-Mayber, 1975).

No caso de sementes de cabriúva, o início de crescimento do embrião não é facilmente detectável devido à morfologia da própria semente. Para evitar dúvidas entre simples embebição do embrião e real crescimento do mesmo, a constatação da germinação foi geralmente iniciada três ou quatro dias após o início do período de embebição. Nesse estágio, a radícula das sementes já

mostraram alongamento, indício claro de início de crescimento.

Em todos os experimentos de germinação, verificou-se através de testes estatísticos, que as caixas plásticas de gerbox não interferiram nos resultados dos diferentes tratamentos.

Os fatores luz e temperatura afetam a germinação de cabriúva. A germinação é favorecida na faixa de 25°C a 35°C. As temperaturas acima e abaixo dessa faixa (20°C e 40°C) não são as mais adequadas para a germinação.

No caso de Ricinus communis, em que as sementes são bastante oleaginosas como cabriúva, a faixa de temperatura ótima parece estar entre 25°C e 40°C. Na temperatura de 25°C, essas sementes de mamona germinaram melhor no escuro. A 20°C, as sementes germinaram igualmente na luz e no escuro (Lagôa, 1983). Processo similar ao que ocorre nas sementes de cabriúva, onde a germinação nas temperaturas de 25°C a 40°C, ocorre mais rapidamente no escuro. Na temperatura de 20°C, não existe diferença para luz ou escuro.

Felippe (1981) mostrou também, para outras espécies, uma forte associação entre os efeitos de luz e temperatura. Alternância de temperaturas fez com que Cucumis anguria e Rumex obtusifolius (sementes fotoblásticas negativa e positiva, respectivamente, em temperaturas constantes), germinassem indiferentemente na luz ou escuro. A exposição das sementes de C. anguria (fotoblásticas negativas) a 0°C por 1 a 3 horas promoveu a germi

nação em luz branca e temperatura constante de 25°C.

Uma técnica bastante comum utilizada para remoção de substâncias inibidoras de germinação consiste na lavagem de sementes. Em condições naturais esse efeito é usualmente causado pelas chuvas. Os efeitos mais notáveis da temperatura se observam em sementes de espécies do deserto (Koller, 1967; Went, 1949).

Em algumas espécies, substâncias inibidoras são removidas por lixiviação.

Nas sementes de cabriúva, a lixiviação com água não teve efeito, provavelmente devido à presença de resinas e óleos (substâncias hidrófobas). No entanto, lixiviação com solvente orgânico (acetona) estimulou a germinação dessas sementes.

Extratos parcialmente purificados de sementes de cabriúva, bioensaiados pela germinação de sementes de alface, mostraram forte atividade inibidora. Isto sugeriu a presença de uma ou mais substâncias de caráter inibidor, nestas sementes de cabriúva, que poderiam estar envolvidas no processo de germinação.

Através de exaustivos processos de purificação (fracionamento dos extratos, cromatografia em placas, coluna, etc.) conseguiu-se purificar a substâncias inibidora responsável pela inibição da germinação de sementes de alface.

A identificação através de métodos físico-químicos espectrais (vide Apêndice E₁, E₂, E₃), revelou que a substância presente na semente e no envoltório da semente de M. peruiferum é a 2H-1-benzo-piran-2-ona (cumarina).

A cumarina encontra-se no fruto de Myroxylon peruiferum e parece não ocorrer em outras partes da planta. Na análise química do bálsamo de cabriúva e do óleo essencial desse bálsamo, da casca da planta (Akisue, 1971, 1972a e 1972b) e do óleo essencial da madeira do tronco (Maranduba et al., 1972) não foi localizado esse composto.

A cumarina é conhecida como inibidora natural de germinação (Mayer e Evenari, 1952).

Em M. peruiferum, embora as sementes apresentem altas concentrações de cumarina, isto aparentemente não afeta a própria germinação. A cumarina foi detectada tanto nos cotilédones como nos embriões. Além disso, nos embriões os níveis de cumarina aumentam durante o período de embebição.

