

**Avaliação comparativa dos metabólitos e citocininas de
Adenocalymma peregrinum (Miers) L. G. Lohmann (Bignoniaceae)
durante o processo de regeneração da parte aérea**



Vanessa Samúdio dos Santos



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Avaliação comparativa dos metabólitos e citocininas de *Adenocalymma peregrinum* (Miers) L.G.Lohmann (Bignoniaceae) durante o processo de regeneração da parte aérea

Vanessa Samúdio dos Santos

Orientação: Dr. Carlos Alexandre Carollo
Co-orientação: Dr^a. Maria Rita Marques

Campo Grande - MS
2012



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Avaliação comparativa dos metabólitos e citocininas de *Adenocalymma peregrinum* (Miers) L.G.Lohmann (Bignoniaceae) durante o processo de regeneração da parte aérea

Vanessa Samúdio dos Santos

Dissertação apresentada como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Biologia Vegetal junto ao Departamento de Biologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde.

Campo Grande - MS
2012

Data da defesa pública, 27 de abril de 2012.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Carlos Alexandre Carollo (Orientador)

(Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS)

Dr^a. Claudia Andrea Lima Cardoso (Titular)

(Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul - UEMS)

Dr^a. Maria Lígia Rodrigues Macedo (Titular)

(Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS)

Dr^a Josimara Nolasco Rondon (Suplente)

(Universidade Católica Dom Bosco (UCDB))

Dr. Edson dos Anjos dos Santos (Suplente)

(Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS)

*“Sucesso é o estado de espírito resultante da consciência que você tem
de haver se empenhado para ser o melhor que é capaz de ser”*
John R. Wooden

*Aos meus pais e meus irmãos
Por todo apoio, confiança e incentivo
E por serem meus exemplos de vida
Com todo amor*

DEDICO

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus que nos meus momentos de aflição sempre foi meu refúgio e que me deu força para continuar na caminhada.

Aos meus pais e meus irmãos por todos os esforços que fizeram por mim, confiança que depositaram e por acreditarem em meu potencial.

Ao meu orientador Dr. Carlos Alexandre Carollo pela dedicação, paciência, pela amizade e por acreditar que eu poderia finalizar esse trabalho. Em pouco tempo aprendi muito, sem dúvida uma das melhores orientações que recebi.

A professora Dr^a. Maria Rita Marques por toda ajuda no desenvolvimento desse trabalho.

A Dayana Rubio Gouvea por todo o auxílio nas análises, ao professor Dr Norberto Peporine Lopes a FCFRP e todos do laboratório de pesquisa de produtos Naturais e Sintéticos da USP- Ribeirão Preto por todo o apoio e amizade.

Ao professor Dr. Vespasiano Borges de Paiva Neto por toda a ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

A professora Dr^a. Josimara Nolasco Rondon por toda ajuda nesse mestrado, muita sabedoria que me fizeram seguir contornando todos os obstáculos que surgiram ao longo desse trabalho.

Ao professor Dr. William Fernando Antonialli Junior, ótimo orientador e exemplo de profissional que com muita dedicação me preparou com sabedoria na graduação para enfrentar os desafios do Mestrado.

Ao meu amigo João Roberto Fabri técnico do laboratório de Farmacognosia que me auxiliou nas coletas de sementes, coleta do material para o experimento e por toda ajuda na fase experimental no laboratório, sem dúvida um amigo que vou levar para sempre em meu coração.

Ao Dr. Edson dos Anjos dos Santos pela ajuda com a discussão dos dados e pela amizade.

A Maíra da Rocha pela amizade, apoio e pelo auxílio nas coletas.

A todos os integrantes do laboratório de Biotecnologia de Chapadão do Sul-UFMS, laboratório de Bioquímica, laboratório de Fisiologia de sementes e laboratório de Biologia geral de Campo Grande-UFMS

A todos do laboratório de Farmacognosia Daniel, Camila, Alice, Lucas, Lais, Patrícia, Gisaine, Douglas, Muryel, obrigada pelo apoio e amizade.

Às minhas amigas Katyuce de Souza e Jeana Escher pela amizade, conselhos e por sempre me ajudar nas horas que mais precisei.

Ao meu amigo Diomar por todo apoio e ajuda com artigos e pela amizade que fez toda a diferença nessa etapa da minha vida.

Ao Thiago H. Stefanello pela paciência, conselhos e amizade, 6 anos de amizade que se intensificaram nesses 2 anos de Mestrado.

Agradeço a Nataline Valezuela de Alcântara por toda a ajuda no experimento e amizade.

Aos meus amigos Luzia, Vivian, Diego Callili, Ycaro Afonso, Lígia, William, Luiz Carlos dos Santos Junior, professora Glauca Almeida de Moraes, obrigada pelo apoio e amizade.

A todos os mestrandos em Biologia Vegetal ingressos em 2010, pelos momentos de alegrias e de desespero com a entrega de trabalhos, provas e dissertações intermináveis, mesmo com todos os momentos difíceis, conseguimos formar uma bela equipe.

A FUNDECT pela bolsa concedida.

CAPES e INAU pelo auxilio financeiro.

A todos os técnicos, alunos e professores do programa de pós graduação em Biologia Vegetal, que de forma direta ou indireta são co-responsáveis pela realização deste trabalho e minha formação.

A todos que estiveram presente nessa fase da minha vida, muito obrigada!

Resumo

Adenocalymma peregrinum (Miers) L.G.Lohmann (Bignoniaceae) conhecida popularmente como “ciganinha”, vem sendo intensamente estudada nos últimos anos em função de suas características como invasoras de pastagens. Essa espécie possui mecanismos de propagação vegetativa, através de gemas latentes nos caules aéreos e nos caules subterrâneos que são ativadas em resposta a estímulos provocados por cortes e outras lesões de seus tecidos, o que explica o vigoroso rebrote causado por tratos mecânicos e a ineficácia do controle pelos métodos de corte. Com o intuito de explicar, em parte, as estratégias metabólicas que propiciam a agressividade desta espécie como invasoras de pastagens foram realizadas avaliações comparativa dos níveis de citocininas e de metabólitos secundários com o uso das técnicas de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas das raízes e caule de *A. peregrinum* durante o processo de regeneração da parte aérea. Para a avaliação comparativa dos compostos foram utilizadas raízes de exemplares cultivados em casa de vegetação, obtidas a partir da germinação de sementes e caule de plantas adultas estabelecidas no campo com intervalo de poda de 5, 10, 15, 20 e 25 dias. A metodologia analítica para a avaliação comparativa dos compostos foi desenvolvida em cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a um detector de arranjo de diodos e espectrômetro de massas. A regeneração das plantas podadas teve início no 10º dia após a realização da poda em campo e em casa de vegetação. Dos 12 compostos detectados apenas a cinetina, alantoína e o iridoide 6β-hidroxiipolamiida foram detectados em nível adequado para a avaliação comparativa. Os outros compostos somente analisados quanto sua presença e ausência. O pico de concentração das substâncias coincidiu com o início da regeneração das plantas podadas no campo e casa de vegetação, o que evidencia seu papel na regeneração da planta após a poda. Provavelmente *A. peregrinum* usa esses compostos para superar as condições adversas encontradas no campo e, assim, pode conseguir vantagens sobre outras espécies, garantindo o seu sucesso como uma espécie invasora.

Palavras-chaves: ciganinha, invasora de pastagem, citocininas, metabólitos secundários.

Abstract

Adenocalymma peregrinum is popular known as “ciganinha” and has been extensively studied in the last years, mainly due to its invasive nature. This species has vegetative propagation mechanisms that are activated in response to stimuli caused by cuts and other injuries on their tissues, that could explains the vigorous regrowth caused by mechanical treatment and the ineffectiveness of control by cutting methods. In order to understand better how metabolic strategies could contribute to aggressiveness of this species, were evaluated comparative levels of cytokines and secondary metabolites in roots and stems of *A. peregrinum* during the regeneration process using Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry. For comparative evaluation of the compounds were used roots of plants grown under greenhouse and stems of mature plants established in the grassland with pruning interval of 5, 10, 15, 20 and 25 days. The analytical methodology used during comparative evaluation of the compounds was developed in ultra performance liquid chromatography coupled to diode arrays detector and mass spectrometry. The regeneration of pruned plants began on the 10th day after the completion of pruning in the grassland and greenhouse. Among the twelve monitored compounds only kinetin, allantoin and 6 β -hydroxyipolamiide was detected at the appropriate level for evaluation. The other compounds were analyzed only for their presence or absence. The peak concentration of compounds coincided with the beginning of the plants regeneration, which highlights its role in the plant regeneration after pruning. Probably *A. peregrinum* uses these compounds to overcome adverse conditions encountered in the field and thus can achieve advantages over other species, ensuring your success as an invasive species.

Keywords: ciganinha, weed, cytokinins, secondary metabolites.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BEH	Híbrido de Ponte de Etileno
B.O.D	Demanda Bioquímica de Oxigênio
C18	Coluna de sílica com fase reversa de octadecilsilano
CGMS	Campo Grande Mato Grosso do Sul
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
CID	Dissociação Induzida por Colisão
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-EM	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a um Espectrômetro de Massas
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
EM-EM	Espectrometria de Massas em série
ESI	Ionização por Eletronebulização
eV	Elétron volts
GA₃	Ácido Giberélico
mAU	Miliunidades de Absorbância
MHz	Mega Hertz
MRM	Múltipla Reação Monitorada
 mM	Milimolar
nm	Nanômetro
pH	Potencial de Hidrogênio
pmol	Picomol
UPLC- DAD-EM	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a um Detector de Arranjo de Diodos e Espectrômetro de Massas.
UV/VIS	Ultravioleta/Visível
v/v/v	Volume/volume/volume
µg	Micrograma
µL	Microlitro

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Espécies invasoras	1
1.2 Família Bignoniaceae	1
1.3 <i>Adenocalymma peregrinum</i>	2
1.4 Citocininas.....	4
1.5 Metabólitos secundários	9
1.5.1 Alantoína	9
1.5.2 Iridoides.....	10
1.6 Aplicação de CLAE-EM no estudo de citocininas e metabólitos secundários.	11
1.7 Ionização por <i>electrospray</i>	12
2. OBJETIVOS.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1 Germinações das sementes em placa de Petri.....	14
3.2 Coletas de material para avaliação comparativa de citocininas e metabólitos secundários	14
3.3 Desenvolvimentos do método de extração de citocininas e metabólitos secundários	16
3.4 Metodologia analítica para a avaliação comparativa das citocininas e metabólitos secundários.....	16
3.5 Análise dos dados	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
4.1 Germinação das sementes em placa de Petri	20
4.2 Remoções da parte aérea e regeneração das plantas de casa de vegetação e do campo	22
4.3 Análise por UPLC-DAD-EM	25
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	39
6. REFERÊNCIAS BIBIOGRÁFICAS.....	41

1. INTRODUÇÃO

1.1 Espécies invasoras

Ambientes alterados pela ação do homem podem sofrer um processo de degradação que muitas vezes resulta na invasão por espécies vegetais silvestres ou exóticas. Ainda não existem fatores efetivos de controle do crescimento e de populações, com isso estas espécies tendem a se tornar invasoras de áreas degradadas, resultando em prejuízos econômicos e ambientais (Radford e Cousens, 2000; Suding et al., 2004).

A sociedade americana de plantas invasoras define uma espécie invasora como qualquer planta que interfira nas atividades ou no bem estar dos seres vivos (Booth et al., 2003). Para Midgley e colaboradores (2003) uma planta invasora é uma espécie nativa ou introduzida que causa um efeito ecológico ou econômico negativo em sistemas agronômicos ou naturais.

As alterações do habitat, a conversão de terras para uso agrícola ou a erradicação dos inimigos naturais podem desencadear um comportamento agressivo em um “residente” antes inofensivo (Shine et al., 2000).

Segundo Pott e Pott (2000), existem cerca de 560 espécies de plantas invasoras de pastagens no cerrado do Centro-Oeste. Dentre as espécies consideradas invasoras muitas pertencem à família Bignoniaceae que são cultivadas há muito tempo como plantas ornamentais, mas, em decorrência dos efeitos antropogênicos sobre a natureza, adquiriram certa eficiência para sobreviver, tornando-se espécies capazes de causar grandes prejuízos econômicos (Lorenzi, 2000).

1.2 Família Bignoniaceae

A família Bignoniaceae possui cerca de 120 gêneros e 800 espécies. No Brasil, são encontrados 33 gêneros e cerca de 350 espécies, sendo 33 delas raras. É uma família com grande potencial medicinal e ornamental (Souza e Lorenzi, 2008; Lohmann e Silva-Castro, 2009).

Os representantes dessa família têm hábitos arbóreo, arbustivo ou liana. Geralmente as folhas são opostas e compostas, frequentemente com o folíolo terminal modificado em gavinha simples ou furcada nas trepadeiras, sem estípulas. Flores

zigomorfas, frequentemente vistosas, pentâmeras, gamopétalas, monoclinas, oligostêmones, hipóginas; quatro estames, que podem ser didinâmicos, e estaminódio na maioria das vezes presente; ovário bilocular, com muitos óvulos. Frutos cápsulas com sementes aladas, ocasionalmente bagas (Lohmann e Silva-Castro, 2009).

Dentre as espécies da família Bignoniaceae encontramos a espécie *Adenocalymma peregrinum* uma das principais espécies invasoras de pastagens no Centro-Oeste brasileiro (Pott e Pott, 2000).

1.3 *Adenocalymma peregrinum*

Adenocalymma peregrinum (Miers) L.G.Lohmann (Bignoniaceae), é popularmente conhecida como "ciganinha" e até recentemente era botanicamente descrita como *Memora peregrina*. No entanto, Alcantara e Lohmann (2010) reclassificaram e renomearam para *Adenocalymma peregrinum*.

A. peregrinum, é nativa do Cerrado e sua ocorrência é restrita aos estados de Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás e Minas Gerais (Nunes, 1999a). Essa espécie vem sendo intensamente estudada em função de suas características como invasoras de pastagens, o que acarreta em grandes prejuízos principalmente na região centro-sul do estado de Mato Grosso do Sul.

Algumas características biológicas de *A. peregrinum* podem explicar o potencial de invasão desta espécie: reprodução vegetativa eficaz, floração e frutificação por longo período, sementes aladas e dispersas pelo vento e crescimento rápido. *A. peregrinum* (Figura 1) é uma planta de hábito arbustivo, tendo em média 150 cm de altura, com folhas compostas, imparipenadas, intensamente verdes e coriáceas. Suas inflorescências são amarelas e os frutos capsulares e descentes, achatados, com cerca de 20 cm de comprimento, e cada vagem pode conter até 12 sementes. Seus rizomas são bem desenvolvidos e podem atingir até 2,0 m de comprimento e 6,0 cm de diâmetro (Nunes, 1999a).



Figura 1- Indivíduo adulto e em floração de *Adenocalymma peregrinum* presente em área degradada nas proximidades de Campo Grande - MS (fotos: Vanessa Samúdio dos Santos).

Segundo Nunes (1999b) *A. peregrinum* possui mecanismos de propagação vegetativa, através de gemas latentes, existentes tanto nos caules aéreos quanto nos subterrâneos, ativadas em resposta a estímulos provocados por cortes e outras lesões. Estas características explicam o vigoroso rebrote causado por tratos mecânicos e a ineficácia do controle pelos métodos de corte, provocados por foice, enxadão, roçadeira e outros. Tais propágulos – fragmentos do sistema subterrâneo – tornam a planta mais competitiva, pois permite que a espécie ocupe a área manejada em curto espaço de tempo. Dessa maneira *A. peregrinum* se espalha, inibindo o desenvolvimento de gramíneas como *Brachiaria* sp., dificultando a pastagem de bovinos (Nunes, 1999a). Além disso, floresce, frutifica e produz sementes praticamente o ano todo (Nunes, 1999b).

A ocorrência dessa planta invasora, que é extremamente agressiva e de rápida disseminação, já foi notada infestando grandes áreas em vários estados brasileiros citados anteriormente, trazendo sérios prejuízos à pecuária regional (Embrapa, 1999). No Mato Grosso do Sul, observou-se a presença de *A. peregrinum* em 70% dos municípios (Nunes, 1999b).

No seu ambiente natural a ocorrência desta planta é esparsa, restrita às clareiras (Lorenzi, 2000). Em áreas desmatadas para formação de pastagens, cujo manejo não é feito corretamente, a espécie compete com forrageiras, se alastrando e ocupando o espaço onde antes havia o pasto, impedindo o crescimento de gramíneas e dificultando a pastagem de bovinos (Nunes, 1999b).

O estudo realizado por Marchetti (2006) sugere que *A. peregrinum* é resistente ao efeito tóxico do NH_4^+ , sendo que o teor de aminoácidos dos rizomas permaneceu

constante após a poda mecânica, indicando um processo de reciclagem contínua realizada pela planta. No mesmo estudo onde foram utilizadas plantas podadas e não podadas os ureídeos foram encontrados em menor concentração nos caules subterrâneos de indivíduos podados, sugerindo uma intensa utilização destes compostos para produção de tecidos após a poda.

A. peregrinum é uma espécie muito bem adaptada às condições adversas encontradas no Cerrado, como a poda por animais ou queimadas. Sua regeneração rápida e eficiente, em campo, se deve à mecanismos bioquímicos evolutivamente desenvolvidos para responder aos estresses ambientais (Oliveira, 2009).

