

CAPÍTULO 3

ANÁLISE DE CARACTERES FISIOLÓGICOS DE *Dimorphandra mollis* Benth.

“Todas as coisas compostas são não permanentes”.

FRITJOF CAPRA “O Tao da Física”.

1. INTRODUÇÃO

Quando a planta é sinalizada por patógenos ou herbívoros há elicitação de respostas complexas de defesa, com ativação de vários genes, resultando na síntese e acumulação de metabólitos secundários (fitoalexinas e fenólicos), macromoléculas estruturais (calose, lignina e glicoproteína) e de proteínas (proteínas relacionadas com a patogênese, inibidores de enzimas, enzimas hidrolíticas e enzimas responsáveis do metabolismo secundário) (CARRY & KLESSIG, 1989). Logo, a sinalização da abordagem da planta pelo patógeno é acompanhada por mudanças metabólicas consideráveis (BENHAMOU, GRENIER & CHRISPEELS, 1991).

Esses mecanismos de defesa a ataques de patógenos ou herbívoros estão sempre ativos nos vegetais, funcionando como sistemas de proteção relacionados

a biossíntese de compostos secundários que interferem ou alteram a palatabilidade (flavonóides, quinonas, alcalóides) ou complexam proteínas (taninos) ou secretam substâncias urticantes (terpenos) ou produzem substâncias impermeabilizantes (cutina, ceras), ou alteram a resistência celular (pectina, lignina) ou ainda, evitam a decomposição e a oxidação de tecidos combatendo radicais livres, atuando como antioxidantes (flavonóides).

Todos esses mecanismos de defesa e proteção podem ser ativados por qualquer sinalização fisiológica acionada em decorrência de níveis de irradiância, extremos de temperatura, condições hídricas, idade da planta, sazonalidade, saturação de gases (CO₂, O₂, etileno), pH, níveis de nutrientes, deficiência mineral, estado nutricional, resposta hormonal, herbivoria, patógenos, injúrias pós-colheita, dentre outros. Esses mecanismos de respostas são específicos e na maioria das vezes, podem interagir entre si.

Os mecanismos de defesa a fatores bióticos e abióticos em *Dimorphandra mollis* estão diretamente relacionados a biossíntese de fenólicos, uma vez que, os principais compostos encontrados em suas folhas, frutos e cascas do caule, são taninos e flavonóides.

Segundo HARBORNE (1976) e GLEITZ (1989) o estudo da regulação da via dos compostos fenólicos, principalmente dos flavonóides, tem colaborado na compreensão de alguns processos fisiológicos em plantas superiores.

Os compostos fenólicos são tóxicos aos patógenos e são produzidos rapidamente na defesa do vegetal e se acumulam após a infecção, especialmente em variedades resistentes. Os flavonóides, taninos, ligninas, cumarinas, ácidos clorogênico, caféico e ferrúlico são exemplos de alguns desses compostos

(CAMPOS *et al*, 2004). A lignina é a primeira fonte de fenólicos do reino vegetal (QUEIROZ *et al*, 2002).