O mesmo acontece nas sementes de Coumarouna odorata. Válio (1973) mostrou que essas sementes germinam facilmente apesar dos altos níveis de cumarina endógena nos cotilédones e embriões. Durante a germinação, a concentração da cumarina permanece constante nos cotilédones. No epicotilo e na radícula, há um aumento na concentração em relação à matéria seca.

Nos experimentos de germinação com sementes lixiviadas em acetona e aplicação de cumarina, as sementes foram colocadas para embeber inicialmente em água, na temperatura de 10°C. Essa embebição preliminar em condição desfavorável, foi utilizada para prevenir que ocorresse alguma interferência no processo de germinação. Foi adotado esse procedimento, baseando-se nos trabalhos

de Karssen (1976a,b) e Berrie et al., (1974). Estes autores mostraram que os hormônios em sementes não embebidas poderiam se ligar a sítios estruturais nas membranas (o que não ocorreria em membranas já hidratadas) e desta maneira produziria efeitos diferentes.

A aplicação de cumarina exógena também não afetaria a germinação.

Como a lavagem com acetona, além de remover a cumarina, estimulou a germinação, poder-se-ia pensar que este estímulo se deveu a outros fatores que não a remoção da cumarina. O aumento nos níveis de cumarina no embrião durante a embebição e aplicação exógena de cumarina parecem confirmar tal fato. Compartimentalização da cumarina em sítios não ativos na célula parece, também, não ser a explicação, uma vez que a cumarina endógena é exsudada para o meio, durante o período de incubação das sementes.

Efeito bastante conhecido da cumarina é sua atuação como desacopladora na cadeia de eletrons que ocorrem nas mitocôndrias. Poderia se pensar que as mitrocôndias desta espécie teriam algum mecanismo de proteção contra o efeito desacoplador da cumarina ou que seu efeito desacoplador não seria suficiente para impedir a germinação das sementes.

De qualquer maneira, mais estudos serão necessários para esclarecer o modo de ação da cumarina no proceso de germinação das sementes.

Quanto ao aspecto ecológico, é possível que a cumarina exsudada da semente de cabriúva em germinação,

para o solo, possa inibir a germinação e/ou crescimento de plântulas vizinhas evitando dessa maneira, a competição em sua fase inicial de crescimento.

RESUMO

Myroxylon peruiferum é uma espécie que pertence à família Leguminosae e produz sementes resinosas.

O objetivo deste trabalho, foi verificar a presença de compostos fenólicos, inibidores de crescimento, nos envoltórios das sementes e nas próprias sementes e correlacioná-las com o processo de germinação. Também, procurou-se verificar alguns fatores do meio externo que atuariam na germinação das sementes de cabriúva.

Foram estudados: a embebição dos frutos e das sementes; a influência da luz nas temperaturas de 20°C, 25°C, 30°C, 35°C e 40°C na germinação das sementes; o efeito de temperaturas constantes na germinação das sementes e o efeito da lixiviação em água corrente para luz e escuro constantes.

A atividade fisiológica do inibidor foi verificada através do bioensaios de germinação de sementes de alface. A separação isolamente e purificação do extrato foi obtida através de cromatografia em placas, coluna, reveladores, etc. A identificação química da substância inibidora foi determinada por espectroscopia em ultravioleta, infravermelho e RMN¹H, revelando constituir-se na 2H-1-benzo-piran-2-ona (cumarina). A quantificação da cumarina dos embriões e sementes durante o período de germinação foi feita através de cromatografia gasosa.

A embebição de sementes de Myroxylon peruiferum é rápida tanto no fruto quanto na semente. Os envol

tórios das sementes não constituem barreira para a entrada de água.

A germinação das sementes nas temperaturas de 25°C e 35°C é mais rápida no escuro. A 30°C e 40°C as diferenças entre luz e escuro não foram tão conclusivas, embora exista forte evidência de que a luz desacelere a germinação. À 20°C, não existe diferença de germinação. Em relação ao efeito de temperaturas constantes, a faixa de temperatura está entre 25°C e 35°C. As temperaturas de 20°C e 40°C não são as mais apropriadas para a germinação dessas sementes, uma vez que foram obtidas respostas menores nesses tratamentos. A influência da lixiviação das sementes com água não acelera o processo da germinação sob luz branca e escuro constantes. A lixiviação com acetona no entanto, acelerou a germinação.