Estudos realizados por Grassi e colaboradores (2005) mostraram que extratos metanólicos da casca do caule e extratos etanólicos e hexânicos de folhas de *A. peregrinum*, apresentam atividade alelopática, indicando a presença de compostos inibidores da germinação de outras espécies.

Em plantas incapazes de fixar nitrogênio atmosférico como algumas espécies da família Bignoniaceae, compostos como a alantoína, isolados em grande quantidade de *A. peregrinum* por Grassi e colaboradores (2005) têm se mostrado eficientes como fonte alternativa de nitrogênio (Desimone et al., 2002). O alto teor de alantoína em *A. peregrinum* pode sugerir que a espécie utiliza esse ureídeo para estabelecer uma vantagem competitiva com outras espécies (Grassi et al., 2005).

Além dos metabolitos secundários, alguns autores afirmam que as citocininas têm um papel fundamental na diferenciação e regeneração de plantas na maioria das espécies induzindo a divisão celular, proliferação e morfogênese da parte aérea (Thorpe, 1993; Santiago, 2001), esse fato pode também estar relacionado com estratégias de adaptação e rápido desenvolvimento da espécie.

1.4 Citocininas

Conhecidos também como fito-hormônios, os hormônios vegetais são substâncias orgânicas ativas em pequenas quantidades que desempenham um papel central no crescimento de plantas, onde podem agir no mesmo tecido enquanto outros são produzidos em um tecido e transportados para outros tecidos induzindo respostas específicas (Taiz e Zeiger, 2009).

Dentre estes hormônios, destacam-se as citocininas, uma classe de hormônios vegetais relacionadas a uma ampla gama de processos biológicos, tais como promoção

de divisão celular, desenvolvimento da parte aérea, formação de gemas e controle da dominância apical, senescência foliar, diferenciação dos cloroplastos e indução da expressão de genes relacionados a fotossíntese (Rijavec et al., 2009; Zhang et al., 2010).

O primeiro composto caracterizado com atividade citocinínica foi a cinetina, isolada em 1955 do DNA autoclavado do esperma de arenque (uma espécie de peixe marinho) (Amasino, 2005; Taiz e Zeiger, 2009). A primeira citocinina obtida de plantas foi a zeatina, isolada em extratos de endosperma imaturo de milho (*Zea mays*) (Miller, 1961; Letham, 1963).

A estrutura da zeatina é similar à da cinetina, sendo que as duas moléculas são derivadas da adenina ou da aminopurina (Taiz e Zeiger, 2009). Embora as cadeias laterais das duas moléculas sejam diferentes, em ambas a cadeia lateral é ligada ao nitrogênio 6 da aminopurina. A zeatina apresenta uma dupla ligação que pode ter configuração *cis* ou *trans* (Taiz e Zeiger, 2009), sendo essa configuração ilustrada na Figura 2.

Quase todos os compostos encontrados com atividade de citocininas possuem uma substituição no N⁶ da aminopurina e todas as citocininas encontradas na natureza até o momento, registradas na literatura são derivadas da aminopurina (Scifinder, 2012).

A atividade das citocininas que são compostos endógenos em plantas é regulada em diversas etapas: síntese, ativação, conjugação e degradação, sendo que os locais e sistemas de transportes de longas distâncias também estão envolvidos na regulação das citocininas (Kudo et al., 2010).

Os níveis de citocininas podem ser também afetados por fatores ambientais, correlacionado positivamente com os níveis de nutrientes minerais especialmente os nutrientes nitrogenados (Takei et al., 2001b, 2002; Sakakibara e Takei, 2002).

O estudo da biossíntese de citocininas enfrenta consideráveis limitações devido ao fato dos níveis desses hormônios serem extremamente baixos (menor que 50 pmol/g de matéria fresca), fazendo com que as dosagens desses compostos sejam complexas (Peres et al., 1997; Novak et al., 2003; Peres e Kerbaury, 2004).

Através da engenharia genética foi observado um aumento do nível de citocininas nas plantas. Esse aumento é obtido pela inserção do gene isopentenil transferase (*ipt*), o qual codifica a primeira enzima envolvida na síntese deste regulador (Hedden e Philips, 2000).

Estudos demonstram que existe mais de uma via biossintética para citocininas (Peres e Kerbaury, 2004). A biossíntese de citocininas (Figura 2) tem início com a

transferência do grupo isopentenil do dimetilalil difosfato (DMAPP) para a molécula de adenosina (Astot et al., 2000; Taiz e Zeiger, 2009). Os grupos isopentenil são transferidos para a molécula de adenina a partir do DMAPP por uma enzima chamada tRNA-IPT (Kakimoto, 2003; Taiz e Zeiger, 2009). As enzimas IPT (isopentenil transferase) do vegetal usam como substrato adenosina tanto o ADP quanto o ATP para ligar este a DMAPP (Hedden e Philips, 2000; Kakimoto, 2001) e tem como produto desta reação o iPDP ou iPTP que são convertidos em zeatina pelo citocromo P450 monoxigenase (Takei et al., 2004; Taiz e Zeiger, 2009).

Foram inicialmente isolados em bactérias e não em plantas os primeiros genes codificadores da enzima IPT. As citocininas zeatina e zeatina ribosídeo seriam formadas a partir de [9R-5'P] iP produzido pelo gene IPT (Peres e Kerbaury, 2004).

O tRNA possui além dos quatro nucleotídeos que são utilizados para construir todas as outras formas de RNA, nucleotídeos pouco comuns com base hipermodificadas que agem como citocininas quando o tRNA é hidrolisado e alguns tRNAs vegetais possuem *cis*-zeatina como base hipermodificada (Taiz e Zeiger, 2009).

De acordo com a estrutura química que as citocininas apresentam elas são classificadas em dois grupos: as derivadas de adenina e as derivadas das feniluréias (Mok et al., 1987).

As cadeias laterais das moléculas de citocininas são sintetizadas a partir de derivados de isoprenos (Sakakibara, 2006) sendo o ácido mevalônico ou o piruvato acrescido de 3-fosfaglicerato o precursor para a formação dessas estruturas de isoprenos (Taiz e Zeiger, 2009). Desde a descoberta da primeira citocinina, mais de 40 citocininas foram identificadas (Hoyerova et al., 2006).

Estudos demonstraram que a degradação das citocininas endógenas ativas ocorrem pela quebra da cadeia lateral realizada pela enzima oxidase de citocininas e essa quebra é muito importante para a regulação desse hormônio nas plantas (Werner et al., 2001, 2003; Peres e Kerbaury, 2004; Ashikari et al., 2005).

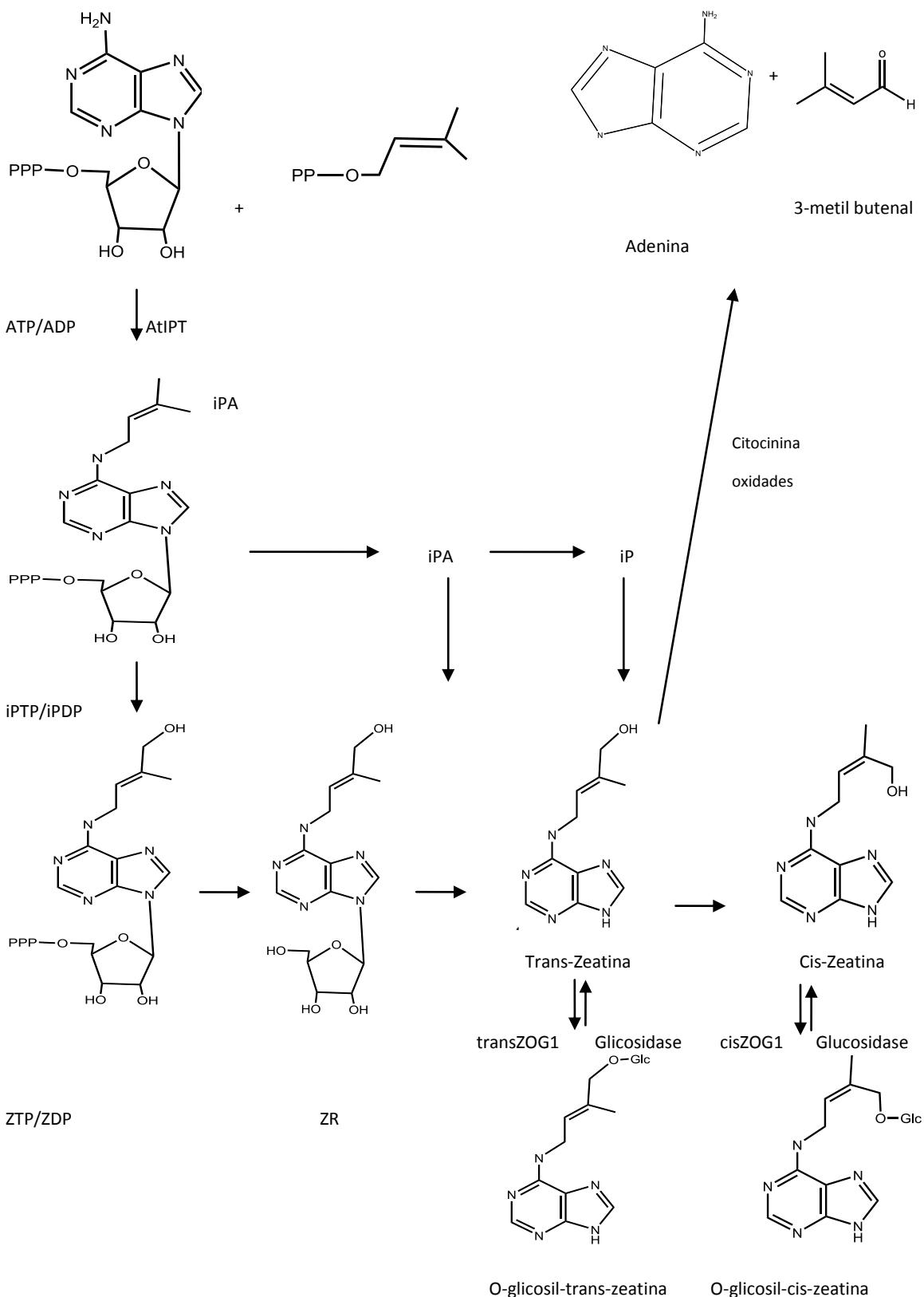


Figura 2- Rota biosintética para a síntese de citocininas (Adaptado de Taiz e Zeiger, 2009).

A conjugação das citocininas em várias posições pode regular também os níveis desses hormônios nas plantas. Os nitrôgenios nas posições **3,7 e 9** do anel de adenina da citocinina podem ser conjugados a resíduos de glicose. A alanina pode ser conjugada ao nitogênio da posição **9** formando ácido lupínico. Essas modificações são irreversíveis e tornando as citocininas conjugadas inativas em bioensaios (Taiz e Zeiger, 2009).

Experimentos realizados demonstraram que a forma da base livre da transzeatina e não o seu derivado ribosídeo ou ribotídeo, liga-se diretamente ao CRE1 (receptor de citocininas) indicando que é a base livre é a forma ativa (Yamada et al., 2001).

Anteriormente pensava-se que as citocininas eram sintetizadas apenas nas raízes e transportadas para outros locais nas plantas, sendo esse transporte realizado pelo xilema (Beveridge et al., 1997), mas estudos têm demonstrado que as citocininas são produzidas em vários locais nas plantas, incluindo folhas, caules e flores (Miyawaki et al., 2004; Takei et al., 2004) e a ativação das citocininas ocorre em quase todas as partes das plantas (Kurakawa et al., 2007; Kuroha et al., 2009).

Evidências em experimentos já realizados demonstram que o transporte da zeatina ribosídeo da raiz para a parte aérea é regulada por um sinal que é produzido na parte aérea (Beveridge et al., 1997) e a identificação desse sinal ainda não foi determinado (Beveridge, 2000).

As citocininas sintetizadas nas raízes se movem pelo xilema e quando a parte aérea de uma planta enraizada é cortada próximo ao solo esse fluxo de citocininas não diminui e pode continuar por vários dias juntamente com a água e os sais minerais absorvidos pelas raízes (Taiz e Zeiger, 2009).

Ferramentas sensíveis e seletivas são necessárias para a quantificação e análises comparativas desse grupo de hormônios em tecidos vegetais, como cromatografia líquida combinada com espectrometria de massas (CLAE-EM), tem sido frequentemente utilizadas para a quantificação de citocininas endógenas em tecidos de plantas (Ge et al., 2006).

Considerando que as citocininas têm papel essencial no controle da divisão celular e diferenciação de brotações (Taiz e Zeiger, 2009), os quais constituem o principal sítio de síntese de citocininas livres que são carreadas para o local de regeneração. Acreditamos que *A. peregrinum* possua níveis elevados ou elevada capacidade de síntese de citocininas, resultando na sua habilidade regenerativa mediante a realização de poda ou segmentação das raízes.

1.5 Metabólitos secundários

1.5.1 Alantoína

Os metabólitos secundários estão, em geral, relacionados a aspectos ecológicos e evolutivos das espécies vegetais, e desempenham importante papel na interação das plantas com o ambiente, podem proteger as plantas de uma ampla variedade de microrganismos (vírus, fungos e bactérias) e de herbívoros (artrópodes e vertebrados) além de garantir outras funções na sobrevivência das espécies no ecossistema (Wink, 1988; Taiz e Zeiger, 2009).

Vários fatores podem influenciar a dinâmica dos metabólitos, dentre eles estão os ciclos sazonais, circadianos e fenológicos, latitude, altitude, disponibilidade hídrica e de nutrientes, nível de radiação, poluição atmosférica, indução por estímulos mecânicos, herbivoria e ataques por patógenos. Esses fatores podem influenciar a produção de metabólitos secundários, sendo que não atuam isoladamente (Gobbo-Neto e Lopes, 2007).

Dentres, os metabólitos secundários nitrogenados que são exportados pelo sistema radicular de plantas tropicais via xilema, estão os ureídeos (alantoína e acido alantóico), que desempenham papel importante na assimilação, metabolismo, transporte e armazenamento de nitrogênio (Schubert e Boland, 1990).

A via de síntese de ureídeos está ligada ao catabolismo de nucleotídeos a ácidos nucleicos, podendo ter como resultado a síntese *de novo* de purinas e/ou da degradação de nucleotídeos preexistentes (Polayes e Shubert, 1984).

A alantoína e o ácido alantóico, são derivados da inosina monofosfato (IMP), a qual é formada a partir da ribose-5-fosfato (R-5-P), que requer a entrada de nitrogênio a partir da Glutamina (Gln), Asparagina (Asp), e Glicina (Gly) (Lea, 1997; Marchetti, 2006). A xantina metabolizada resulta em ácido úrico convertido a alantoína pela ação da enzima uricase (Figura 3) (Shubert e Boland, 1990).

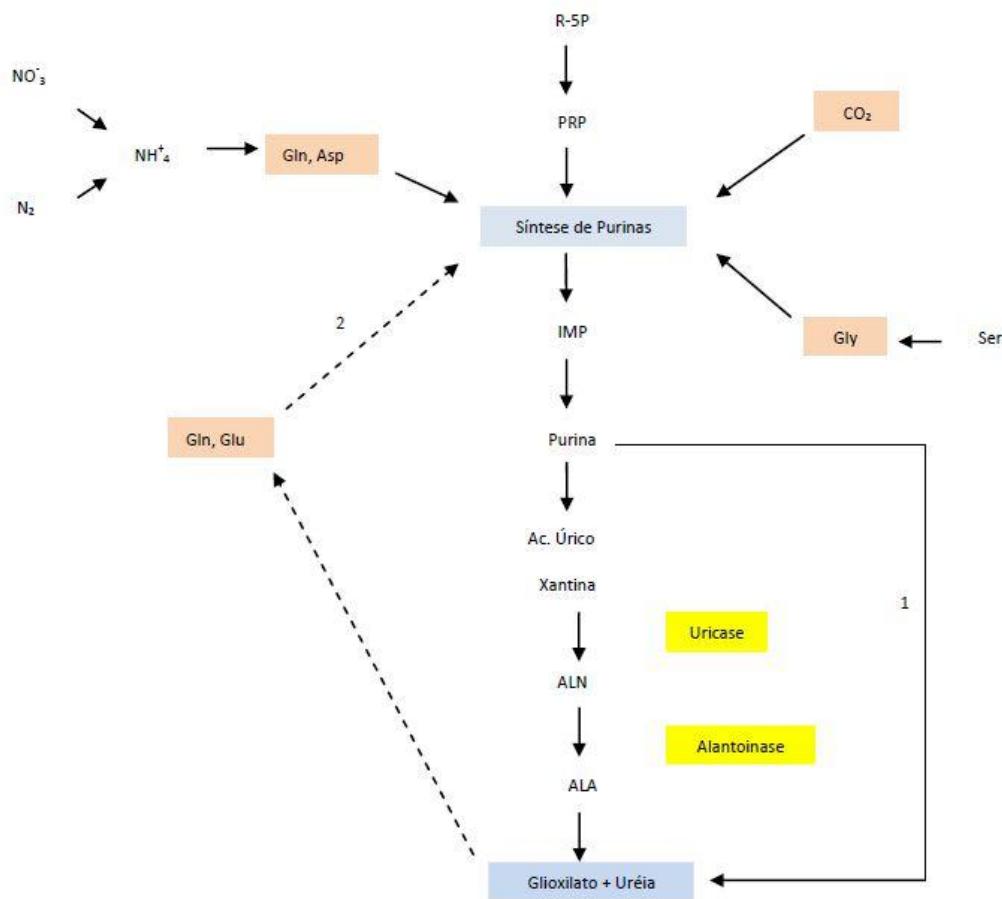


Figura 3- Possíveis vias metabólicas de ureídeos em plantas superiores. 1) Degradação da purina; 2) Reciclagem do glioxilato. R-5-P = Ribose-5-fosfato; PRPP = fosforribosilpirofosfato; IMP = Inosina monofosfato; ALN (alantoína); ALA (ácido alantóico) (Adaptado de Thomas e Schrader, 1981).