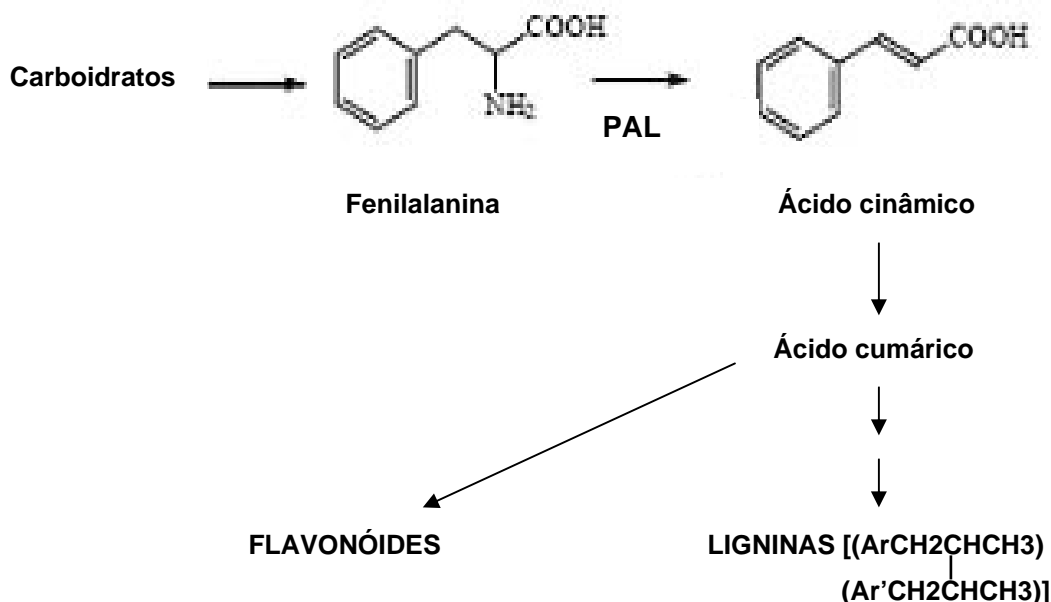
A biossíntese de flavonóides e de lignina é iniciada pela desaminação da fenilalanina pela enzima fenilalanina amônio liase (PAL ou FAL), formando o ácido t-cinâmico (JONES, 1984) (figura 1). As vias subseqüentes envolvem reações de hidroxilação do ácido L-cinâmico originando o ácido cumárico (SEYFERT, 1982); esterificação na formação de p-cinamoil-CoA (HELLER & FORKMANN, 1988); formação de chalconas a partir da enzima chalcona sintase (CHS) (SCHUTTE, 1985); isomerização de chalconas na biossíntese de flavanonas (FRITSCH *et al*, 1971) e hidroxilação de flavanonas na biossíntese de flavonóis (SCHUTTE, 1985).

Enzimas são proteínas que funcionam na aceleração de reações químicas em sistemas biológicos. Sem enzimas, muitas reações necessárias às células vivas não acontecem em velocidades suficientemente altas, no pH e na temperatura dos organismos vivos, por causa do alto grau de especificidade (LEHNINGER, 2001).

A especificidade enzimática reside região particular da superfície molécula conhecida como “sítio de ligação” caracterizado pelo arranjo particular das cadeias laterais de resíduos de aminoácidos no polipeptídeo, e especialmente na ligação da enzima ao substrato específico (LEHNINGER, 2001).

As liases, como a Fenilalanina amônio liase (PAL ou FAL), atuam nas reações de eliminação, modificam o substrato cindindo compostos ou modificando as moléculas do substrato, propiciando a formação de dupla ligação (figura 1).

Figura 1: Reação enzimática da fenilalanina amônio liase (PAL) e síntese de flavonóides e lignina.



As enzimas que participam da biossíntese de flavonóides e ligninas são encontradas em órgãos específicos das plantas (RUSSEL & CONN, 1967), sendo traduzidas, montadas no retículo endoplasmático e transportadas ao complexo de Golgi, onde a maioria das reações de biossíntese ocorre.

Foi proposto (KEUSCH, 1968) que as enzimas que participam da síntese de fenólicos são produzidas no endosperma, mas suas células necessitam do sinal proveniente do haustório. De acordo com SCHOPFER (1977), a regulação do metabolismo de flavonóides é feita via sistema de fitocromo, envolvendo fotoreceptores de luz azul UVA e UVB.

MELIN (1975) estudou a rota de biossíntese dos flavonóides e o acúmulo desses em folhas e caules de *Periploca graeca*, por meio de fenilalanina com carbono marcado (C¹⁴), inferindo que a síntese de flavonóides é diretamente proporcional à atividade enzimática da Phenylalanine ammonia lyase (PAL ou

FAL - Fenilalanina amônia liase), enzima responsável pela regulação da biossíntese de compostos fenólicos.

GLEITZ *et al* (1991) detectaram correlação direta entre aumento da atividade da enzima PAL (fenilalanina amônia-liase) e síntese de flavonóides. HARBORNE (1980) assevera ter a PAL maior atividade em folhas adultas ou totalmente expandidas; enquanto peroxidase e polifenoxidase têm maior atividade nas folhas jovens.

HARBORNE (1980), MALHOTRA & KHAN (1984) discutiram a posição das enzimas no metabolismo fenólico, como a PAL, POD e CHS, relacionando essas enzimas com as etapas de biossíntese de taninos, ligninas e flavonóides.