O extrato dos envoltórios das sementes e sementes mostraram atividade inibidora no bioensaio utilizado (germinação de sementes de alface). Após a identificação da substância inibidora como cumarina, verificou-se que esta substância aplicada exogenamente, não teve efeito no processo de germinação. Verificou-se que a concentração de cumarina nos embriões aumentou durante o período de incubação das sementes.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abernethy, J.L., 1969. The historical and current interest in Coumarin. J. Chem. 46:561-568.
- Addicott, F.T. e Lyon, J.L., 1969. Physiology of abscisic acid and related substances. Annu. Rev. Plant Physiol. 20:139-164.
- Akisque, G., 1971. Secreções de Myroxylon peruiferum L.f.I. Morfologia, histologia de órgãos secretores e obtenção do bálsamo. Rev. Farm. Bioquim. 9:115-133.
- Akisque, G., 1972a. Secreções de Myroxylon peruiferum L.f. II. Caracterização física e química do bálsamo e análise qualitativa de alguns componentes. Rev. Farm. Bioquim. 10:73-96.
- Akisque, G., 1972b. Secreções de Myroxylon peruiferum L.f. III. Caracterização física e química do bálsamo e análise qualitativa de alguns componentes. Rev. Farm. Bioquim. 10:151-165.
- Amen, R.D., 1968. A model of seed dormancy. Bot. Rev. 34: 1-31.
- Bennet-Clark, F.R.S. e Kefford, N.P., 1953. Chromatography of growth substances in plant extracts. Nature. 171: 645-647.

- Berrie, A.M.M., 1968. The interaction of Coumarin and temperature in the germination of lettuce seeds. Physiol. Plant. 21:960-965.
- Berrie, A.M.M., Paterson, J. e West, A.R., 1974. Water content and the responsitivity of lettuce seeds to light. Physiol. Plant. 31:90-96.
- Bewley, J.D. e Black, M., 1982. Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination. Vol. 2, Springer-Verlag, Berlin.
- Brown, S.A. e Shyluk, J.P., 1962. Gas liquid chromatography of some naturally occurring coumarins. Anal. Chem. 34: 1058-1061.
- Burkart, A.E., 1952. Las leguminosas argentinas silvestres y cultivadas. Discription sistematica de la familia, los generos y las principales especies, de su distribucion y utilidad en el pais e en las regiones limítrofes. Acme Agency, Soc. de Resp. Ltd., Suipacha. Buenos Aires.
- Côme, D. e Tissaoui, T., 1972. Interrelated effects of inhibition, temperature and oxygen on seed germination. In: Seed Ecology. Ed. W. Heydecker, Butterworths, London.
- Dean, F.M., 1963. Naturally occurring oxygen ring compounds. Butterworths, London.

- Dietrich, S.M.C. e Válio, I.F.M., 1973. Effect of coumarin and its derivatives on the growth of Phythium and others fungi. Trans. Br. Mycol. Soc. 61:461-469.
- Evenari, M. e Mayer, A.M., 1952. The relation between the structures of coumarin and its derivatives, and their activity as germination inhibitors. J. Exp. Bot. 8: 246-256.
- Felippe, G.M., 1980. Germination of light sensitive seeds of Cucumis anguria and Rumex obtusifolius: effects of temperature. New Phytol. 84:439-448.
- Frankland, B., 1980. Phytochrome and seed germination. What's new in Plant Physiol. 11:29-32.
- Furuya, T. e Kojima, H., 1967. Gas liquid chromatography of coumarins. J. Chromatog. 29:382-388.
- Gehan, E.A., 1965. A Generalized Wilcoxon test for comparing arbitrarily singly - censored samples. Biometrika, 203-223.
- Goodwin, R.H. e Pollock, B.M., 1954. Ultraviolet absorption spectra of coumarinderivatives. Arch. Biochem. Bioph. 40:1-6.
- Hsiao, A.J. e Vidaver, W., 1971. Water content and phytochrome - induced potencial germination responses in lettuce seed. Plant Physiol. 47:186-188.