Estudos da composição bioquímica indicaram que o caule subterrâneo de *A. peregrinum* armazena grandes quantidades de alantoína (cerca de 17% da massa seca), uma possível estratégia utilizada por esta espécie para se estabelecer com sucesso como invasora (Grassi et al., 2005).

1.5.2 Iridoides

Os iridoides, como monoterpenos ciclopentanos, são sintetizados pela via do ácido mevalônico, sendo que os iridoides ocorrem em cerca de 60 família de plantas incluindo Bignoniaceae (Bowers, 1991, Castillo e Rossini, 2010).

São divididos em três grupos: iridoides glicosilados, iridoides agliconas e os

secoiridoides (Dinda et al., 2007).

A produção e acúmulo de metabólitos biologicamente ativos nas diferentes espécies vegetais e em seus diferentes órgãos podem ter controle genético ou as concentrações podem ser alteradas devido às mudanças de fatores ambientais como situações de estresse, onde ocorre excesso ou déficit de algum fator de sobrevivência para o vegetal (Katzung, 2003), sendo assim, a concentração dos compostos biologicamente ativos pode ser alterada por fatores abióticos e bióticos do meio onde a planta se encontra (Rodrigues e Carvalho, 2008).

Plantas contendo iridoides tem grande uso na medicina popular por apresentar várias atividades biológicas e farmacológicas, como antialérgica, anti-inflamatória, anticoagulante, antioxidante, antifúngica, antibacteriana, hematoprotetora e antiviral (Dinda et al., 2007). Além de todas esses usos, os iridoides ainda podem atuar como marcadores químicos de diversos gêneros e famílias.

A família Bignoniaceae é reconhecida também pela presença de iridoides com propriedade inseticida (Nieminan et al., 2003), onde algumas espécies especializadas evoluíram a capacidade de sequestrar iridoides e usá-los na defesa contra predadores (Bowers, 2003; Jamieson e Bowers, 2010).

Estudo realizado por Grassi e colaboradores (2005) com extrato de folhas e de órgãos subterrâneos de *A. peregrinum* identificou predominante no extrato de acetato de etila das folhas a presença de um iridoide glicosilado , esse iridoide foi isolado e usado para avaliar a atividade biológica no potencial inibitório de uma espécie herbívora. Esse composto não foi eficaz na mortalidade larval da espécie herbívora, mas foi capaz de reduzir 30% o peso larval da espécie.

1.6 Aplicação de CLAE-EM no estudo de citocininas e metabólitos secundários.

A espectrometria de massas assim como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) são técnicas consideradas mais versáteis e sensíveis, sendo ferramentas analíticas valiosas, apresentando capacidade de análises qualitativas e quantitativas em amostras ambientais, farmacêuticas, biológicas e em alimentos (Ribani et al., 2004).

A utilização do espectrômetro de massas como detector para o sistema cromatográfico possibilita a confirmação de identidade do composto de interesse através

dos dados sobre a sua massa e estrutura molecular. As informações são obtidas da relação massa sobre carga (m/z) do íon precursor gerado no processo de ionização e seus produtos de fragmentação provenientes das etapas seguintes de equipamentos de espectrometria de massas sequencial (EM/EM) (Gentili et al., 2005).

Detectores modernos como o espectrômetro de massas utilizam como método de comparação os espectros do pico obtido em uma separação com o de um padrão como indicação da presença de um composto puro (Swartz e Krull, 1998).

Para a análise de compostos em níveis muito baixos nos organismos a literatura tem descrito métodos baseados em cromatografia líquida combinada com espectrometria de massas (CLAE-EM) utilizando a ionização por *electrospray*. Esse método é utilizado em vários estudos de hormônios vegetais, permitindo a quantificação simultânea de vários compostos em uma única análise (Ge et al., 2006).

1.7 Ionização por *electrospray*

Inicialmente o conceito de *electrospray* foi proposto por Dole e colaboradores (1968), e a técnica de ESI (ionização por *electrospray*), um processo de transferência de íons pré-existentes em uma solução para a fase gasosa, permite a análise de moléculas polares possíveis de sofrer ionização (Moraes e Lago, 2003).

O ESI inicialmente foi considerado uma fonte de ionização apenas para proteínas. Posteriormente seu uso inicialmente indicado para biopolímeros e polímeros foi estendido para a análise de pequenas moléculas polares. Por ser uma técnica sensível e facilmente acoplável as técnicas de cromatografia líquida, se tornou muito útil para a maioria das classes de compostos (Fenn et al., 1989).

A ionização é realizada à pressão atmosférica, onde um campo elétrico intenso que dispersa uma amostra líquida em um gás, na forma de um fino spray de gotas carregadas que, por evaporação, ejetam íons na fase gasosa (Fenn et al., 1989; Crotti et al., 2006).

A ionização por *electrospray* é considerada a técnica analítica mais poderosa e amplamente utilizada, tendo como vantagens a alta sensibilidade e seletividade, facilidade no uso e consumo reduzido de amostra (Heck e Van den Heuvel, 2004).

A vantagem da técnica da ESI em relação as outras técnicas é a dessolvatação que ocorre em temperaturas relativamente baixas, desde a temperatura ambiente até 80° C. Essa dessolvatação a baixas temperaturas é eficiente por não gerar fragmentos

nem moléculas ionizadas (Moraes e Lago, 2003).

Desta forma, a avaliação comparativa de citocininas e de metabólitos secundários com o uso das técnicas de CLAE e espectrômetro de massas em raízes e caule de *A. peregrinum* durante o processo de regeneração da parte aérea, pode explicar, em parte, como as estratégias metabólicas propiciam a agressividade desta planta como invasoras de pastagens.

2. OBJETIVOS

- Obtenção de plântulas de *A. peregrinum* via germinação de sementes.
- Desenvolvimento de um método de extração eficiente para as citocininas e metabólitos secundários.
- Avaliação comparativa dos níveis de citocininas e metabólitos secundários em raízes e caules de plantas em processo de regeneração da parte aérea de *A. peregrinum*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Para certificação da identidade botânica das plantas matrizes doadoras de sementes à presente pesquisa, material fértil de *A. peregrinum* foi coletado, herborizado, identificado e depositado no herbário CGMS da UFMS sob o número 33487.

As sementes foram coletadas de plantas estabelecidas em áreas próximas do município de Campo Grande (Figura 4), nas quais *A. peregrinum* apresenta alta incidência. Como sementes de *A. peregrinum* são muito predadas sendo observado esse fato em todos os locais onde foram realizadas as coletas de sementes, houve sempre necessidades de se localizar grandes populações da espécie para suprir a demanda de sementes viáveis.



Figura 4- Áreas de coleta de *A. peregrinum* próximas ao município de Campo Grande MS (fotos: Thiago Henrique Stefanello).

3.1 Germinações das sementes em placa de Petri

Sementes de *A. peregrinum* foram colocadas para germinar em placas de Petri com algodão e 15 mL de solução de AG₃ (10 mg. L⁻¹). Foram colocadas 5 sementes previamente desinfestadas por placa. O processo de descontaminação das sementes consistiu na lavagem com detergente líquido e imersão em solução de hipoclorito de sódio (3%) por 10 minutos. Em seguida as sementes foram lavadas com água destilada e autoclavadas e em fluxo laminar tiveram o tegumento removido e foram colocadas nas placas previamente autoclavadas. Por fim, as placas foram vedadas com filme plástico tipo PVC e colocadas em câmara de germinação tipo B.O.D em temperaturas que variavam de 25 ±2 °C com fotoperíodo de 12 h, onde ficaram por 40 dias.

O acompanhamento da germinação das sementes foi realizado diariamente através da contagem do número de sementes germinadas.

Depois de germinadas e após atingirem 2 cm de radícula, as plântulas resultantes foram transferidas para copos plásticos contendo uma mistura de solo de cerrado+substrato comercial Tropstrato® (1:1). Após três dias as plântulas foram levadas para a casa de vegetação onde permaneceram por 4 meses até atingirem de 4 a 5 cm para a remoção da parte aérea.

3.2 Coletas de material para avaliação comparativa de citocininas e metabólitos secundários

Nas plantas de *A. peregrinum* estabelecidas em casa de vegetação foram realizadas remoção da parte aérea total para avaliar quantitativamente os níveis de

citocininas e de metabólitos secundários por ocasião do processo de regeneração.

Também foi realizada a remoção da parte aérea em plantas já estabelecidas no campo para a coleta de caule com o objetivo de analisar quantitativamente os níveis de citocininas e metabólitos secundários por ocasião do processo de regeneração. Procurou-se realizar essa remoção da parte aérea em plantas sem processo de regeneração anterior, ou seja, sem cicatriz. As plantas no campo foram cortadas 10 cm acima do solo, sendo a amostra de caule coletada para a análise retirada 5 cm da parte superior rente ao corte anteriormente realizado, como mostrado na Figura 5.



Figura 5- Remoção da parte aérea nas plantas de *A. peregrinum* no campo: 1) corte realizado a 10 cm do solo para remoção da parte aérea; 2) 5 cm da parte do caule utilizada para as análises. (foto: Vanessa Samúdio dos Santos).

A coleta das raízes na casa de vegetação e dos caules no campo foram realizadas com 7 plantas com 0, 5, 10, 15, 20 e 25 dias após a remoção da parte aérea.

Coletou-se amostras de raízes em casa de vegetação e de caule em campo de plantas que tiveram a parte aérea removida, raízes e caule foram lavados com água, fragmentados com o auxílio de uma tesoura e armazenadas em tubos Falcon de 15 mL.

Foi realizada a inativação enzimática no momento da coleta do material utilizando nitrogênio líquido para o congelamento das amostras que posteriormente foram colocadas em uma caixa de isopor com gelo até serem levadas para o ultrafreezer a uma temperatura de -80°C. O armazenamento no ultrafreezer também foi utilizado

para diminuir a atividade metabólica e degradação do material.

O processamento (coleta, lavagem, fragmentação e congelamento do material vegetal com nitrogênio líquido) foi realizado no local onde se encontrava as plantas.

A avaliação comparativa de citocininas e dos metabolitos secundários foram realizadas no laboratório de Ciências Farmacêuticas da USP de Ribeirão Preto utilizando CLAE-EM.

3.3 Desenvolvimentos do método de extração de citocininas e metabólitos secundários

O método de extração foi desenvolvido no intuito de extrair os compostos de interesse de forma eficiente, rápida, reproduzível e de forma mais seletiva possível. Foram realizados testes para avaliar a quantidade de material vegetal e solvente necessário para uma extração satisfatória.

Em relação à quantidade de material vegetal foram testados 50 mg, 100 mg, 500 mg, 1g, 5g e 10 g na proporção de material vegetal e solvente de 1:2. Para a extração foram testadas misturas de solventes: 1) N-propanol/H₂O/HCl concentrado (2:1:0,002 v/v/v), 2) etanol/ H₂O/ HCl concentrado (2:1:0,002 v/v/v), 3) metanol/ H₂O/ ácido fórmico (30:30:2,5 v/v/v) e (9:1:0,1 v/v/v) . Todas as extrações foram realizadas em ultrassom por 5, 10 e 15 minutos. Realizou-se a partição da amostra com clorofórmio, diclorometano, éter e hexano. As amostras foram secas em rotaevaporador e capela de exaustão. A ressolubilização foi testada com: 1) 100 µL de metanol e 100 µL de H₂O, 2) 50 µL de metanol e 50 µL de H₂O, 3) 100 µL de metanol e 100 µL de H₂O, 4) 200 µL de metanol, 200 µL de H₂O 5) 540 µL de H₂O e 80 µL de metanol e 6) acetonitrila/H₂O/ ácido fórmico (1:1:0,1 v/v/v).

3.4 Metodologia analítica para a avaliação comparativa das citocininas e metabólitos secundários

A metodologia analítica para a avaliação comparativa das citocininas e de alantoína foi desenvolvida em UPLC-DAD-EM/EM. O método foi baseado no estudo realizado por De Vos e colaboradores (2007). O equipamento utilizado foi um sistema ACQUITY UPLC-DAD-EM Waters, a coluna empregada foi uma ACQUITY 1,7µm BEH (*Ethylene Bridged Hybrid*) C18, com dimensões de 2,1x50mm, equipada com pré-coluna de material equivalente.

A fase móvel utilizada foi H₂O ultrapura (fase A) e acetonitrila (MeCN) (fase

B) contendo ambas 0,1% de ácido formico (CH_2O_2). A temperatura da coluna foi mantida a 40°C e as amostras acondicionadas a 20°C. O fluxo de fase móvel foi de 0,3mL/min e os volumes de injeção variaram de 2 a 5 μL de acordo com a concentração da amostra a ser analisada. Todas as amostras foram filtradas em membranas descartáveis de 13mm de diâmetro com poros 0,22 μm . Os seguintes gradientes de fase móvel foram empregados (Tabela 1).

Tabela 1: Gradientes de fase móvel empregados nas amostras aplicadas em UPLC-DAD-EM/EM.

Tempo (minutos)	A%	B%
0,01	97	3
5	96	4
8	95	5
9	0	100
11,50	97	3
13,00	97	3

Para avaliação comparativa de citocininas e metabótitos secundários foi utilizado o método MRM (*multiple reaction monitoring*) no modo positivo de ionização, monitorando os íons m/z e o fragmentos m/z (Tabela. 3) aumentando assim a seletividade e sensibilidade do método. Os parâmetros utilizados no detector de massas foram os seguintes:

- temperatura da fonte: 120°C
- temperatura de dessolvatação: 250°C
- fluxo de nitrogênio: 600 L/h
- gás utilizado na cela de colisão: argônio
- método MRM das citocininas: energia do cone 35kV e colisão 15eV
- método MRM da alantoína: energia do cone 20kV e colisão 15eV

Todos os solventes utilizados tanto nas extrações como nas análises por UPLC-DAD-EM foram grau espectroscópico (J.T. Baker[®]), além de água ultrapura (Milli-Q, Millipore[®]).

A aquisição e o processamento de dados foram realizados utilizando o software MassLynx 4.1.5 e as análises foram obtidas em modo de scan contínuo e MRM.

Para as análises de alta resolução foi utilizado o equipamento espectrômetro de

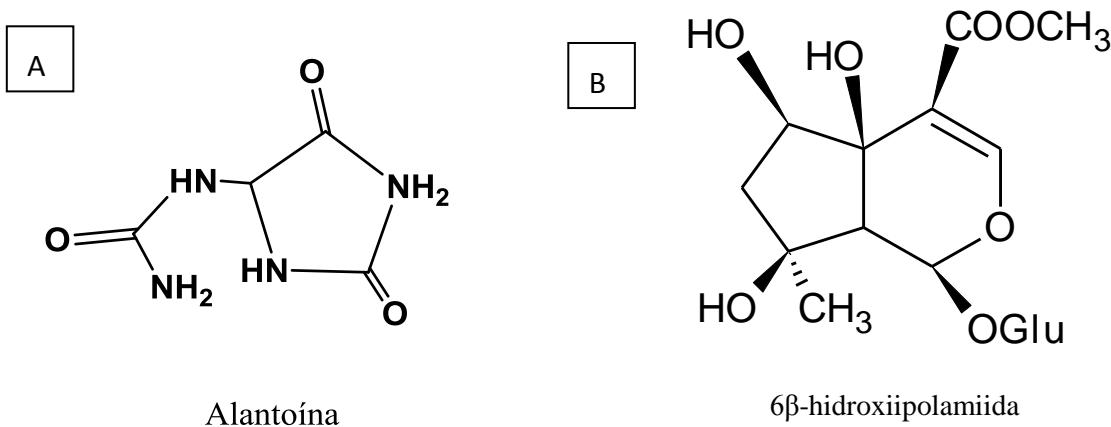
massas Orbitrap Exactive Thermo. Este equipamento oferece alta resolução de massa para fornecer resultados rápidos, precisos e reproduzíveis.

Nesse equipamento as análises foram realizadas com a seguinte fase móvel: (fase A) H₂O ultrapura e (fase B) acetronitrila (MeCN) ambas contendo 1% de ácido acético. Os seguintes gradientes de fase móvel foram empregados (Tabela 2).

Tabela 2: Gradientes de fase móvel empregados nas amostras aplicadas em espectrômetro de massas Orbitrap Exactive Thermo.

Tempo (minutos)	A %	B %
0.01	13	87
6.00	13	87
11.00	100	0
13.00	100	0
15.00	13	87
23.00	13	87
23.01		

Os compostos monitorados nas amostras foram alantoína, 11 citocininas e um composto da classe dos iridoides (Figura 6).



Estruturas das citocininas monitoradas.