MALHOTRA & KHAN (1984) como efeito do ozônio, citam o aumento da atividade enzimática, levando ao estímulo na oxidação de fenóis, gerando quinonas e acúmulos de produtos de oxidação (FURLAN *et al*, 1998).

Os mecanismos de ativação e da inibição enzimática são altamente variáveis e dependentes, dentre outros fatores, da cinética da reação compreendendo a velocidade da transformação de reagentes/ substratos em produtos. Assim, à medida que a concentração de fenilalanina na planta aumenta (substrato) a velocidade inicial da reação é aumentada até que a PAL (enzima) esteja completamente saturada pelo substrato e atinja o seu ponto máximo, começando a decair, diminuindo a formação do produto no caso ácido cinâmico.

Do mesmo modo, a relação substrato/ produto formado funciona como inibidor e tal inibição da atividade da PAL por fenilalanina é relatada por ZUCKER (1965) em batatas, sendo atribuída ao aumento formação de ácido trans-cinâmico.

Segundo YORK (2001) se a enzima subsequente da via metabólica remover o produto rapidamente, então a inibição não ocorrerá, pois à medida que o produto final da via aumenta, os intermediários também aumentarão pela ação das massas, e se, uma ou mais enzimas forem particularmente sensíveis à inibição pelo produto, a formação do produto final da via será suprimida, pois a reversibilidade da via ou da reação é dependente da velocidade de remoção do produto, que se for rápida, determinará a unidirecionalidade da via.

Os inibidores atuam de forma competitiva, não competitiva ou incompetitiva. Alguns inibidores enzimáticos são capazes de inibir apenas uma ou duas enzimas estritamente relacionadas, enquanto outros são ativos contra enzimas específicas dentro da mesma classe (WEDER, 1986). O inibidor, provavelmente, atua como parte dos mecanismos de defesa da planta contra insetos e/ ou microrganismos patogênicos, além de regular endogenamente a proteólise celular (KAPUR *et al*, 1989; JONGSMA & BOLTER, 1997).

MARRIOTT *et al* (1978) constataram que o aumento na atividade enzimática da PAL, associado a ferimentos em vegetais, pode sinalizar o aumento na biossíntese de lignina, que atua como barreira à infecção microbiana e também pode promover aumento na concentração de produtos de oxidação de fenólicos, alterando a concentração de auxinas por causa da presença de oxidases.

A lignificação proporciona aumento na resistência das paredes à ação de enzimas degradadoras variando entre os órgãos vegetativos, assim, com menor lignificação cai a atividade da PAL (FURLAN *et al*, 1998).

Na análise de estruturas germinativas em sementes de *D. mollis* foi detectada dormência tegumentar atribuída a compostos fenólicos como ligninas,

que proporcionam maior rigidez tegumentar, e conseqüentemente funcionam como mecanismo de proteção e como barreira de penetração a água.

2. OBJETIVOS

- Relacionar os teores de compostos fenólicos, flavonóides e lignina com a atividade de fenilalanina amônio liase (PAL) em plantas jovens de *D. mollis*.
- Identificar em condições ambientais distintas atividade enzimática de PAL (fenilalanina amônio liase) em *D. mollis*.
- Avaliar maior atividade de fenilalanina amônio liase (PAL) com folhas, frutos e plantas de *D. mollis* tratadas com preparados homeopáticos.
- Verificar a ação de tratamentos homeopáticos na liberação de ligninas de sementes de *D. mollis*.
- Quantificar os teores de ligninas em sementes de *D. mollis*.
- Inferir sobre os mecanismos de defesa causados pelas ligninas e PAL (fenilalanina amônio liase), frente a infestações fúngicas durante a germinação de sementes de *D. mollis*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Obtenção das amostras

3.1.1. Obtenção das sementes

Frutos de plantas matrizes de *D. mollis* foram coletados em Montes Claros, nos meses de agosto a outubro de 2005. Após a colheita, os frutos com pequena fenda lateral ou estavam totalmente fechados, foram espalhados sobre lonas, em camadas finas (secagem natural com luz solar e temperatura ambiente média de 35°C) lá permanecendo durante dois dias a fim de facilitar a extração manual das sementes.