- Karssen, C.M., 1976a. Uptake and effect of abscisic acid during induction and progress of radicle growth in seeds of Chenopodium album. Physiol. Plant. 36:259-263.
- Karssen, C.M., 1976b. Two sites of hormonal action during germination of Chenopodium album seeds. Physiol. Plant. 36:264-170.
- Kefeli, V.I. e Kadyrov, C.Sh., 1971. Natural growth inhibitors, their chemical and physiological properties. Annu. Rev. Plant Physiol. 22:185-196.
- Kefeli, V.I., 1978. Natural plant growth inhibition and phytohormones. The Hague, Boston.
- Kendrick, K.E. e Frankland, B., 1981. Fitocromo e crescimento vegetal. Vol. 25. Editora da Universidade de São Paulo.
- Koller, D., 1967. The control of seed germination by water relation. Annu. Arid. Zone. 6:35-41.
- Koller, D., 1972. Environmental control of seed germination. Ed. T.T.Kozlowski. In: Seed Biology, Vol. 2. Academic Press, New York, pp.2-93.
- Lagôa, A.M.M., 1983. Fatores que afetam a germinação de Ricinus comunis L. Tese de Mestrado, UNICAMP.
- Lehmann, E.L., 1975. Non parametrics Statistical methods based on ranks. McGraw-Hill Intern.Book Co., N.York, pp.21-27,305,309.

- Lopold, A.C. e Kriedemann, P.E., 1975. Plant growth and development. McGraw-Hill Book Co., New York. *
- Lousa, J.S., 1973. Inibidor de germinação em folhas de Aristolochia giberti Hook. Tese de Mestrado, Universidade de São Paulo.
- Maranduba, A., Oliveira, A.B., Oliveira, G.G., Reins, J.E.P. e Gottlieb, O.R., 1979. Isoflavonoids from Myroxylon peruiferum. Phytochemistry. 18:815-817.
- Mayer, A.M., 1980/81. Germination research - The State of the Art. In: Control Mechanisms in seed germination. Israel J. Bot. 29:1-3.
- Mayer, A.M. e Evenari, M., 1952. The relation between the structure of coumarin and its derivatives and their activity as germination inhibitors. J. Exp. Bot., 3:246-252.
- Mayer, A.M. e Poljakoff-Mayber, A., 1975. The germination of seeds. Pergamon Press Ltd., Oxford.
- Milborrow, B.V., 1974. The chemistry and physiology of abscisic acid. Annu. Rev. Plant Physiol. 25:259-307.
- Mohr, H., 1972. Lectures on photomorphogenesis. Springer-Verlag, Berlin.

- Murray, R.D.H., 1978. Naturally occurring plant coumarins.
In: "Progress in the chemistry of natural products".
Wein-Springer Verlag, New York.
- Ohkuma, K., Lyon, J.L., Addicott, F.T. e Smith, O.E., 1963.
Abscisin II: an abscission accelerating substance from
young cotton fruits. Science. 142:1590-1593.
- Pryce, R.J., 1972. The occurrence of chemistry of lunularic
acid and abscisic acid in plants. Phytochemistry. 11:
1759-1761.
- Randerath, K., 198 . Thin-Layer chromatography. Verlg Chemie.
Academic Press.
- Robinson, P.M. e Wareing, P.I., 1964. Chemical nature and
biological properties on the inhibition varying with
photoperiod in sycamore (Acer pseudoplatanus). Physiol.
Plant. 17:314-323.
- Salgado Labouriau, M.L., 1973. A semente de Magonia pubescens.
St. Hil. Morfologia e Germinação. An. Acad. Bras. Cienc.
45:501-537.
- Steck, W. e Bailey, B.K., 1969. Characterization of plant
coumarins by combined gas chromatography, ultraviolet
absorption spectroscopy, and nuclear magnetic resonance
analysis. Can. J. Chem. 47:3577-3583.