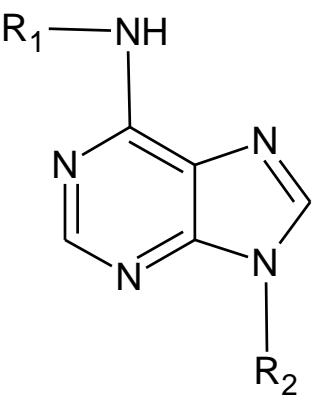
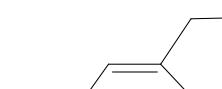
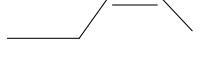
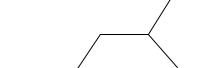
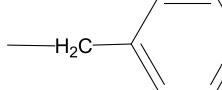
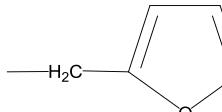
C	Nome comum	R1	R2
	isopenteniladenina		H
	isopenteniladenosina		Ribosil
	zeatina		H
	zeatina Ribosideo		Ribosil
	zeatina-9-glucosideo		Glucosil
	dihidrozeatina		H
	dihidrozeatina		Ribosil
	ribosideo		
	benziladenina		H
	benziladenosina		Ribosil
	benziladenina-9-glucoside		Glucosil
	cinetina		H

Figura 6- Estruturas dos compostos monitorados: A) alantoína, B) 6 β -hidroxiipolamiida, C) Núcleo comum das citocininas monitoradas , radical 1 e radical 2 das citocininas monitoradas.

Após o estabelecimento de um método de extração adequado foi possível monitorar os compostos e obter assim os tempos de retenção levando em consideração suas massas moleculares e os fragmentos por *electrospray* que já estavam descritos na literatura. Para confirmação de alguns tempos de retenção foram utilizadas soluções padrões, como no caso da cinetina, zeatina e alantoína, ambos da Sigma.

3.5 Análise dos dados

Os dados foram submetidos à análise estatística com nível de significância estabelecido em $p < 0,05$, a fim de verificar as possíveis diferenças entre as amostras.

Como os dados apresentaram distribuição normal, foi aplicado o teste ANOVA seguido do teste de Tukey.

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa GraphPad Prism 5.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O comportamento pioneiro da espécie utilizada neste estudo admite uma alta produção de sementes (Oliveira, 2009), mas que possuem um baixo nível de viabilidade, principalmente devido, à predação por insetos no campo. Esta característica dificultou a obtenção de indivíduos da espécie via sementes conforme discutido a seguir.

Uma observação importante realizada por Nunes e colaboradores (1999a) é que esta baixa viabilidade não interfere em sua capacidade de se estabelecer como invasora, uma vez que a espécie utiliza quase que exclusivamente a reprodução vegetativa para se propagar.

4.1 Germinação das sementes em placa de Petri

A germinação das sementes de *A. peregrinum* em placas de Petri iniciaram no 8º dia após o início do experimento e estenderam-se até o 29º dia sendo as observações da germinação realizadas diariamente até o 40º dia. Foram consideradas germinadas as sementes que iniciaram sua protrusão da radícula.

Das 425 sementes colocadas nas placas durante o experimento apenas 50% germinaram.

Observou-se que o pico de germinação das sementes ficou entre o 12º dia e o 17º após o início da montagem do experimento (Figura 7).

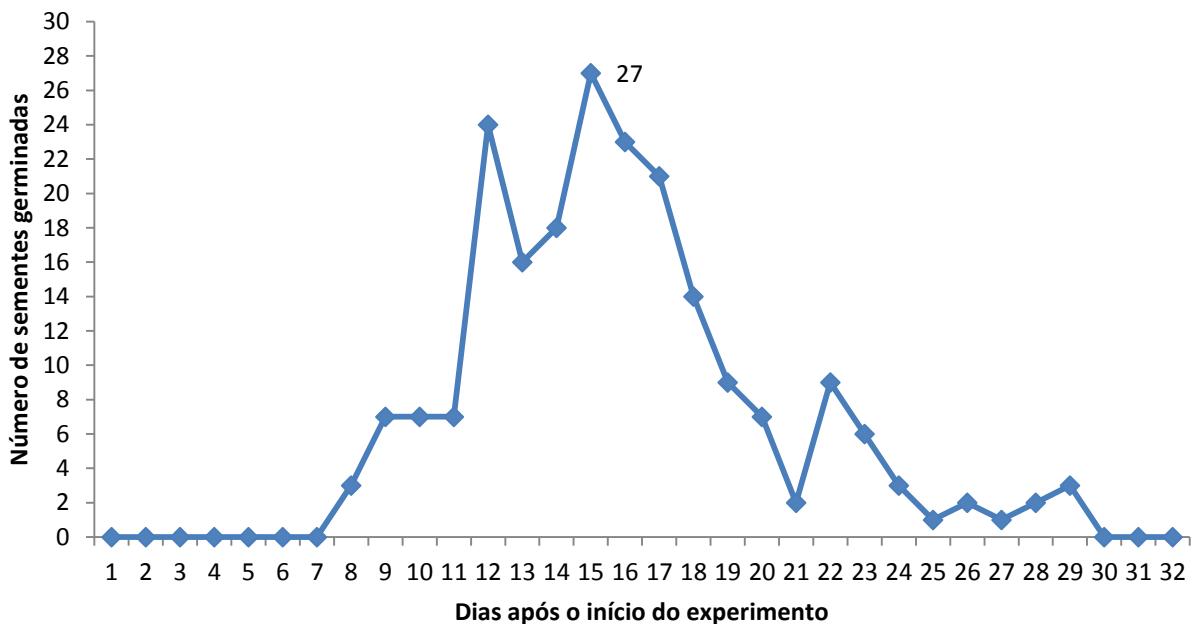


Figura 7- Número de sementes germinadas em relação aos dias de observação do experimento.

Observou-se a presença de fungos nas sementes depois da montagem do experimento (Figura 8), o que também pode ter influenciado na baixa porcentagem de germinação das sementes.

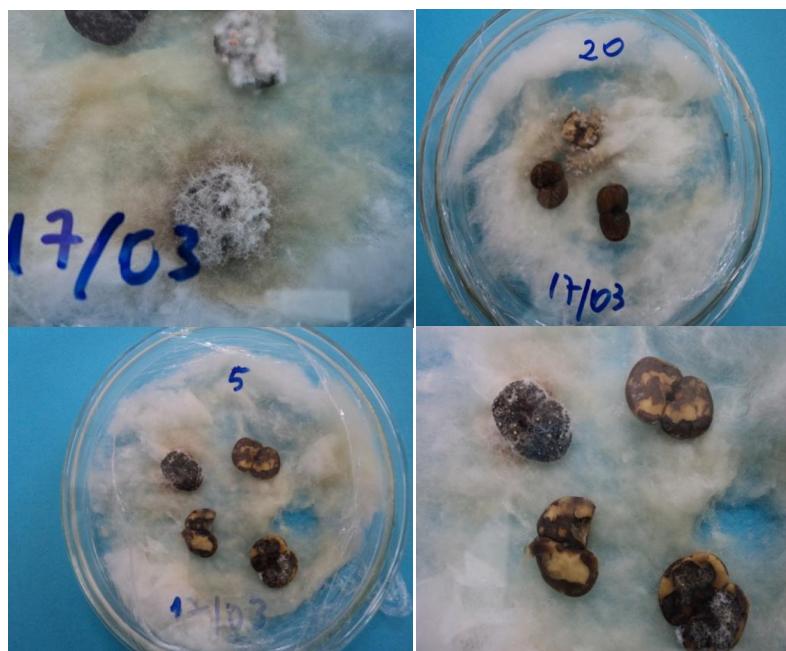


Figura 8- Fungos presentes nas sementes de *A. peregrinum* durante o processo de germinação em placas de Petri (fotos: Vanessa Samúdio dos Santos).

As plântulas que atingiram um comprimento maior que 2 cm de radícula e uma parte aérea maior que 1 cm (Figura 9) foram transferidas para os copos contendo a mistura de terra de cerrado+substrato comercial. Nesta etapa também ocorreu uma perda significativa de amostras pela morte de plântulas que foram transferidas. Após cinco dias, as plântulas foram transferidas para a casa de vegetação, colocadas em bandejas (Figura 10) até atingirem um porte adequado para se realizar a remoção da parte aérea.



Figura 9- Sementes germinadas em placa de Petri (foto: Thiago Henrique Stefanello).



Figura 10- Plântulas na casa de vegetação em processo de desenvolvimento após a transferência das placas para copos com mistura de substratos (fotos: Vanessa Samúdio dos Santos).

4.2 Remoções da parte aérea e regeneração das plantas de casa de vegetação e do campo

As plantas foram mantidas em casa de vegetação por 4 meses. As remoções das partes aéreas das plantas da casa de vegetação e do campo foram realizadas em um

período de 25 dias, sendo o intervalo de remoção de 5 dias (Figuras 12 e 13). Observou-se que as plantas nos dois locais analisados tiveram o mesmo comportamento iniciando a regeneração a partir do 10º dia (Figuras 11A e 11B).

No 25º dia as plantas da casa de vegetação e do campo já se apresentavam total recomposição da parte aérea (Figuras 12F e 13F), demonstrando que o período estipulado na metodologia foi o suficiente para a investigação das substâncias que poderiam atuar na regeneração da parte aérea.

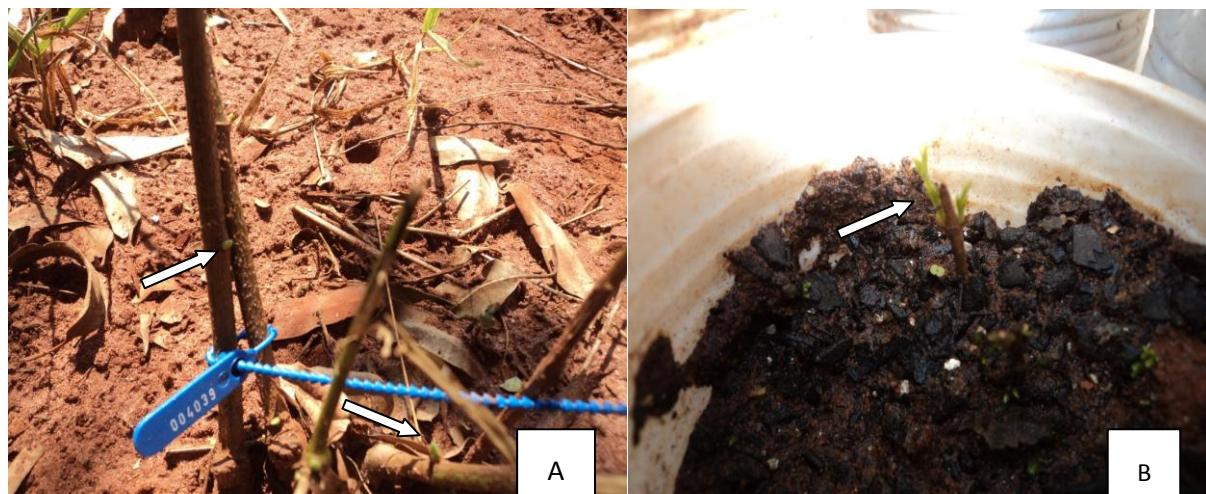


Figura 11 - Processo de regeneração de *A. peregrinum* de plantas estabelecida em campo (A) e em casa de vegetação (B), 10 dias após a remoção da parte aérea (fotos: Vanessa Samúdio dos Santos).

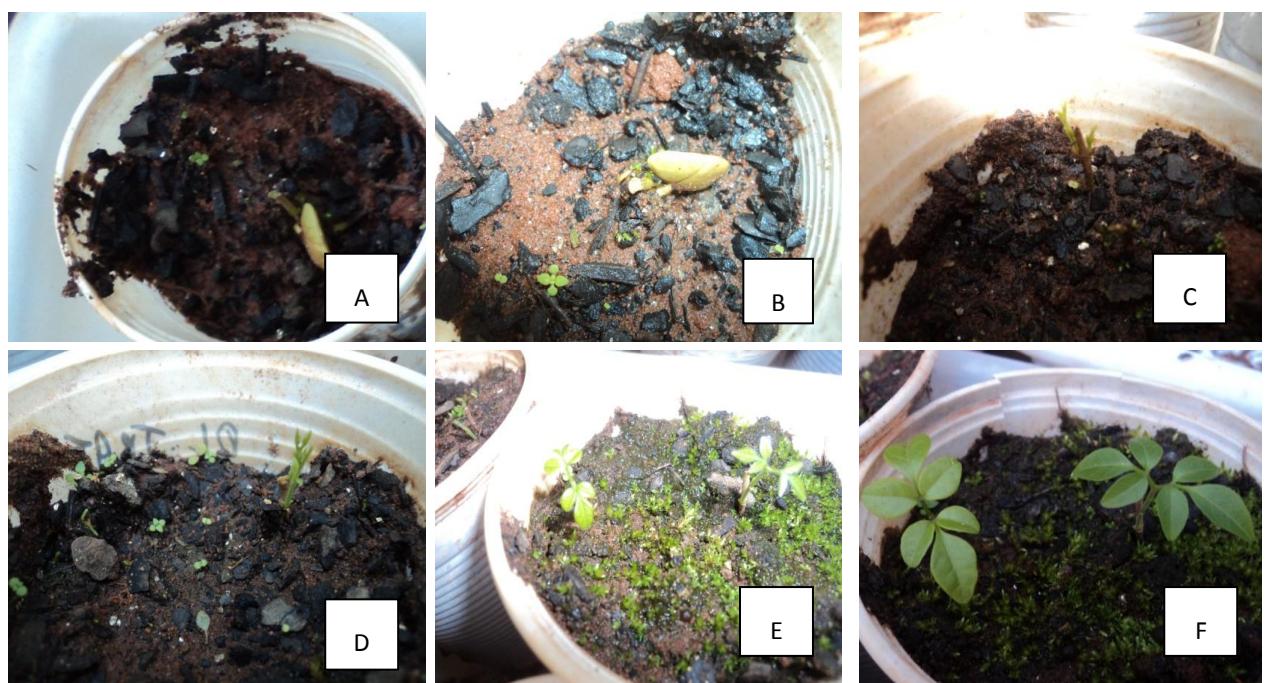


Figura 12- Processo de regeneração de plantas *A. peregrinum* cultivadas em casa de vegetação

que tiveram a parte aérea removida. Acompanhamento realizado a cada 5 dias, totalizando 25 dias. A) Planta no dia da remoção da parte aérea, B) Planta após 5 dias após a remoção da parte aérea, C) Primeiros brotos em *A. peregrinum* com 10 dias após a remoção da parte aérea, D) Planta com 15 dias após a remoção da parte aérea, E) Planta com 20 dias após a remoção da parte aérea e F) Planta com 25 dias após a remoção da parte aérea (otos: Vanessa Samúdio dos Santos).

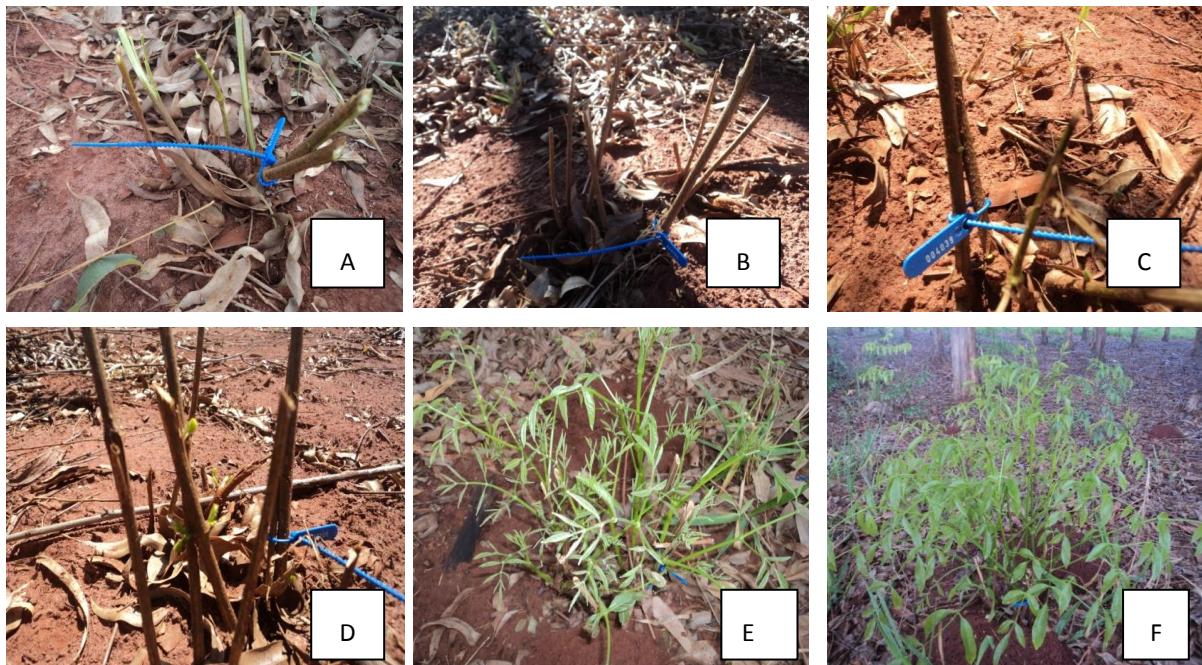


Figura 13 - Processo de regeneração de plantas de *A. peregrinum* cultivadas em campo e que tiveram a parte aérea removida. Acompanhamento realizado a cada 5 dias, totalizando 25 dias. A) Planta no dia da remoção da parte aérea, B) Planta após 5 dias após a remoção da parte aérea, C) Primeiros brotos em *A. peregrinum* com 10 dias após a remoção da parte aérea, D) Planta com 15 dias após a remoção da parte aérea, E) Planta com 20 dias após a remoção da parte aérea e F) Planta com 25 dias após a remoção da parte aérea (otos: Vanessa Samúdio dos Santos).