3.1.2. Beneficiamento das sementes

O beneficiamento foi o manual, retirando-se as sementes chochas, verdes, quebradas e pedaços de frutos, de maneira a incrementar a pureza física e a qualidade do lote. As sementes foram selecionadas tendo como critérios a homogeneidade de cor, tamanho e maturidade biológica, sendo eliminadas as mal conformadas e com injúrias. O preparo das sementes foi feito nas dependências do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa.

3.1.3. Amostras de campo

Folhas totalmente expandidas e frutos no primeiro estágio de maturação (totalmente verdes) de plantas adultas foram coletados no mês de abril/ maio de 2006, no Cerrado do norte de Minas, na macro-região de Montes Claros por meio de podão/ ou tesoura de poda. As coordenadas de campo foram obtidas em GPS, constituindo doze tratamentos, com quatro repetições (frutos – TFR-MOC 01 a TFR-MOC 12 e folhas – TRF-MOC 01 a TRF-MOC 12), totalizando 96 amostras.

3.1.4. Amostras cultivadas

As sementes selecionadas foram pesadas em balança analítica (Toledo Mettler) e separadas em 16 tratamentos (25 sementes por parcela) com 4 repetições (TR-VIC 01 a TR-VIC 16), no laboratório de melhoramento vegetal. Em seguida, procederam-se a embebição, germinação e avaliação do crescimento (padrões fitotécnicos) das sementes/ plântulas. Depois de 63 dias, as plantas dos tratamentos TR-VIC 01 a TR-VIC 16 foram coletadas, identificadas, pesadas em balança analítica (Micronal B200), armazenadas em embalagens de papel Kraft, dispostas em bandejas em estufa de ventilação forçada à temperatura de 38°C até peso constante.

Os medicamentos e preparados homeopáticos adotados foram:

- 01 – Água destilada;
- 02 – Água destilada 6 CH;
- 03 – Água destilada 12 CH;
- 04 – *Phosphorus* 6 CH;
- 05 – *Phosphorus* 12 CH;
- 06 – *Cyrtopodium* 1D;

- 07 – *Kali phosphoricum* 6 CH;
- 08– *Sulphur* 6 CH;
- 09 – *Sulphur* 12 CH;
- 10 – Etanol 70% 6 CH
- 11 – Etanol 70% 12 CH
- 12 – *Carbo vegetalis* 12 CH;
- 13 – *Caryocar brasiliensis* (Pequi) 6 CH;
- 14 – *Caryocar brasiliensis* (Pequi) 12 CH;
- 15 – *Dimorphandra mollis* fungi 6 CH;
- 16 – *Dimorphandra mollis* fungi 12 CH.

3.2. Seleção e Obtenção dos tratamentos

A escolha dos preparados homeopáticos foi baseada nas pressuposições e resultados de ANDRADE *et al* (2001); ARMOND *et al* (2004); CASTRO *et al* (2003), BONATO *et al* (2005); SUKUL *et al* (2006; 2002); DATTA (2006); HAMMAN *et al* (2003); BETTI *et al* (2003a, 2003b); BRIZZI *et al* (2005; 2000); BAUMGARTNER *et al* (2004); HAMMAN *et al* (2003); DITTMANN *et al* (1996); BINDER *et al* (2005) e EIZAYAGA (1996).

Os medicamentos, preparados homeopáticos e autosódios escolhidos constituíram os tratamentos TRG-VIC 01 a TRG-VIC 16.

3.3. Manipulação dos Preparados homeopáticos

As matrizes homeopáticas foram adquiridas de Farmácia Homeopática idônea onde foram preparadas segundo as normas da Farmacopéia Homeopática

Brasileira (1977, 2002) e do Manual de Normas Técnicas para Farmácia Homeopática (2004).

A manipulação dos medicamentos, preparados homeopáticos e autosódios utilizados em aplicações, na embebição das sementes e no cultivo de plântulas foi feita de acordo com o “Manual de Normas Técnicas da Farmácia Homeopática” (ABFH, 2003) e “Manipulação de Preparados Homeopáticos” (RODRIGUES-DAS-DÔRES, ANDRADE & CASALI, 2007).