- Smith, H., 1975. Phytochrome and photomorphogenesis.
McGraw-Hill, London.
- Soline, T.O., 1964. Naturally occurring coumarins and related physiological activities. J. Pharm. Sci. 53:231-264.
- Válio, I.F., 1973. Effect of endogenous coumarin on the germination of seeds of Coumarouna odorata. Aulblet. J. Expl. Bot. 24:442-449.
- Válio, I.F.M., Burden, R.S. e Schwabe, W.W., 1969. A new natural growth inhibitor in the liverwort Lunularia cruciata (L.). Nature. 223:1176-1178.
- Van Sumere, C.F., Cotlenie, J. de Greef, J. e Kint, J., 1972. Biochemical studies in relation to the possible germination regulatory role of naturally occurring coumarin and phenolics. Recent Adv. Phytochemistry. 4:165-221.
- Villar, M.L.D., 1982. Germinação de Datura stramonium. L. Tese de Mestrado, UNICAMP.
- Went, F.W., 1949. Ecology of desert plants. II. The effect of rain and temperature on germination and growth, Ecology. 30:1-13.
- Whittaker, R.H. e Feeny, P., 1971. Allelochemicals: chemical interaction between species. Science. 171:757-770.

Williams, R.D. e Hoagland, R.E., 1982. The effects of naturally occurring phenolic compounds on seed germination. Weed Science. 30:206-212.