Segundo Nakamura e colaboradores (2006), perturbações realizadas na parte aérea de plantas provocadas por perturbações tanto naturais como antrópicas tem o potencial de estimular o crescimento vegetativo e reprodutivo de plantas. A regeneração da parte aérea de *A. peregrinum* tanto no campo quanto na casa de vegetação foi rápida se comparada ao crescimento normal da planta sem perturbações mecânicas, e observou-se que a espécie apresenta um vigoroso rebrote, sendo o crescimento mais rápido em relação aquelas que não tiveram a parte aérea removida.

Tanto plantas mais jovem de *A. peregrinum* cultivadas em casa de vegetação quanto as plantas adultas do campo apresentaram um comportamento semelhante, indicando que a idade da planta não influenciou as análise dos compostos que estariam agindo na regeneração, já que as plantas dos dois locais analisados regeneraram no mesmo período e apresentaram a regeneração total no mesmo período de tempo. Sendo assim indivíduos de *A. peregrinum* apresentam o mesmo poder regenerativo tanto nos indivíduos jovens como os adultos.

4.3 Análise por UPLC-DAD-EM

O grande desafio para o monitoramento de citocininas em geral é a quantidade extremamente baixa desses compostos nos tecidos vegetais (Peres et al., 1997; Peres e Kerbauy, 2004) dificultando a dosagem desta classe de composto.

Em *A. peregrinum* observou-se também quantidades de citocininas extremamente baixas nos tecidos vegetais, o que exigiu diversos testes em relação a solventes e métodos de extração destes compostos.

O método de extração mais eficiente foi obtido com 50 mg de material vegetal, aos quais adicionou-se 2 mL de solução de extrativa composta de metanol/ H₂O/ ácido fórmico (9:1:0,1 v/v/v). Em seguida a amostra foi extraída por 15 minutos no ultrassom, que tornou o processo mais rápido e eficiente. Após a etapa de extração retirou-se 1,5 mL do sobrenadante que foi adicionado em *eppendorf* sendo realizada uma partição com 500 µL de hexano. Após 10 minutos retirou-se o hexano, e o sobrenadante foi armazenado em tubos de ensaio devidamente identificados sendo levados para secar em speedvac por 10 horas com temperatura de 45°C . Realizou-se a resolubilização da amostra com 300 µL de fase móvel composta de acetonitrila/H₂O/ ácido fórmico (1:1:0,1 v/v/v). Todas as extrações foram feitas em triplicatas e o volume de injeção foi de 5 µL.

Foi realizado o monitoramento de 13 compostos e 12 compostos foram detectados no equipamento com os seguintes fragmentos e tempos de retenção (Tabela 3).

Tabela 3 - Compostos, abreviações, massa molecular, tempo de retenção e os fragmentos dos compostos analisados por espectrometria de massas.

Nome comum	Abreviação	Massa molecular	Tempo de retenção (min)	Íon produto (m/z)
alantoína	ALN	159,0512	0,50	116 -
6β-hidroxiipolamiida	-	405,1385	6,41	193 175
isopenteniladenina	iP	204, 1243	3,67	136 119
cinetina	KIN	216,0879	4,79	148 81
zeatina	Z	220,1192	0,54	136 119
dihidrozeatina	(dIH)Z	222,1349	0,55	136 148
benziladenina	BAP	226,1087	6,24	91 -
isopenteniladenosina	[9R]iP	336,1666	9,04	136 204
zeatina ribose	[9R]Z	352,1615	0,58	220 136
dihidrozeatina ribose	(dIH)[9R]Z	354,1771	1,65	222 136
benziladenosina	[9R]BAP	358,1509	-	226 91
zeatina-9-glucosídeo	[9G]Z	382,1721	0,52	220 136
benziladenina-9-glucosídeo	[9G]BAP	388, 1615	6,43	226 91

O cromatograma obtido do extrato de *A. peregrinum* (Figura 14) mostra além das citocininas e da alantoína, picos de compostos que não foram identificados e um composto da classe dos iridoides (Figura 14) que posteriormente foi realizada uma proposta de fragmentação vendo que não se encontrou na literatura dados de fragmentos para identificação desse composto.

O cromatograma obtido em *full scan* (Figura 14), cromatograma de UV 210 nm (Figura 15) e espectro de massas obtido em *full scan* do extrato de *A. peregrinum* (Figura 16).

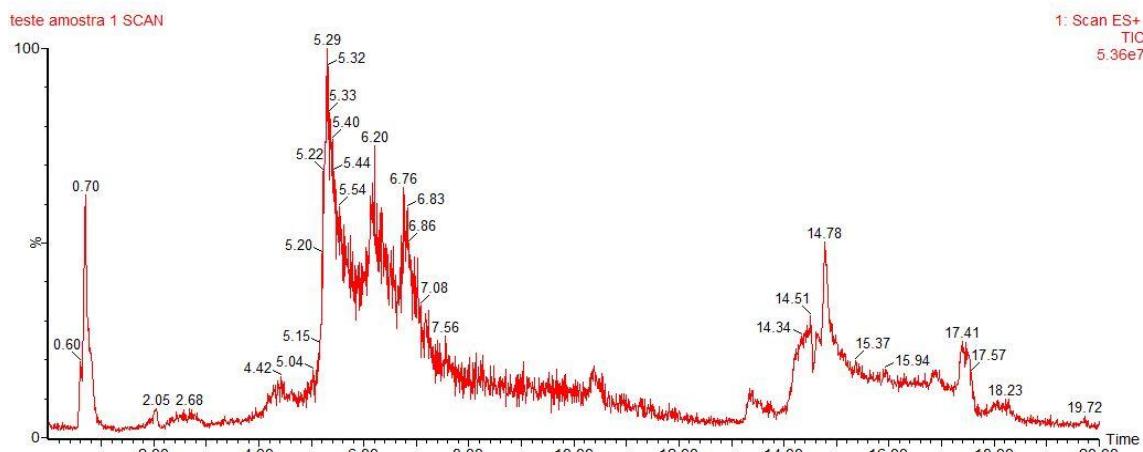


Figura 14 - Cromatograma do extrato da raiz de *A. peregrinum* obtido por UPLC-EM no modo *full scan* de amostra de casa de vegetação com 10 dias após a remoção da parte aérea.

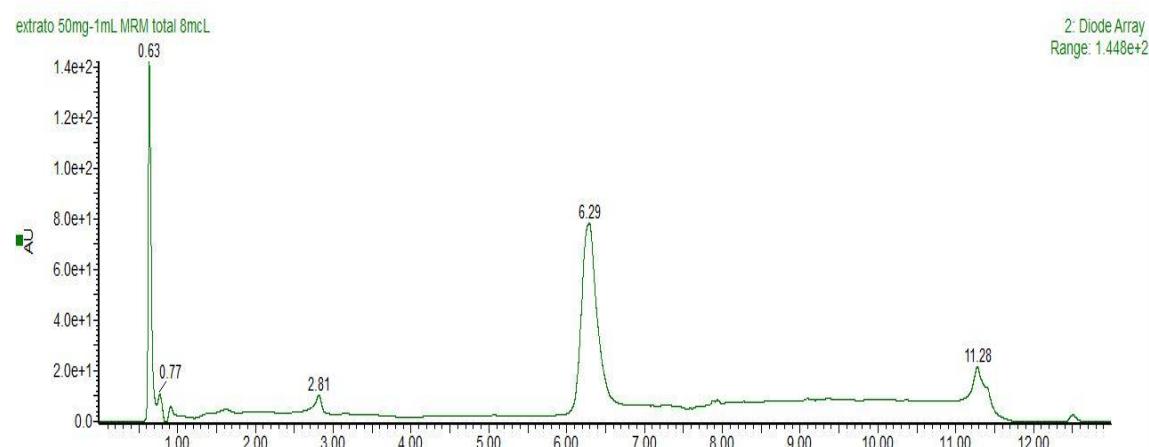


Figura 15 - Cromatograma do extrato da raiz de *A. peregrinum* obtido por DAD (210 nm) de amostra de casa de vegetação com 10 dias após a remoção da parte aérea.

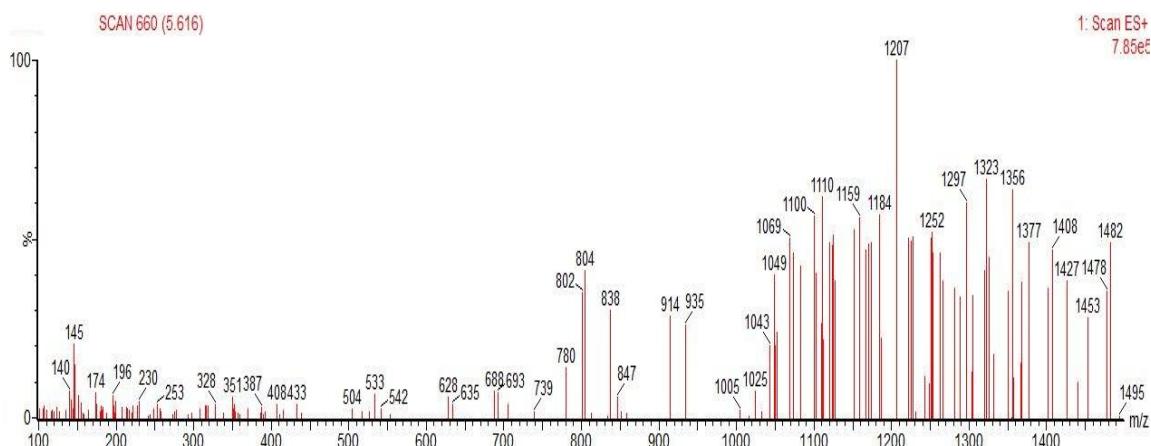


Figura 16- Espectro de massas de primeira ordem obtido por UPLC-EM (*full scan*), em modo positivo, do extrato da raiz de *A. peregrinum* com 10 dias após a remoção da parte aérea.

A análise por UPLC-DAD-EM foi capaz de detectar a presença de citocininas,

alantoína e do iridoide 6β -hidroxiipolamiida em *A.peregrinum*. De todas as citocininas monitoradas, algumas ficaram somente no nível de detecção do equipamento, não sendo possível sua quantificação devido a baixa relação sinal/ruído (Inmetro, 2003), esses compostos foram apenas monitoradas quanto a sua presença ou ausência nas amostras. Apenas a alantoína, a cinetina e o iridoide glicosilado 6β -hidroxiipolamiida (Figura 17) apresentaram áreas adequadas para a realização da análise comparativa, sendo que as essas áreas foram integradas e utilizadas para a avaliação comparativa dos compostos entre os períodos de regeneração das plantas tanto na casa de vegetação como no campo.

Para a confirmação da identidade dos compostos foram utilizadas as informações do estudo realizado por Bartok e colaboradores (1996), onde foi realizada a identificação dos íons filhos por ionização por *electrospray* de citocininas naturais e sintéticas.

Alantoína

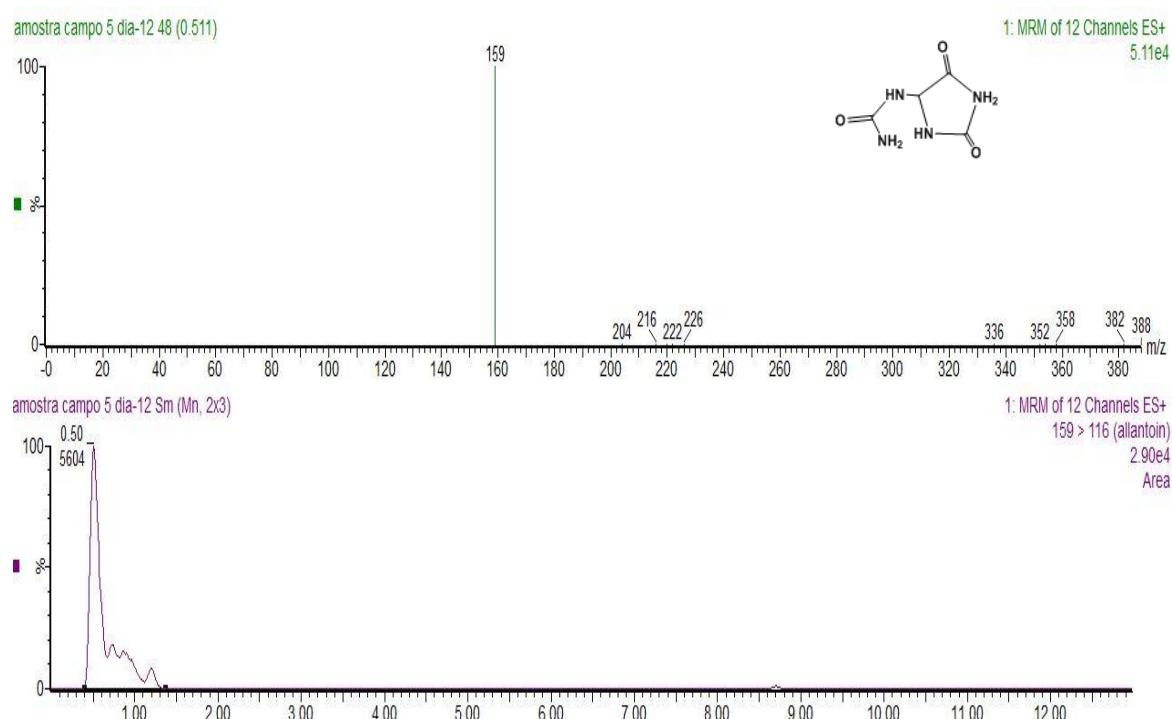
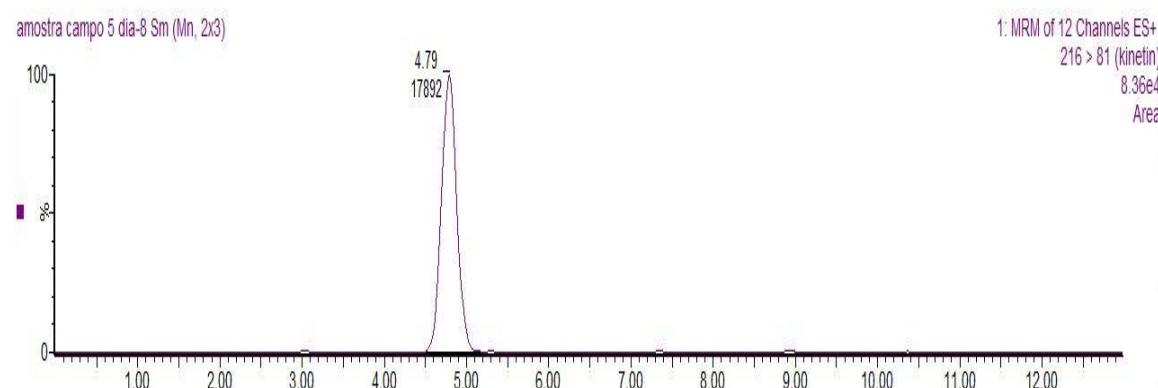
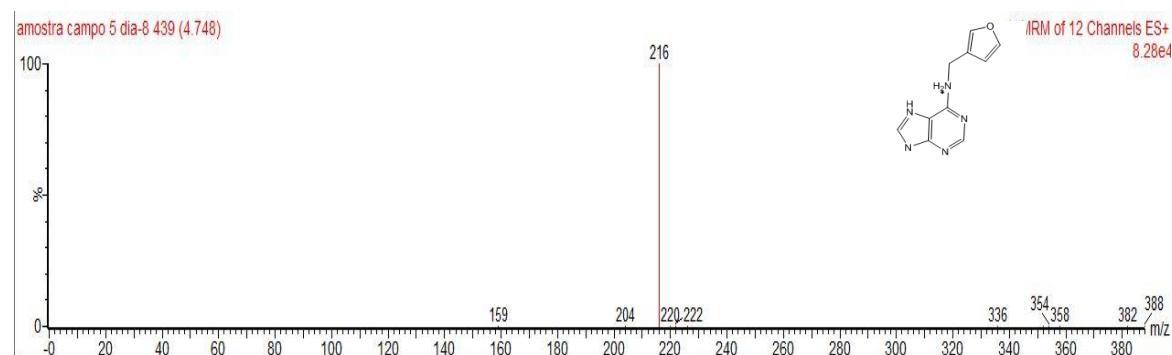


Figura 17 - Espectros de massas e cromatogramas de alantoína, cinetina e 6β -hidroxiipolamiida obtidos por UPLC-DAD-EM no método de MRM e Scan em extratos de raiz com 25 dias após a remoção da parte aérea no viveiro (continua).