3.4. Condução do experimento

As determinações dos teores de lignina em sementes e da quantificação da fenilalanina amônio liase (PAL) foram feitas nos Laboratórios Melhoramento Vegetal e Fisiologia Pós-Colheita do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa

3.5. Avaliação e determinação de Fenilalanina amônia liase (PAL)

A análise da concentração de PAL nos tratamentos TR-VIC 01 a TR-VIC 16; TRF-MOC 01 a TRF-MOC 12 e TFR-MOC 01 a TFR-MOC 12 foi adaptada da metodologia de REDMAN *et al* (1999) (esquema 1).

Folhas maduras totalmente expandidas (TRF-MOC), frutos no primeiro estágio de maturação (TFR-MOC) e as folhas mais antigas (TR-VIC) de plantas cultivadas de *D. mollis* recentemente coletadas foram embaladas em papel alumínio, identificadas, armazenadas em caixas de gelo e transportadas ao Laboratório de Melhoramento Vegetal do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa.

Amostras com 100 mg dos tratamentos TFR-MOC 01 a 12, TRF-MOC 01 a 12 e TR-VIC 01 a 16 e suas repetições foram macerados com 1mL de tampão fosfato (pH 6,0) em gral de porcelana (Chiarotti) previamente resfriado. O macerado foi transferido a tubos eppendorf de 1,5 mL, identificados e centrifugados em microcentrífuga rotativa (Eppendorf) a 14000 rpm, por 5 minutos a 4° C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido a tubos plásticos, rotulados e armazenados a baixa temperatura.

Na quantificação da PAL utilizou-se 6 μ M de L- Fenilalanina; 0,5 M de tampão TRIS-HCl (pH 8,0) e 200 μ L de extrato dos tratamentos TFR-MOC 01 a 12, TRF-MOC 01 a 12 e TR-VIC 01 a 16 (esquema 1).

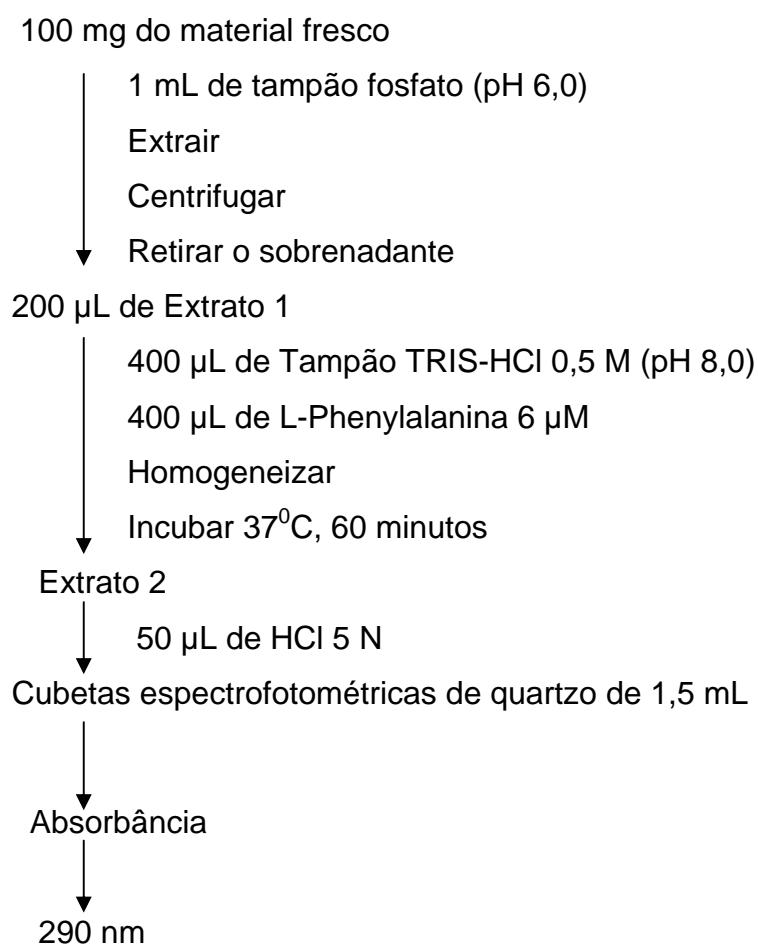
Incubaram-se os extratos por 60 minutos a 37°C em banho-maria (Tecnal). Após esse período, adicionou-se 0,05 mL de HCl 5 N e em seguida as concentrações de PAL foram medidas quantitativamente em 290 nm em espectrofotômetro Shimadzu (Modelo UV1601) (esquema 1) e os resultados expressos em μ g/mL de ácido cinâmico.