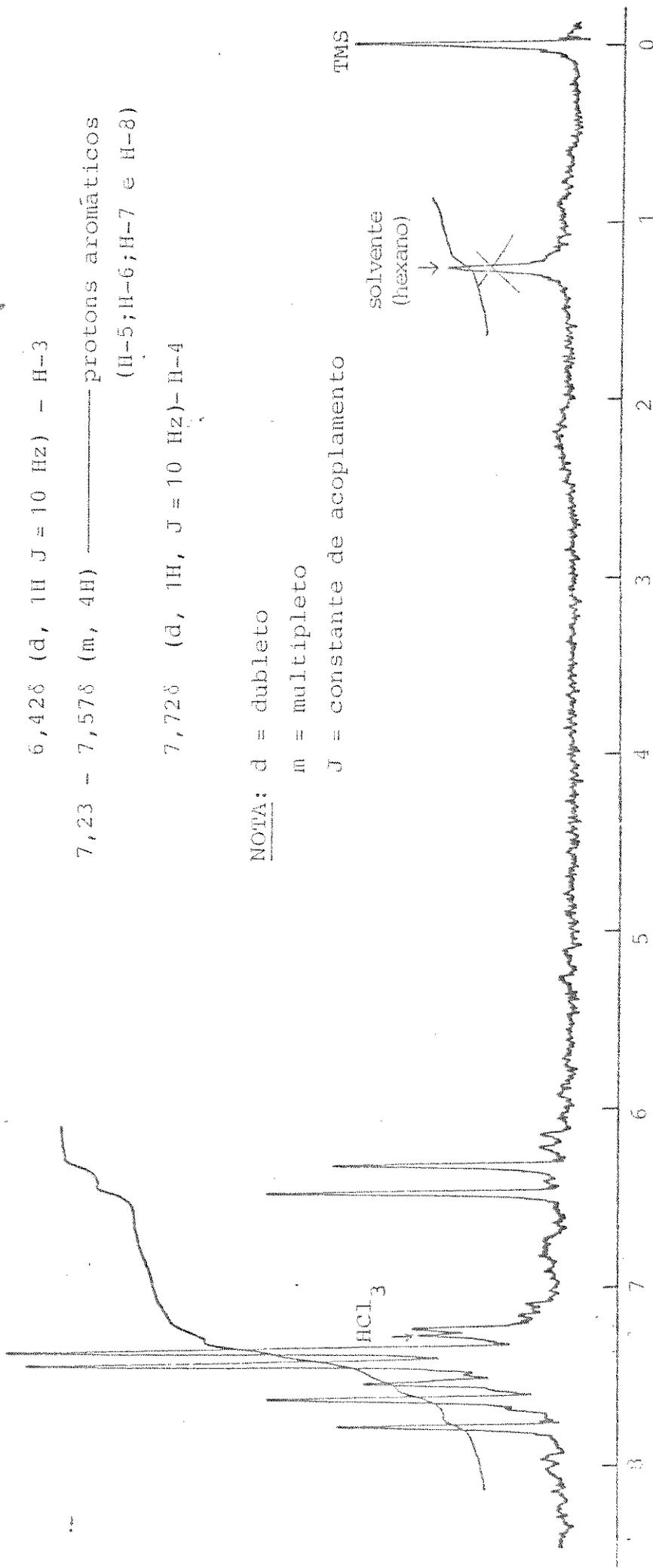
APÊNDICE I

6,42 δ (d, 1H J = 10 Hz) - H-3
7,23 - 7,57 δ (m, 4H) - protons aromáticos
(H-5; H-6; H-7 e H-8)
7,72 δ (d, 1H, J = 10 Hz) - H-4

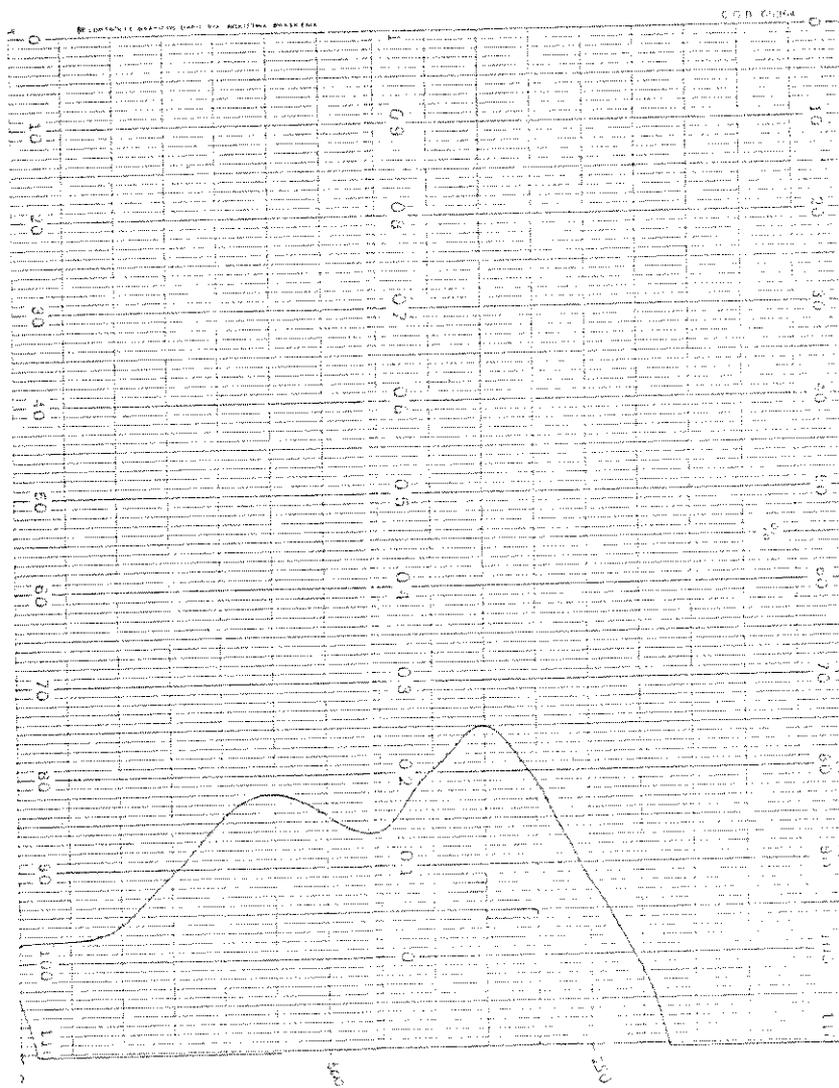
NOTA: d = dubleto

m = multipleteo

J = constante de acoplamento



E₁ - R. Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN¹H) do inibidor cumarina de semente de Myroxylon peruiferum. Solvente utilizado: clorofórmio deuterado.