Cinetina



6β-hidroxiipolamiida

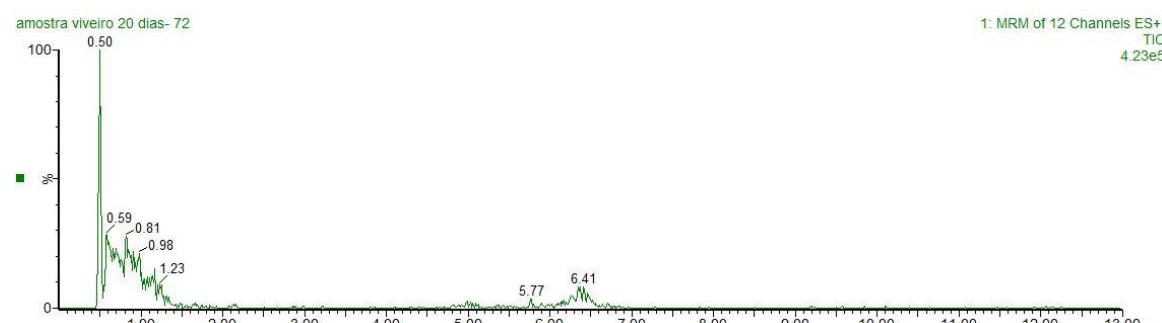
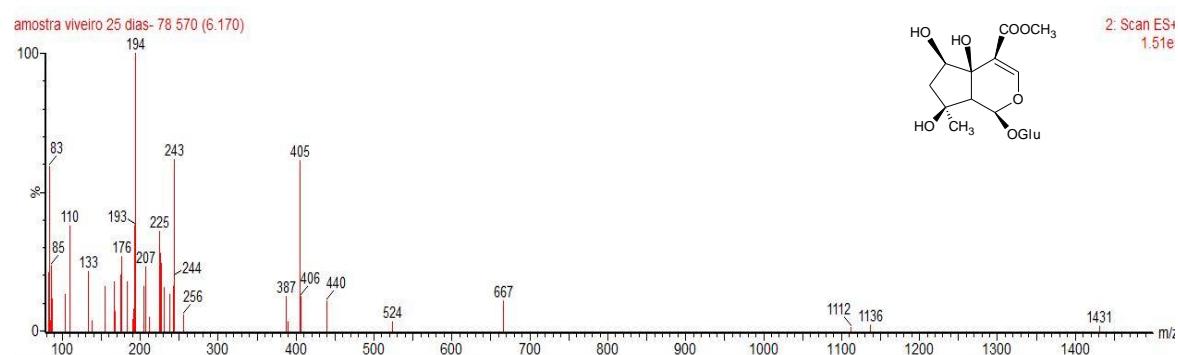


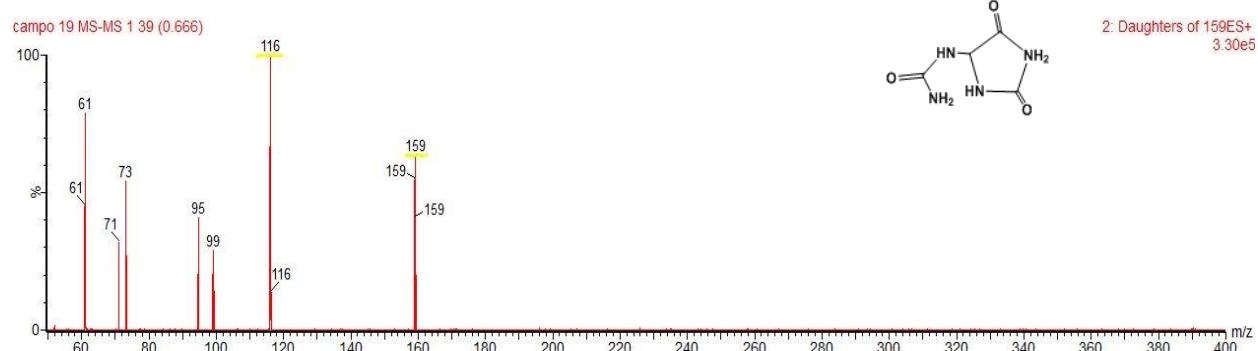
Figura 17 - Espectros de massas e cromatogramas de alantoína, cinetina e 6β-hidroxiipolamiida obtidos por UPLC-DAD-EM no método de MRM e Scan em extratos de raiz com 25 dias após a remoção da parte aérea no viveiro.

Os íons dos compostos de maior concentração que foram observados nesse estudo foram selecionados e submetidos a dissociação.

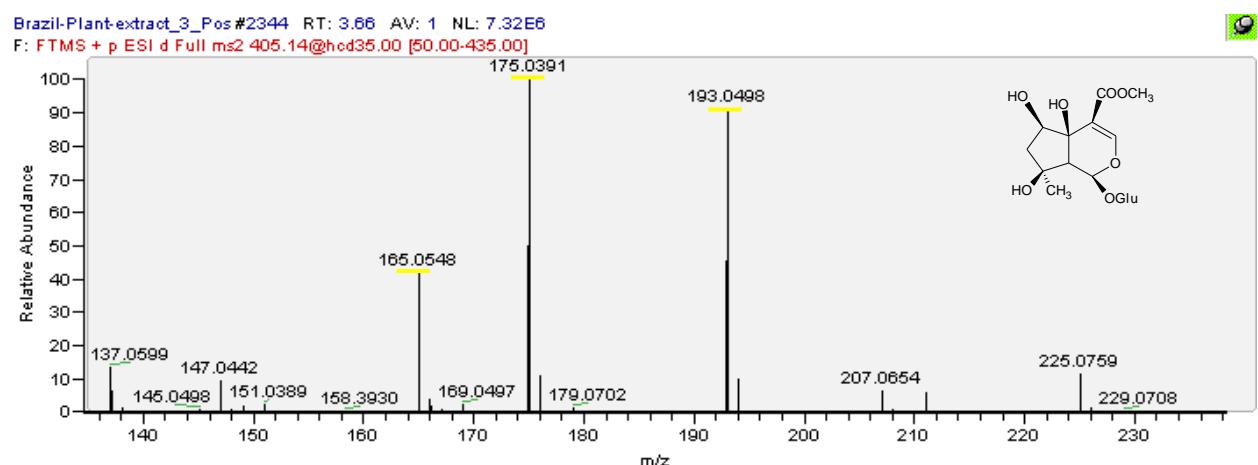
Os fragmentos obtidos por colisão de impactos de elétrons comprovaram a identidade dos compostos analisados (Figura 18) (Bartok et al., 1996).

Na alantoína foi detectado o fragmento m/z 116, no iridoide 6β -hidroxiipolamiida os íons observados foram o m/z 193, m/z 175 e m/z 165. Na cintetina foram formados os íons m/z 148 e m/z 81, característicos deste composto isolados também no estudo de Bartok e colaboradores (1996) onde foi utilizada a técnica de ionização por *electrospray* e dissociação induzida por colisão (CID) para a identificação dos íons filhos de citocininas naturais e sintéticas.

Alantoína m/z 159



6β -hidroxiipolamiida m/z 405



Cinetina m/z 216

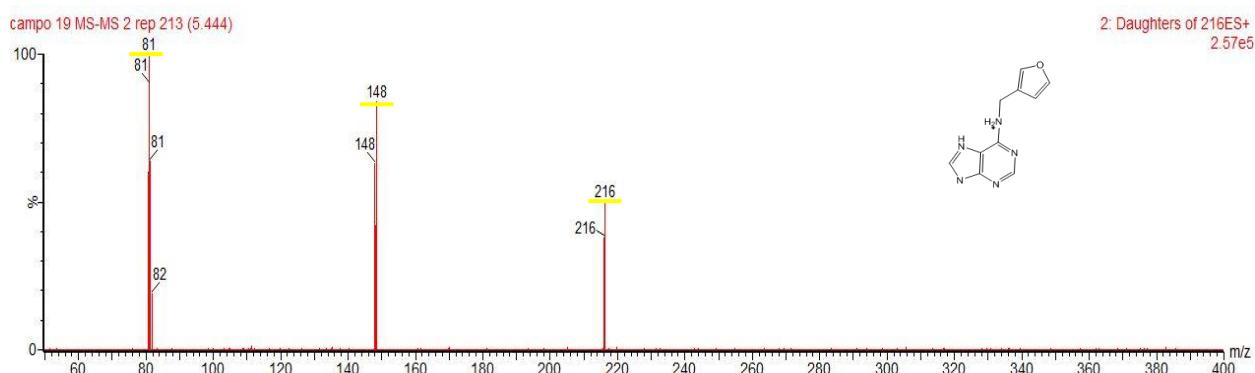


Figura 18: Espectro de massas obtidos de alantoína, 6 β -hidroxiipolamiida e cinetina no método de ESI(+)EM/EM em extratos de caule e raiz com 10 dias após a remoção da parte aérea em campo e em casa de vegetação.

De acordo com as análises realizadas por UPLC-DAD-EM houve diferença significativa entre os períodos de regeneração de *A. peregrinum*, sendo que a concentração máxima dos compostos acompanharam o início da regeneração da planta, o que pode provavelmente indicar que as citocininas e alantoína estão agindo na regeneração da planta após a remoção da parte aérea. As citocininas desempenham um papel importante na indução da divisão celular e proporciona a proliferação da parte aérea da planta (Santiago, 2001).

Na comparação dos períodos de regeneração de plantas da casa de vegetação houve diferença significativa na concentração de alantoína entre os dias 0, 10°, 15° e 25° após a remoção da parte aérea (Figura 19), demonstrando que quando iniciou a regeneração da parte aérea, no 10° dia houve um aumento na produção da alantoína nas raízes das plantas e isso seguiu até o último dia de observação, onde as plantas já com sua parte aérea regenerada mas que ainda apresentavam um crescimento dessas brotações. Houve também diferença significativa na concentração de alantoína entre o 5° dia, 15° e 25° dia após a remoção da parte aérea.

A concentração de alantoína em plantas que tiveram a parte aérea removida no campo não apresentaram diferença significativa entre as amostras (Figura 19). Embora possa se observar uma tendência de aumento que coincide com os dias iniciais das brotações.

Alantoína já foi encontrada em grande quantidade em *A. peregrinum* em outros estudos sendo encontrada também em outras espécies da família Bignoniaceae. Ferreira

e colaboradores (2000) constataram em seus estudos que a concentração desse ureídeo foi considerada alta em órgãos subterrâneos em *A. peregrinum*. A alta concentração desse ureídeo associada ao comportamento de *A. peregrinum* pode sugerir uma relação de estratégia adaptativa e de competitividade com outras espécies (Grassi et al., 2005).

A disponibilidade de nitrogênio tem sido considerada um dos principais fatores limitantes ao crescimento das plantas (Raven et al., 2001). Estudos realizado por Marchetti (2006), que teve por objetivo quantificar alguns compostos nitrogenados em indivíduos não podados e podados mecanicamente de *A. peregrinum*, pode-se observar que o nitrogênio total foi em média 30% maior em rizomas de indivíduos podados, resultado que indicou o aumento do metabolismo geral de compostos nitrogenados nesses indivíduos podados.

Além do armazenamento, a alantoína está relacionada com a assimilação, transporte e acúmulo de nitrogênio em plantas que fixam nitrogênio (Schubert e Boland, 1990).

Nos estudos realizados por Marchetti (2006), utilizando a metodologia de cortes dos ramos aéreos de *A. peregrinum* já estabelecidas no campo, com corte cerca de 10 cm acima do solo com o objetivo de comparar a taxa de crescimento e a concentração de ureídeos de um grupo de indivíduos que tiveram a parte aérea removida e um grupo controle, obteve como resultado que em *A. peregrinum* ocorreu o deslocamento de uma grande quantidade de ureídeos do caule subterrâneo para a parte aérea após o corte mecânico além de um aumento na concentração desses ureídeos em alguns meses após o corte sugerindo esses compostos foram utilizados na produção de novos tecidos vegetais.

O processo de deslocamento de alantoína que pertence a classe de ureídeos também foi observado nesse estudo onde plantas que tiveram remoção da parte aérea no campo demonstraram um aumento de alantoína no caule possivelmente resultado desse deslocamento de alantoína da parte subterrânea para a parte em regeneração e também foi observado um aumento na concentração nas plantas após a realização da poda, mostrando que a alantoína possivelmente está agindo na formação dos novos tecidos reforçando o estudo realizado por Marchetti (2006), sendo que esses resultados corroboram para os estudos do controle da espécie como invasora de pastagens.

Os estudos realizados para analisar as concentrações de ureídeos em plântulas de *A. peregrinum* também confirmam a hipótese estabelecida por Grassi e colaboradores (2005) de que a espécie tanto produz como armazena ureídeos nas raízes e rizomas e

que pode transportar para os outros tecidos da plântula, utilizando esse mecanismo para ter vantagens sobre as outras espécies e se estabelecer como uma espécie invasora.

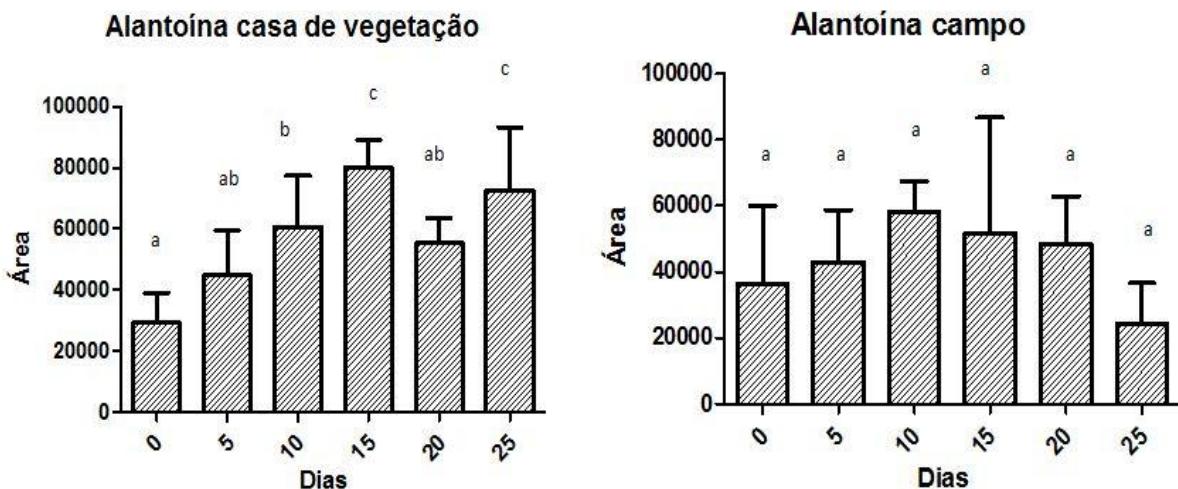


Figura 19 - Dados da integralização dos picos de alantoína presentes nas amostras de raiz de *A. peregrinum* em diferentes períodos após a remoção da parte aérea em plantas cultivadas em casa de vegetação e no campo.

*Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Em relação a concentração de citocininas foi observado, tanto nas plantas que tiveram a parte aérea removida em casa de vegetação quanto as plantas que passaram por esse mesmo processo de remoção da parte aérea no campo que de todas as citocininas propostas inicialmente para a avaliação comparativa nas plantas em processo de regeneração que apenas a cinetina foi observada em níveis quantificáveis, as outras citocininas foram detectadas mas em níveis extremamente baixos nos tecidos vegetais de *A. peregrinum* confirmando também o que Peres e colaboradores (1997); Peres e Kerbauy (2004) afirmaram sobre as quantidade desses hormônios nos tecidos de plantas.

Nas plantas com a parte aérea removida em casa de vegetação observou-se diferença significativa entre as concentrações de cinetina entre o 10º, 20º e 25º dias após a remoção da parte aérea, demonstrando também que a concentração de cinetina teve um aumento quando a planta teve o início da regeneração (Figura 20).

As plantas que tiveram a parte aérea removida no campo apresentaram uma diferença significativa em relação a concentração de cinetina entre o 5º e o 15º dias após a remoção da parte aérea (Figura 20).

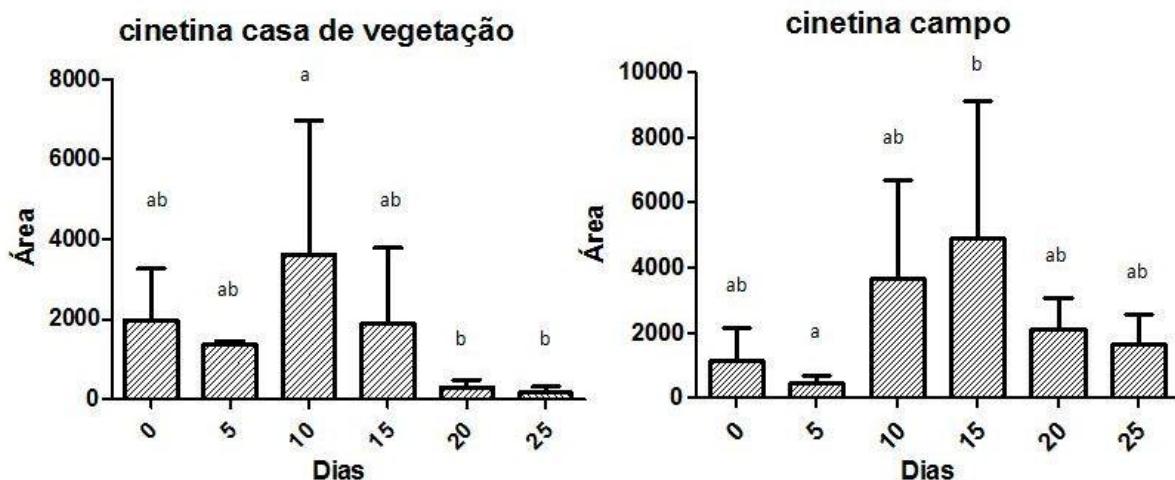


Figura 20- Dados da integralização dos picos de cinetina presentes nas amostras de campo de *A. peregrinum* em diferentes períodos após a remoção da parte aérea em plantas cultivadas em casa de vegetação e do campo.

*Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Observou-se que tanto a alantoína quanto a cinetina tiveram o início do aumento da concentração no mesmo período em que as plantas iniciaram o processo de regeneração indicando que as substâncias analisadas provavelmente tiveram participação na regeneração da planta.