3.5.1 Curva Padrão

A PAL teve como padrão o ácido cinâmico (Sigma). Pesou-se 100 mg de ácido cinâmico e diluiu-se com tampão fosfato (pH 6), em balão volumétrico de 10 mL, obtendo a solução estoque (SE) com 10 mg/mL de ácido cinâmico. Da solução estoque (SE) retirou-se a alíquota de 1mL e dilui-se com tampão fosfato (pH 6), em balão volumétrico de 100 mL constituindo a solução amostra (SA) com 0,1 mg/mL ou 100 μ g/mL, da qual foram retiradas alíquotas de 100 μ L a 500 μ L, com as concentrações de 10 μ g a 50 μ g, que foram adicionados a 6 μ M de L- Fenilalanina; 0,5 M de tampão TRIS-HCl (pH 8,0). Procedeu-se à

homogeneização e incubaram-se os extratos por 60 minutos a 37°C em banho-maria (Tecnal). Após esse período, adicionou-se 0,05 mL de HCl 5 N e em seguida as concentrações foram quantificadas em 290 nm em espectrofotômetro Shimadzu Modelo UV1601 (esquema 2) e os resultados expressos em $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ de ácido cinâmico (figura 3).

Esquema 1: Metodologia de quantificação da atividade PAL ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ de ácido cinâmico) por doseamento espectrofotométrico.



Esquema 2: Curva de calibração de fenilalanina amônio liase (PAL)

PADRÃO: ÁCIDO CINÂMICO (C₉H₈O₂)
PM = 148,2(SIGMA)

CONCENTRAÇÃO DOS PADRÕES

$$C = \frac{M}{V} = 148,2 / 10 = 14,82 \text{ mg/ mL}$$

148,2 mg (148,2/10 = 14,82 mg/ mL)

↓ 10 mL de tampão TRIS-HCl 0,5 M, pH = 8,0
Balão volumétrico de 10 mL
Homogeneizar

SOLUÇÃO ESTOQUE (14,82 mg/ mL)

↓ Alíquota de 1 mL (14,82 mg)
100 mL de tampão
Balão volumétrico de 100 mL
Homogeneizar

SOLUÇÃO AMOSTRA (0,1482 mg/ mL = 148,2 µg/ mL)

Alíquotas

3,375µL (0,5µg)	6,75µL(1,0 µg)	10,125µL(1,5µg)	13,5µL (2µg)	16,9µL(2,5µg)
100µL(14,82 µg)	200µL(29,64 µg)	300 µL(44,46 µg)	400 µL(59,28 µg)	500 µL (74,1 µg)
↓ PHE/Tris 498,3	↓ 496,6	↓ 494,9	↓ 493,25	↓ 491,55

Alíquotas da Solução Amostra
ou 100 µL a 500µL da Solução Amostra
Tampão (C1=0 mg/ mL)

B= 400 PHE+ 400 tampão + 200 tampão ou qsp amostra +50 µL HCl
B= 400 PHE+ 400 tampão + 200 amostra ou qsp + 50 µL HCl
B= 800 tampão + 200 amostra ou qsp + 50µL HCl

↓ 400 µL de Tampão TRIS-HCl 0,5 M
400 µL de L-Phenylalanina 6 µM
Homogeneizar
Incubar 37°C, 60 minutos

↓ 50 µL de HCL 5N
Cubetas espectrofotométricas de quartzo de 1,5 mL

ABSORBÂNCIA
290 nm

3.6. Avaliação de Lignina em sementes

A análise da concentração de lignina nos tratamentos TRL-VIC 01 a TRL-VIC 08; foi adaptada da metodologia de REDMAN *et al* (1999) (esquema 3), e adaptado do método de floroglucinol de GURR (1965).

Amostras com 640 sementes (80 sementes por tratamento, 10 sementes por parcela, em períodos de 24h e 48h) foram pesadas constituindo os tratamentos TRL-VIC 01 a 08. As sementes foram embebidas com 20 mL de água e com 10 gotas de preparados homeopáticos, e deixadas em repouso por 24 horas. Os tratamentos homeopáticos foram aplicados em duplo cego e comparados às testemunhas água destilada e álcool etílico.