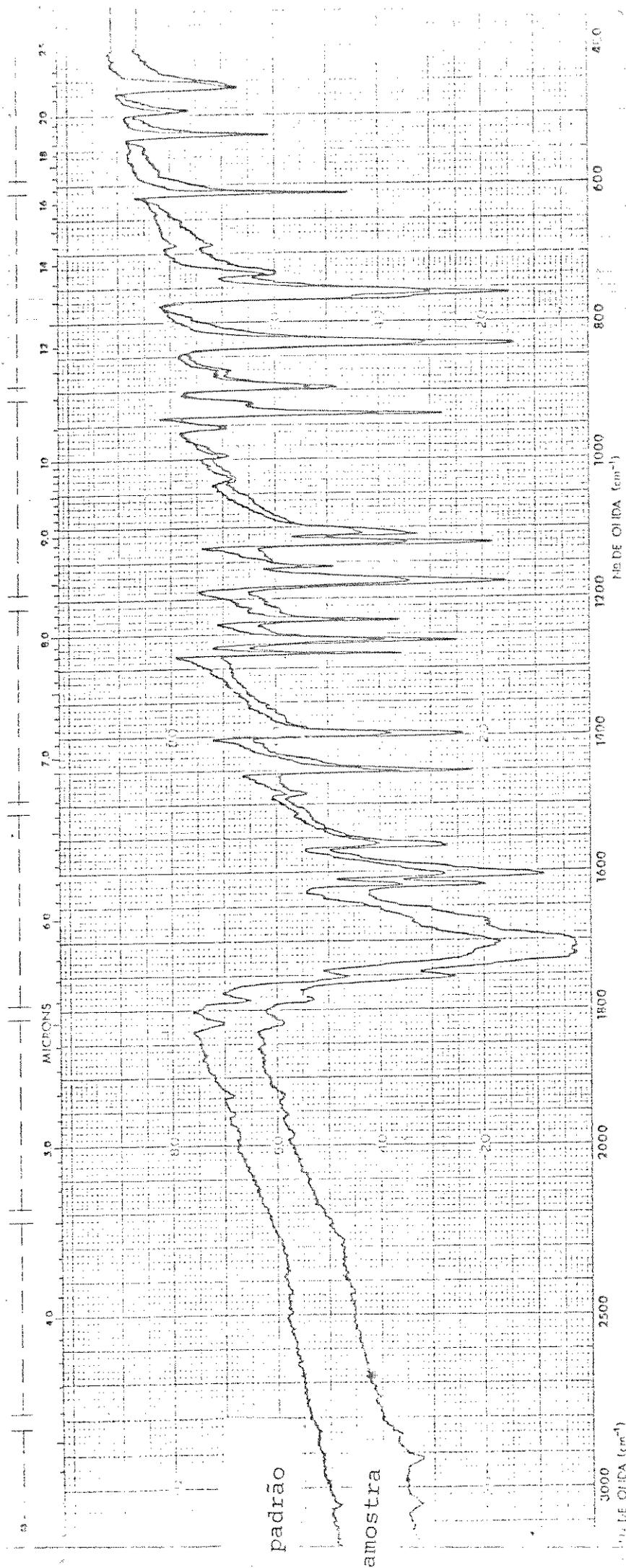
E₃ - Espectro de absorção na ultravioleta (UV) do inibidor cumarina de semente de Myroxylon peruiferum.

Solvente utilizado: Etanol

Absorção característica, na região do ultravioleta, é a de ≈300mμ ou 300nm devido ao cromóforo de α-pirona.

Em solução alcóolica, apresenta 3 absorções características: λ_{max} 275, 284, 310 nm.