O iridoide 6 β -hidroxiipolamiida (Figura 21) encontrado neste estudo já foi isolado em raízes de *Stachytarpheta mutabilis* (Verbenaceae) (De Luca et al., 1983), em partes aéreas em um estudo realizado com *Wiedemannia orientalis* (Lamiaceae) por Güvenalp e colaboradores (2006) e em extratos de folhas de *A. peregrinum* por Grassi e colaboradores (2005).

A classe de iridoídes isoladas em *A. peregrinum* apresenta importância por diminuir a taxa de crescimento de muitos insetos herbívoros generalistas por inibir a alimentação destes (Darrow e Bowers, 1999).

Grassi e colaboradores (2005) demonstraram que este iridoide foi ineficiente na mortalidade de *Anagasta kuehniella* que é um predador de produtos armazenados e nesse caso foi utilizado como um modelo para demonstrar o desempenho de diferentes metabólitos na defesa de plantas, porém este composto foi capaz de reduzir em 30% o peso dessas larvas, sendo que o iridoide foi eficiente para a defesa de *A. peregrinum* em relação a esse herbívoro.

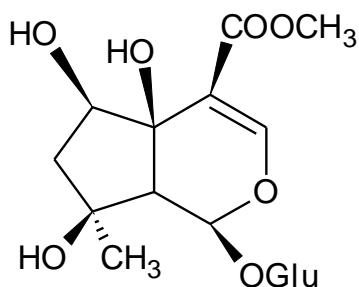


Figura 21- Iridoide 6 β -hidroxiipolamiida encontrado em raiz e caule de *A.peregrinum*.

O composto de massa m/z 405,1886 foi analisado no modo de ionização de *electrospray* (modo positivo) em alta resolução (Figura 22), através da sua massa molecular e através de relatos na literatura pode se identificar o composto como sendo o iridoide 6 β -hidroxiipolamiida já isolado em extratos de folhas e órgãos subterrâneos de *A. peregrinum*. Esses compostos como essa massa molecular também foram detectados em baixa resolução. Foram encontradas informações sobre a massa molecular e outras característica desse iridoide na literatura, o que se observou foi uma falta de dados relacionado com os fragmentos gerados por colisão de impactos de elétrons desse composto. Nesse estudo foi sugerida uma proposta de fragmentação desse iridoide onde o composto inicial pode sofrer uma desidratação na fonte na posição 5 e pode fragmentar perdendo um açucar glucopiranosideo observado através do fragmento m/z de 193,0495, que pode sofrer uma desidratação com a perda de H₂O gerando o pico em m/z de 175, 0390 e pode fragmentar e perder um grupo O-metil dando origem a um fragmento em m/z de 165,0549, sendo essas fragmentações ilustrada na Figura 23.

Brazil-Plant-extract_3_Pos #2344 RT: 3.66 AV: 1 NL: 7.32E6
 F: FTMS + p ESI d Full ms2 405.14@hcd35.00 [50.00-435.00]

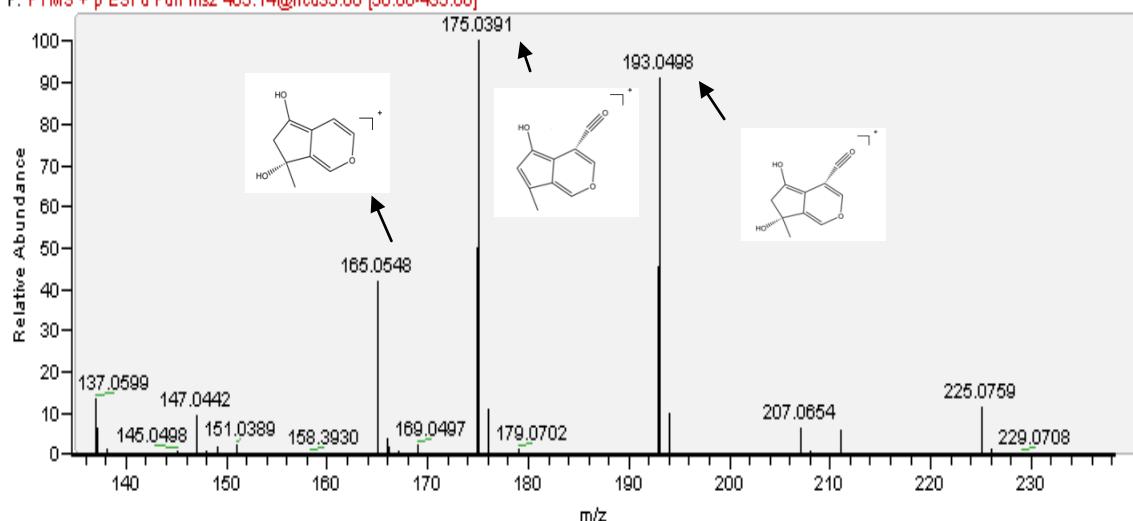


Figura 22- Espectro de massas de segunda ordem dos íons precursores de m/z 405,1886, obtido em modo positivo.

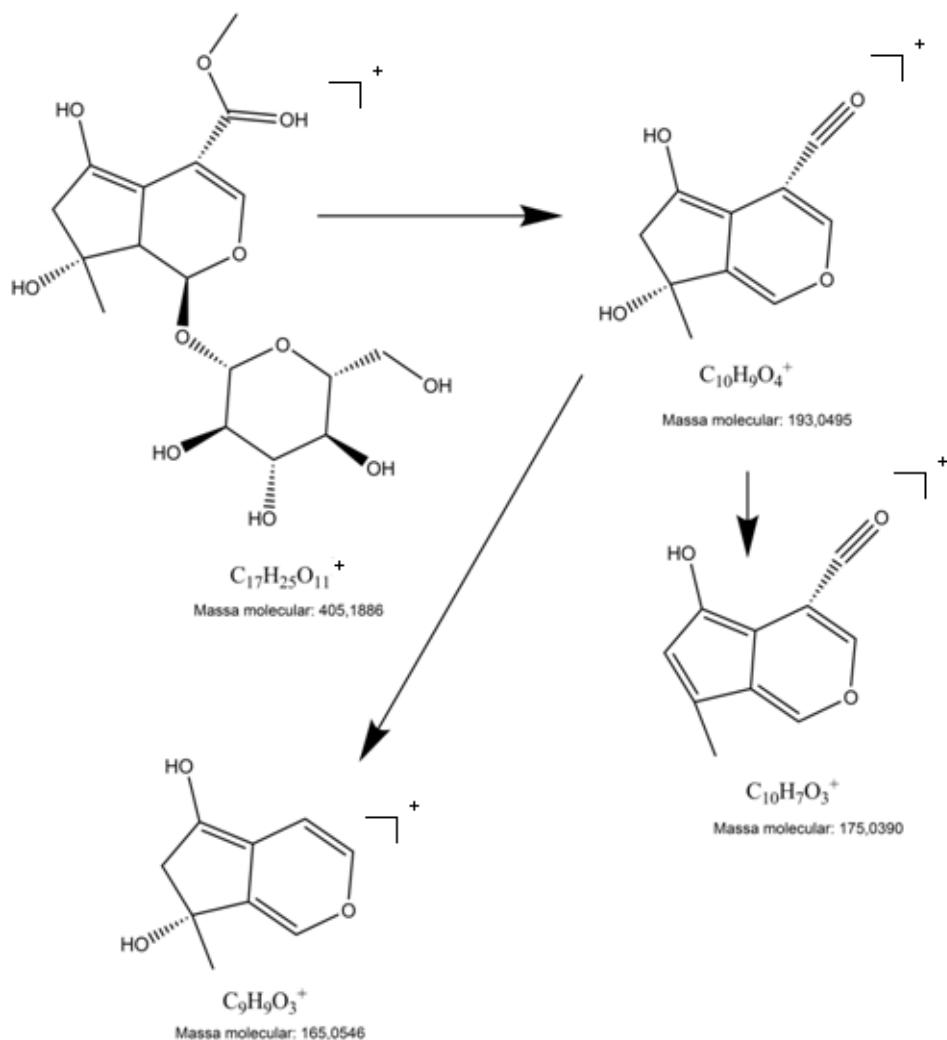


Figura 23- Proposta de fragmentação para o íon de m/z 405,1886.

A concentração desse iridoide nas plantas cultivadas em casa de vegetação aumentou com o início da regeneração da planta que ocorreu por volta do 10º dia após a remoção da parte aérea, havendo diferença significativa entre o 5º ao 25º dias após a remoção da parte aérea, e para plantas do campo houve diferenças entre o 10º e o 15º, 20º e 25º dia após a remoção da parte aérea (Figura 24).

As plantas que tiveram a parte aérea removida no campo não apresentaram diferença significativa em relação a concentração desse iridoide em relação ao período de regeneração das plantas (Figura 24).

Nas plantas que tiveram a parte aérea removida em casa de vegetação houve um aumento da concentração desse iridoide a partir do 10º dia e essa concentração permaneceu sem diferença significativa até a planta estar completamente regenerada (Figura 24).

Já em plantas que passaram pelo processo de remoção da parte aérea no campo houve um aumento da concentração do iridoide com o início de regeneração das plantas que tiveram a parte aérea removida, com leve redução posterior. No entanto, esta queda na concentração não foi em nível significativo.

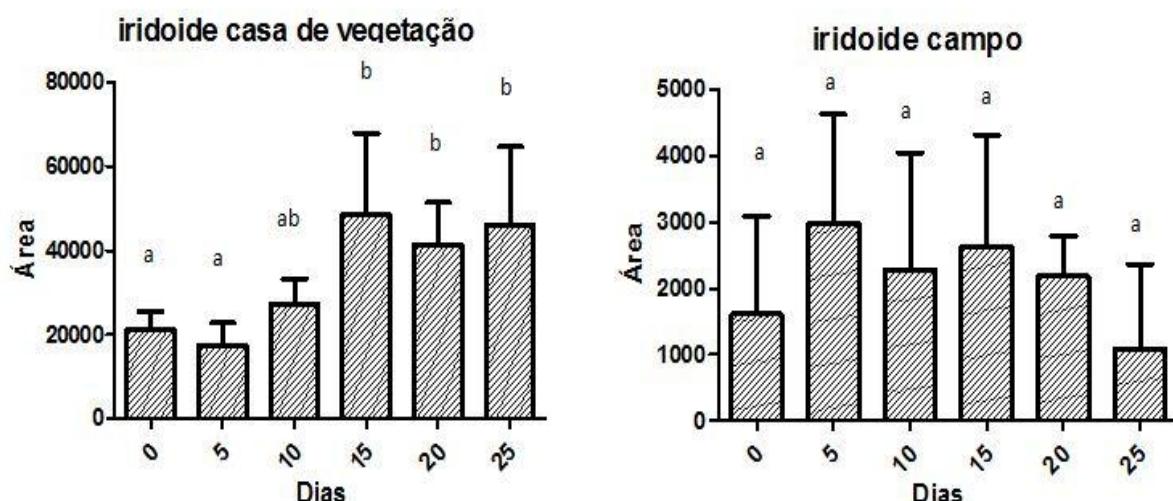


Figura 24- Dados da integralização dos picos do iridoide presente nas amostras de *c. A. peregrinum* em diferentes períodos após a remoção da parte aérea em plantas cultivadas em casa de vegetação e no campo.

*Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Em relação às concentrações de citocininas, alantoína e do iridoide 6 β -hidroxiipolamiida observou que só houve diferença significativa entre as concentrações em plantas que tiveram a parte aérea removida no campo em relação a cinetina, sendo que as plantas de casa de vegetação apresentaram diferença significativa entre os três compostos estudados.

O fato da alantoína ser encontrada em maior concentração no caule após a remoção da parte aérea e o início da regeneração sugere que ocorra a translocação deste composto dos órgãos subterrâneos para o caule após o evento de remoção severa da parte aérea.

Esse fato também é observado em relação a cinetina nas plantas que tiveram a parte aérea removida no campo, onde a concentração de cinetina aumentou no caule com o início da regeneração.

A lesão de tecidos vegetais induz as divisões celulares no local lesionado e mesmo em células altamente especializadas como as fibras do floema e as células guarda, podem ser pelo menos uma vez estimulada pela lesão a se dividirem (Taiz e Zeigher, 2009).

As citocininas regulam a divisão celular agindo nos controles que governam a passagem da célula pelo ciclo de divisão celular (Taiz e Zeigher, 2009), os resultados encontrados neste estudo confirmam que a translocação de citocininas da raiz para a parte aérea realmente ocorre em plantas após uma lesão, nesse caso a remoção da parte aérea sugere que a planta utilize tanto as citocininas como a alantoína para a formação dos novos tecidos vegetais, pois observa-se uma queda na concentração no momento em que a planta aumenta a brotação, sugerindo que esteja ocorrendo uma maior utilização deste composto de forma direta na regeneração.

Em um estudo realizado por Lopes e colaboradores (2008) com brotação do mamoeiro com diferentes alturas de podas da parte aérea sendo elas: 20, 25 e 35 cm a partir do colo da planta, obteve um maior desempenho de brotação e tamanho do broto a plantas podadas a 20 cm do colo, a menor altura do corte promoveu uma maior proximidade entre a parte aérea-sistema radicular promovendo uma rápida translocação desses compostos e obtendo uma concentração mais elevada das citocininas no local da poda em um menor espaço de tempo. Isso provavelmente pode explicar a intensidade e rapidez de rebrote das plantas consideradas invasoras, pois a partir do momento que sofrem uma poda mais severa com intuito de se realizar o controle da mesma, a planta utiliza do mecanismo de translocação de citocininas para induzir a divisão celular no

local da poda para a regeneração da parte aérea.

Nas análises de espectrometria de massas observou uma maior concentração de alantoína em comparação a concentração de citocininas. Em relação a utilização dos compostos na regeneração, as análises sugerem que ocorreu uma maior utilização de cinetina em relação a alantoína no período de regeneração da parte aérea.

A concentração do iridoide 6β -hidroxiipolamiida aumentou também com o início da regeneração da parte aérea. Esse resultado pode sugerir que a planta utilizou esse iridoide para uma maior proteção dos novos tecidos contra os herbívoros e confirmado ainda que um estímulo mecânico pode influenciar a produção de metabólitos secundários como descrito por (Cipollini, 1997; Vázquez-Flota et al., 2004).

Danos causados na planta por ferimentos ou ataque de herbívoros ou patôgenos favorece uma resposta bioquímica, que reduz a aceitabilidade das plantas a ataques futuros podendo influenciar a expressão de metabolismo secundário (Vázquez-Flota et al., 2004).

Os dados apresentado neste estudo indicam que um estímulo mecânico não interferiu significativamente na produção dos compostos estudados, já que no dia em que foi realizada a remoção da parte aérea os compostos já estavam presentes nas plantas, mas o dano mecânico influenciou uma maior concentração destes compostos nas plantas.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O comportamento da espécie de *A. peregrinum* no campo e em casa de vegetação foi semelhante em relação do período de regeneração.

Dos 12 compostos detectados apenas a cinetina, alantoína e 6β -hidroxiipolamiida foram detectada em nível adequado para a avaliação comparativa.

O pico de concentração das substâncias coincidiu com o início da regeneração das plantas que tiveram a parte aérea removida em campo e casa de vegetação.

No período de regeneração da espécie ocorreu uma maior concentração de citocininas e de alantoína nas plantas de campo e casa de vegetação.

Conforme visto, as concentrações de citocininas, de alantoína e de β -hidroxiipolamiida em plantas podem variar consideravelmente dependendo de alguns fatores, como a remoção da parte aérea realizada na espécie em questão.

Os dados apresentados nesse trabalho sugerem que a espécie *A. peregrinum* utiliza esses compostos em seu benefício para superar as condições adversas encontradas no campo, com essa estratégia *A. peregrinum* consegue obter vantagens em relação as outras espécies garantindo assim seu sucesso como planta invasora.

Os resultados obtidos nesse estudo podem corroborar com os estudos de controle dessa espécie, pois o monitoramento e identificação dos compostos e o momento de maior utilização destes por uma espécie considerada como uma invasora são úteis para obter técnicas de controle da espécie no campo, diminuindo assim os prejuízos econômicos causados por ela.