Constituíram os TRL-VIC 01 a TRL-VIC 08 as homeopantias:

01 – Água destilada

02 – Álcool etílico (Etanol 70%)

03 – *Dimorphandra mollis* fungi 6 CH (fungos)

04 – *Dimorphandra mollis* fungi 12 CH (fungos)

05 – *Phosphorus* 6 CH

06 – *Phosphorus* 12 CH

07 – Rutina 6 CH

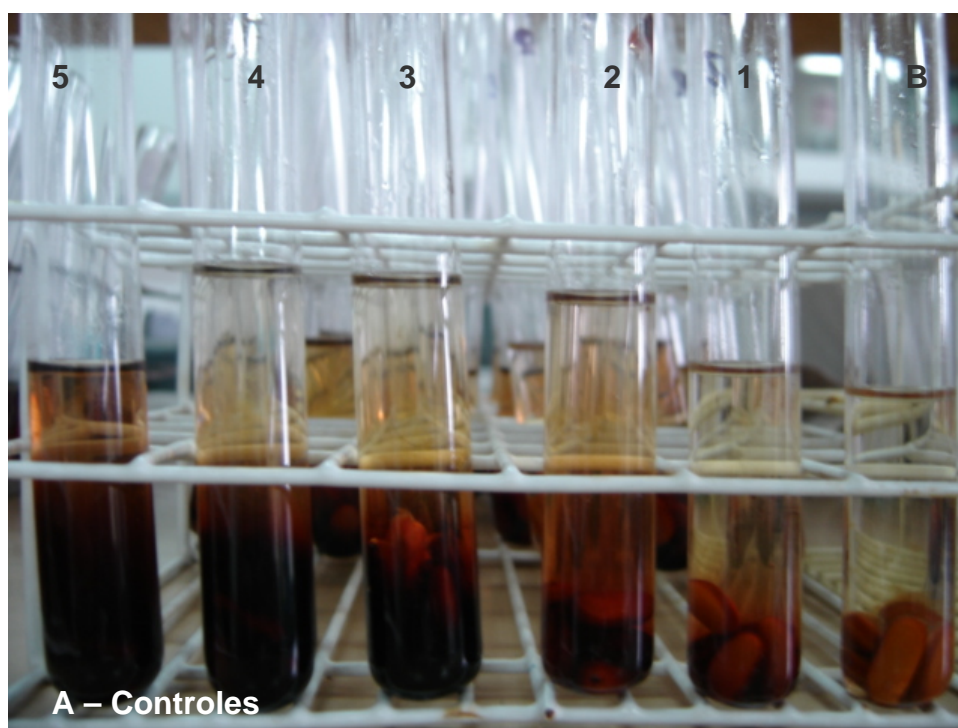
08 – Rutina 12 CH

Após este período, as sementes foram drenadas e novamente pesadas, calculando-se o percentual de embebição das sementes.

As mesmas sementes, após a embebição, foram descolorizadas em 10 mL de álcool 70% por 24 horas e 48 horas. Depois desse período, as sementes foram lavadas em água destilada, e expostas a 5 mL de floroglucinol a 1% (Vetec) por 1