(Dean, F.M., 1963)



E₂ - Espectro de absorção no infravermelho (IV) do padrão e do inibidor (amostra) cumarina de semente de Myroxylon peruiferum.

APÊNDICE II

| RE. | 0,1 | | | 0,2 | | | 0,3 | | | 0,4 | | | 0,5 | | | 0,6 | | | 0,7 | | | 0,8 | | | 0,9 | | | 1,0 | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|
| | 1.1 | 1.2 | 1.3 | 2.1 | 2.2 | 2.3 | 3.1 | 3.2 | 3.3 | 4.1 | 4.2 | 4.3 | 5.1 | 5.2 | 5.3 | 6.1 | 6.2 | 6.3 | 7.1 | 7.2 | 7.3 | 8.1 | 8.2 | 8.3 | 9.1 | 9.2 | 9.3 | 10.1 | 10.2 | 10.3 |
| a | 28 | 29 | 24 | 28 | 29 | 27 | 26 | 22 | 26 | 28 | 30 | 24 | 30 | 30 | 27 | 29 | 30 | 24 | 25 | 13 | 14 | 0 | 4 | 0 | 10 | 11 | 10 | 0 | 0 | 0 |
| b | 27 | 26 | 26 | 23 | 27 | 28 | 26 | 28 | 24 | 29 | 25 | 29 | 24 | 18 | 25 | 3 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 18 | 22 | 19 | 3 | 6 | 5 | 0 | 0 | 4 |
| c | 23 | 27 | 29 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Ap.2.1. Resultados dos bioensaios com sementes de alfa_{ce}. Extrato aplicado na cromatoplaça equivalente a 195 mg de Peso seco. Verificação após 1 dia de germinação.

a. Extrato^{*} de envoltório das sementes não embebidas.

b. Extrato de sementes não embebidas.

c. Controle

* Número de sementes germinadas (30 sementes por placa)

| RE. | 0,1 | | | 0,2 | | | 0,3 | | | 0,4 | | | 0,5 | | | 0,6 | | | 0,7 | | | 0,8 | | | 0,9 | | | 1,0 | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|
| | 1.1 | 1.2 | 1.3 | 2.1 | 2.2 | 2.3 | 3.1 | 3.2 | 3.3 | 4.1 | 4.2 | 4.3 | 5.1 | 5.2 | 5.3 | 6.1 | 6.2 | 6.3 | 7.1 | 7.2 | 7.3 | 8.1 | 8.2 | 8.3 | 9.1 | 9.2 | 9.3 | 10.1 | 10.2 | 10.3 |
| a | 28 | 29 | 25 | 26 | 24 | 23 | 26 | 23 | 29 | 22 | 25 | 23 | 16 | 20 | 25 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| b | 30 | 29 | 27 | 30 | 28 | 24 | 22 | 28 | 30 | 27 | 27 | 25 | 22 | 20 | 25 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| c | 28 | 26 | 27 | 26 | 25 | 26 | 27 | 26 | 29 | 29 | 29 | 28 | 25 | 28 | 22 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| d | 30 | 29 | 27 | 26 | 25 | 26 | 28 | 24 | 24 | 27 | 26 | 28 | 0 | 14 | 23 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 16 | 15 | 0 | 19 | 18 | 23 | 10 | 26 | 18 |
| e | 24 | 23 | 29 | 30 | 29 | 23 | 28 | 28 | 26 | 23 | 28 | 29 | 27 | 0 | 17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 |
| f | 27 | 23 | 28 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Ap.2.2. Resultado dos bioensaios com sementes de alfaca.

Extrato aplicado na cromatoplaça equivalente a 250 mg de Peso seco. Verificação após 1 dia de germinação.

- a. Extrato de sementes não embebidas.
- b. Extrato de sementes embebidas durante 24 horas.
- c. Extrato de sementes embebidas durante 48 horas.
- d. Extrato de sementes embebidas durante 72 horas.
- e. Extrato de sementes embebidas durante 96 horas.
- * d. Controle.

* Número de sementes germinadas (30 sementes por placa)