6. REFERÊNCIAS BIBIOGRÁFICAS

- ALCANTARA, S.; LOHMANN, L. G. Evolution of floral morphology and pollination system in Bignonieae (Bignoniaceae). American Journal of Botany, St. Louis, v. 97, n. 5, p. 782-796, 2010.
- AMASINO, R. Kinetin arrives: The 50th anniversary of a new plant hormone. Plant Physiology, v. 138, p. 1177–1184, 2005.
- ASHIKARI, M.; SAKAKIBARA, H.; LIN, S.; YAMAMOTO, T.; TAKASHI, T.; NISHIMURA, A.; ANGELES, E. R.; QIAN, Q.; KITANO, H.; MATSUOKA, M. Cytokinin oxidase regulates rice grain production. Science, n. 309, p. 741–745, 2005.
- ASTOT, C.; DOLEZAL, K.; NORDSTROM ,A.; WANG, Q.; KUNKEL, T.; MORITZ, T.; CHUA, N. H.; SANDBERG, G. An alternative cytokinin biosynthesis pathway. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, v. 97, p.14778–83, 2000.
- BARTOK, T.; BORCSOK, G.; KOMOROCZY, R.; SAGI, F. Characterization of cytokinin by *electrospray* ionization and collision-induced dissociation mass spectrometry without precursor ion selection. Journal Mass Spectrometry, v.31, p. 756–760, 1996.
- BEVERIDGE, C.A. Long-distance signaling and a mutational analysis of branching in pea. Plant Growth Regulation, v. 32, p. 193-203, 2000.
- BEVERIDGE, C. A.; MURFET, I. C.; KERHOAS, L.; SOTTA, B.; MIGINIAC, E.; RAMEAU, C. The shoot controls zeatin riboside export from pea roots. Evidence from the branching mutant *rms4*. Plant Journal, v. 11, p. 339-345, 1997.
- BOOTH, A.; MIDGLE, G. F.; HANNA, L.; MILLAR, D.; THUILLER, W. Developing regional and species-level assessments of climate change impacts on biodiversity in the Cape Floristic Region. Biological Conservation, v. 112, p. 87–97, 2003.
- BOWERS, M. D. Iridoid glycosides. In Rosenthal, G. A.; Berenbaum M. R. Herbivores: Their Interactions With Secondary Plant Metabolites. The Chemical Participants. Academic Press, San Diego, California, v 1, n. 2, p. 297–325, 1991.
- BOWERS, M. D. Hostplant suitability and defensive chemistry of the *Catalpa sphinx*, *Ceratomia catalpae*. Journal of Chemical Ecology, v. 29, p. 2359-2367, 2003.
- CASTILLO, L.; ROSSINI, C. Bignoniaceae Metabolites as Semiochemicals. Molecules, v. 15, n. 10, p. 7090-7105, 2010.
- CIPOLLINI, D. F. JR. Wind-induced mechanical stimulation increases pest resistance in common bean. Oecologia, v. 111, p. 84–90, 1997.
- CROTTI, A. E. M.; VESSECHI, R. L.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. Espectrometria de massas com ionização por eletrospray: processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. Química Nova, v. 29, p. 287-

292, 2006.

DARROW, K.; BOWERS, M. D. Effects of herbivore damage and nutrient level on induction of iridoid glycosides in *Plantago lanceolata*. *Journal of Chemical Ecology*, v. 25, p. 1427–1440, 1999.

DE LUCA, C.; GUISO, M.; MARTINO, C. *Phytochemistry*, v. 22, 1185 p. 1983.

DESIMONE, M.; CATONI E.; LUDEWIG U.; HILPERT M.; SCHNEIDER A.; KUNZE R.; TEGEDEER M.; FROMMER W.; SCHUMACHER K. A novel superfamily of transporters for allantoin and other oxo-derivatives of N-heterocyclic compounds in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, v.14, p. 847-856, 2002.

DE VOS, R. C.; MOCO, S.; LOMMEN, A.; KEURENTJES, J. J.; BINO, R. J.; HALL, R. D. Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nature Protocols*, v. 2, p.778–791, 2007.

DINDA, B.; DEBNATH, S.; HARIGAYA, Y. Naturally Occurring Iridoids. A Review, Part 1. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, v. 2, n. 55, p. 159-22, 2007.

DOLE, M.; MACK, L. L.; HINES, R. L.; MOBLEY, R. C.; FERGUSON, L. D.; ALICE, M. B. Molecular beams of macroion. *Journal of Chemical Physics*, v. 49, p. 2240-2249, 1968.

EMBRAPA. Ciganinha - A planta que está invadindo as pastagens. *Gado de Corte Informa*, Campo Grande: Embrapa, v.12, n. 2, p.4-5, 1999.

FENN, J. B.; MANN, M.; MENG, C. K.; WONG, S. F.; WHITEHOUSEFENN, C. M. *Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules*. *Science*. v. 246, p. 64-71, 1989.

FERREIRA, D. T.; ÁLVARES, P. S. M.; HOUGHTON, P. J.; BRAZ-FILHO, R. Constituintes Químicos das Raízes de *Pyrostegia Venusta* e Considerações Sobre a sua Importância Medicinal. *Química Nova*, v.23, p. 42 -46, 2000.

GE, L. Y. J.; YONG, W. H.; TAN, S. N.; ONG, E. S. *Electrophoresis*, v. 27, p. 2171–2181, 2006.

GENTILI A; PERRET D; MARCHESE S. Liquid chromatography tandem mass spectrometry for performing confirmatory analysis of veterinary drugs in animal-food products. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 24, n. 7, p. 704-733, 2005.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GRASSI, R. F.; RESENDE, U. B.; SILVA, W.; MACEDO, M. L. R.; BUTERA, A. P.; TULLI, E. O; SAFFRAN, F. P.; SIQUEIRA, J. M. Estudo fitoquímico e avaliação

alelopática de *Memora peregrina* – “ciganinha” – Bignoniaceae, uma espécie invasora de pastagens em Mato Grosso do Sul. *Química Nova*, v. 28, n. 2, p. 179-182, 2005.

GUVENALP, Z.; OZBEK, H.; UNSALART.; KAZAZ, C.; DEMIREZER, O. L. Iridoid, Flavonoid, and Phenylethanoid Glycosides from *Wiedemannia orientalis* Chem. v. 30, p. 391-400, 2006.

HECK, A. J. R.; VAN DEN HEUVEL, R. H. H. Investigation of intact protein complexes by mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, v. 23, p. 368-389, 2004.

HEDDEN, P.; PHILLIPS, A. L. Manipulation of hormone biosynthetic genes in transgenic plants. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 11, p. 130-137, 2000.

HOYEROVA, K.; GAUDINOVA, A.; MALBECK, J.; DOBREV, P.I.; KOCABEK, T.; SOLCOVA, B.; TRAVNICKOVA, A.; KAMINEK, M. Efficiency of different methods of extraction and purification of cytokinins. *Phytochemistry*, v. 67, p. 1151-1159, 2006.

INMETRO. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Brasília, 2003.

JAMIESON, M. A.; BOWERS, M. D. Iridoid Glycoside Variation in the Invasive Plant Dalmatian Toadflax, *Linaria dalmatica* (Plantaginaceae), and Sequestration by the Biological Control Agent, *Calophasia lunula*. *Journal of Chemical Ecology*, v. 36, n. 1, p. 70-79, 2010.

KAKIMOTO, T. Biosynthesis of cytokinins. *Journal of Plant Research*, v. 116, p. 233–239, 2003.

KAKIMOTO, T. Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate:ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant Cell Physiology*, v. 42, p. 677–685, 2001.

KATZUNG, B. G. Farmacologia: básica & clínica. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

KUDO, T. KIBA, T.; SAKAKIBARA, H. Metabolism and long-distance translocation of cytokinins. *Journal of Integrative Plant Biology*, v. 52, p. 53–60, 2010.

KURAKAWA, T.; UEDA, N.; MAEKAWA, M.; KOBAYASHI, K.; KOJIMA, M.; NAGATO, Y.; SAKAKIBARA, H.; KYOZUKA, J. Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature*, v. 445, p. 652–655, 2007.

KUROHA, T.; TOKUNAGA, H.; KOJIMA, M.; UEDA, N.; ISHIDA, T.; NAGAWA, S.; FUKUDA, H.; SUGIMOTO-SHIRASU, K.; SAKAKIBARA, H. Functional analyses of *LONELY GUY* cytokinin-activating enzymes reveal the importance of the direct activation pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, v. 21, p. 3152-3169, 2009.

LEA, P.J. Primary nitrogen metabolism. In: DEY, P.M.; Harbone, J.B. (eds.). *Plantbiochemistry*. San Diego: Academic Press, p. 273-306, 1997.

LETHAM, D.S. Zeatin, a factor inducing cell division from *Zea mays*. Life Sciences. v. 8, p. 569-573, 1963.

LOHMANN, L. G.; SILVA-CASTRO, M. M. Bignoniacaeae. In: GIULIETTI, A. M.; RAPINI, A., ANDRADE, M. J. G.; QUEIROZ, L. P.; CARDOSO DA SILVA, J. M. (Ed.). Plantas raras do Brasil. Belo Horizonte, MG: Conservação Internacional, p. 96-100, 2009.

LOPES, J. C.; COELHO, R. I.; BREGONCI, I. S.; MACEDO, C. M. P.; MAIA, L. R. Brotação de mamoeiro tainung 1 submetido a diferentes alturas de corte do caule. Ciênc. agrotec., Lavras, v. 32, n. 2, p. 360-365, 2008.

LORENZI, H. Plantas Daninhas do Brasil, 3a ed., Plantarum: Nova Odessa, 2000.

MARCHETTI, C. R. Taxa de Crescimento e Dinâmica do Metabolismo de Nitrogênio de Memora peregrina - uma Espécie Invasora de Pastagens. (Mestrado em Biologia Vegetal) Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, p. 72, 2006.

MIDGLEY, G. F.; HANNAH L.; MILLAR, D.; THUILLER, W.; BOOTH, A. Developing regional and species-level assessments of climate change impacts on biodiversity in the Cape Floristic Region. Biological Conservation, v. 112, p. 87-97, 2003.

MILLER, C. O. A kinetin-like compound in maize. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, v.47, p. 170-174, 1961.

MIYAWAKI, K.; MATSUMOTO-KITANO, M.; KAKIMOTO, K. Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in *Arabidopsis*: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. Plant Journal, v. 37, p. 128-138, 2004.

MORAES, M. C. B.; LAGO, C. L. Espectrometria de massas com ionização por electrospray aplicada ao estudo de espécies inorgânica e organometálicas. Química Nova, v.26, n. 4, p. 556-563, 2003.

MOK, M. C.; MOK, D. TURNER, J.; MUJER, C. Biological and biochemical effects of cytokinin-active phenylurea derivatives in tissue culture systems. In: Chemical Regulation in Tissue Culture: An Overview, Horticultural Science, v. 22, n 6, p. 1194-1197, 1987.

NAKAMURA, M.; KAGATA, H.; OHGUSHI, T. Trunk cutting initiates bottom-up cascades in a tri-trophic system: sprouting increases biodiversity of herbivorous and predaceous arthropods on willows. Oikos, v.113, n.2, p.259-268, 2006.

NIEMINEN, M.; SILJANDER, M.; HANSKI, I. Structure and dynamics of *Melitaea cinxia* metapopulations, In P. R. Ehrlich and I. Hanski. On the Wings of Checkerspots. Oxford University Press, New York. In press, 2003.

- NOVAK, O.; TARKOWSKI, P.; TARKOWSKA, D.; DOLEZAL, K.; LENOBEL, R.; STRNAD, M. Quantitative analysis of cytokinins in plants by liquid chromatography-single-quadrupole mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, v.480, p. 207–218, 2003.
- NUNES, S.G. Ciganinha – *Memora peregrina* (Miers) Sandw – Nova Planta Invasora de Pastagem. Divulgação Embrapa Gado de Corte, n. 35, 1999a.
- NUNES, S.G. Ciganinha: a planta que está invadindo as pastagens. Informativo do Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte, v. 12, n. 2, p. 4-5, 1999b.
- OLIVEIRA, A. M. R. Proteínas de defesa em folhas de *Memora peregrina* (Miers) Sandwith (Bignoniaceae) – Uma Espécie invasora de pastagem. (Mestrado em Biologia Vegetal) Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, p. 46, 2009.
- PERES, L. E. P.; KERBAUY, G. B. Citocininas In: KERBAUY, G. B. *Fisiologia Vegetal*. 1^aed. Rio de Janeiro-RJ, Guanabara Koogan, p. 250-278, 2004.
- PERES, L. E. P; MERCIER, H; KERBAUY, G.; ZAFFARI, G. R. Níveis endógenos de AIA, citocininas e ABA em uma orquídea acaule e uma bromélia sem raiz, determinado por HPLC e ELISA. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v. 9, p. 169-176, 1997.
- POLAYES, D. A.; SCHUBERT, K. R. Purine synthesis and catabolism in soybean seedlings. *Plant Physiology*, v. 75, p. 1104-1110, 1984.
- POTT, A.; POTT, V. J. Lista preliminar de plantas invasoras atuais e potenciais de pastagens do Centro Oeste. [S. l.: s. n.], 16 p, 2000.
- RADFORD, I. J.; COUSENS, R. D. Invasiveness and comparative life-history traits of exotic and indigenous *Senecio* species in Australia. *Oecologia*, v. 125, n. 4, p. 531- 542, 2000.
- RAVEN, P. H.; EVERET, R. F.; EICHHORN, S. E. *Biologia vegetal*. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, p. 906, 2001.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química. Nova*, v. 27, n. 5, p. 771, 2004.
- RIJAVEC, T.; KOVAC, M.; KLADNIK, A.; CHOURAY, P.S.; DERMASTIA. M. A comparative study on the role of cytokinins in caryopsis development in the maize miniature 1 seed mutant and its wild type. *Journal of Integrative Plant Biology*, v. 51, p. 840–849. 2009.
- RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. Etnobotânica e florística de plantas medicinais nativas de remanescentes de floresta estacional semidecidual na Região do Alto Rio Grande-MG. *Cerne*, Lavras, v. 14, n. 2, p. 93-112, 2008.
- SAKAKIBARA, H. CYTOKININS: activity, biosynthesis, and translocation. *Annual Review of Plant Biology*, v. 57, p. 431–449, 2006.

SAKAKIBARA, H.; TAKEI, K. Identification of cytokinin biosynthesis genes in *Arabidopsis*: a breakthrough for understanding the metabolic pathway and the regulation in higher plants. *Journal of Plant Growth Regulation*, v. 21, p. 17–23, 2002.

SANTIAGO, E. J. A.; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O.; SANTANA, J. R. F.; GOMES, G. A. C. Meios de cultura: Cultura de tecidos. PAIVA E PAIVA, UFLA, Lavras, M.G, v. 3, p. 22-35, 2001.

SCIFINDER. v. 2012. n. 7 de março de 2012.

SCHUBERT, K.R.; BOLAND, M. J. The ureides. In BJ Miflin, PJ Lea, eds, *The Biochemistry of Plants A Comprehensive Treatise: Intermediary Nitrogen Metabolism*. Academic Press, San Diego, v. 16, p. 197-282, 1990.

SHINE, C.; WILLIAMS, N.; GÜNDLING, L. Guía para la elaboración de marcos jurídicos e institucionales relativos a las especies exóticas invasoras. Centro de derecho ambiental de la UICN. Política y Derecho ambiental, n. 40, 2000.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado na APG II. 2. Nova Odessa: Instituto Plantarum, p. 704, 2008.

SUDING, K. N.; GROSS, K. L.; HOUSEMAN, G. R. Alternative states and positive feedbacks in restoration ecology. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 19, p. 46–53, 2004.

SWARTZ, M. E.; KRULL, I. S. Validação de métodos cromatográficos. *Pharmaceutical Technology*, São Paulo, v.2, n. 3, p.12-20, 1998.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. 4^a ed. Artmed, Porto Alegre, p. 820, 2009.

TAKEI, K.; YAMAYA, T.; SAKAKIBARA, H. *Arabidopsis CYP735A1* and *CYP735A2* encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of *trans*-zeatin. *Journal of Biological Chemistry*, v. 279, p. 41866–72, 2004.

TAKEI, K.; TAKAHASHI, T.; SUGIYAMA, T.; YAMAYA, T.; SAKAKIBARA, H. Multiple routes communicating nitrogen availability from roots to shoots: a signal transduction pathway mediated by cytokinin. *Journal of Experimental Botany*, v. 53, p. 971–77, 2002.

TAKEI, K.; SAKAKIBARA, H.; TANIGUCHI, M.; SUGIYAMA, T. Nitrogen-dependent accumulation of cytokinins in root and the translocation to leaf: implication of cytokinin species that induces gene expression of maize response regulator. *Plant Cell Physiology*, v. 42, p. 85–93, 2001.

THOMAS, R. J.; SCHRADER, L. E. Nitrate uptake, reduction and transport in the whole plant. In *Nitrogen and carbon metabolism* (J.D. Bewley, ed.). Martins Nijhoff / Dr W. Junk Publishers, The Hague, p. 49-93, 1981.

THORPE, T.A. *In vitro* organogenesis and somatic embryogenesis: physiological and biochemical aspects. In: ROUBELAKIS-ANGELAKIS,K.A.;TRAN TRANK VAN,K.(Eds.).Morphogenesis in plant. New York: Plenum Press, p.19-38, 1993.

VÁZQUEZ-FLOTA, F.; CARRILLO-PECH, M.; MINERO-GARCÍA, Y. MIRANDA-HAM, M.L. Alkaloid metabolism in wounded Catharanthus seedlings. Plant Physiology and Biochemistry, v. 42, p. 623–628, 2004.

WERNER, T.; MOTYKA, V.; STRNAD, M.; SCHMULLING, T. Regulation of plant growth by cytokinin. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, v. 98, p. 10487– 10492, 2001.

WERNER, T.; MOTYKA, V.; LAUCOU, V.; SMETS, R.; VAN ONCKELEN, H.; SCHMULLING, T. Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. Plant Cell, v. 15, p. 2532–2550, 2003.

WINK, M. Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. TAG Theoretical and Applied Genetics, v.75, n. 2, p. 225-233, 1988.

YAMADA, H.; SUZUKI, T.; TERADA, K.; TAKEI, K.; ISHIKAWA, K.; MIWA, K., YAMASHINO, T.; MIZUNO, T. The *Arabidopsis* AHK4 histidine kinase is a cytokinin-binding receptor that transduces cytokinin signals across the membrane. Plant Cell Physiology. v. 42, p. 1017–1023, 2001.

ZHANG, S.; LI, G.; FANG, J.; CHEN, W.; JIANG, H.; ZOU, J.; LIU, X.; ZHAO, X.; LI, X.; CHU, C.; XIE, Q.; JIANG, X.; ZHU, L. The interactions among DWARF10, auxin and cytokinin underlie lateral bud outgrowth in rice. Journal Integrative Plant Biology, v. 52, p. 626–638, 2010.