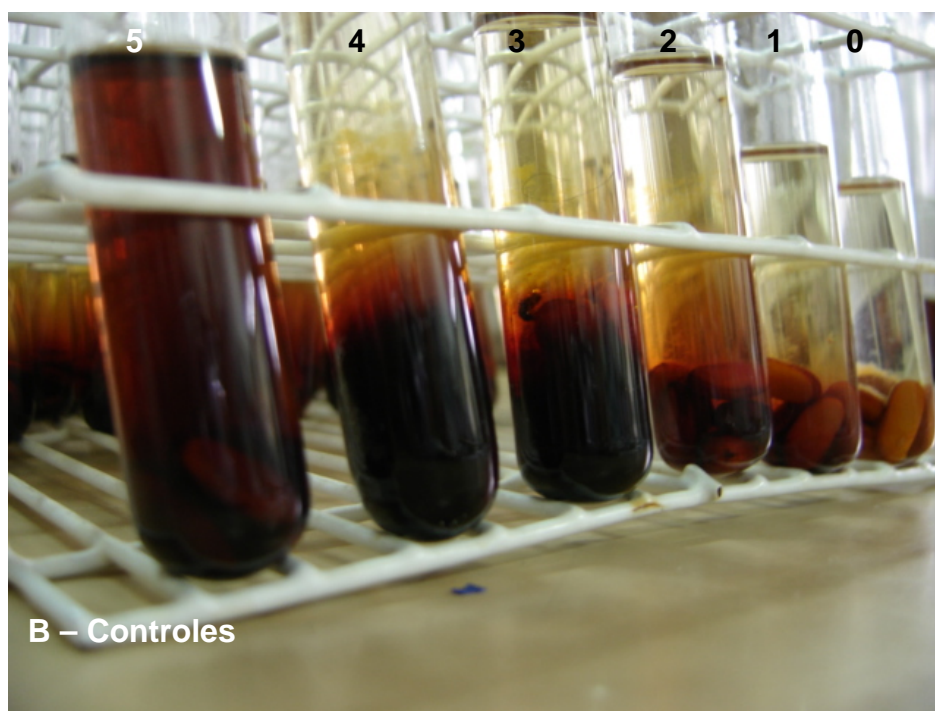
e 2 horas. Em seguida, foram tratadas com 1 mL de H₂SO₄ 6 M liberando a coloração vermelha, indicativa da deposição de ligninas. As intensidades de coloração foram avaliadas qualitativamente como negativo (-), fracamente positiva (±), moderadamente positiva (++) , positiva (+++), intensamente positiva (++++), (figura 2 a e B), que foram transformados em notas de 0 a 5 visando a análise estatística.

Figura 2A: Colorações do teste de lignina nas sementes de *D. mollis*.



A. Controles: B – Branco; 1 – negativo (-); 2 – fracamente positivo (±); 3 – moderadamente positivo (++) ; 4 – positivo (++++), 5 – intensamente positiva (+++++)

Figura 3B: Colorações do teste de lignina nas sementes de *D. mollis*.



B. Controles: 0 – Branco; 1 – negativo (-); 2 – fracamente positivo (\pm); 3 – moderadamente positivo (++); 4 – positivo (++++), 5 – intensamente positiva (+++++)

3.7. Processamento de dados e análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e teste de média (Dunnett, Duncan, Tukey) a 5% de probabilidade, utilizando os programas Sistema para Análises Estatísticas (SAEG) e Genética Quantitativa e Estatística Experimental – VS (GENES).

4. RESULTADOS

4.1. RESULTADOS

4.1.1. Atividade da fenilalanina amônia liase (PAL) nos tratamentos homeopáticos (TR-VIC 01 a 16) e nas amostras de campo (TRF-MOC 01 a 12 e TFR-MOC 01 a 12).

Os resultados das análises em frutos e folhas nos tratamentos TFR-MOC 01 a 12 e TRF-MOC 01 e 12 e nos tratamentos com preparados homeopáticos (TR-VIC 01 a 16) em relação a PAL estão nos quadros 1, 2 e 3. A curva de calibração da PAL teve como equação de ajuste $\hat{y} = 0,0515 x$ e $r^2 = 0,9943$.

Os maiores valores foram nas homeopantias (TR-VIC 01 a 16) em TR-VIC 07 - *Kali phosphoricum* 12 CH ($t_m = 119,02 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$), seguido de TR-VIC 05 – *Phosphorus* 12 CH ($t_m = 104,23 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) e TR-VIC 09 – *Sulphur* 12 CH ($86,91 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$), (quadro 3). Em frutos foram no TFR-MOC 12 ($t_m = 206,88 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) (quadro 2) e em folhas no TRF-MOC 08 ($t_m = 59,32 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1} = 1,80 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ – dados transformados) (quadro 1, tabela 1).

Os menores teores de PAL nos tratamentos com homeopantias foram em TR-VIC 13 *Caryocar brasiliensis* frutis 6 CH (ns*) e *Phosphorus* 6 CH ($t_m = 11,97 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) (quadro 3). Em frutos foram em TFR-MOC 04 ($t_m = 22,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) (quadro 2) e em folhas nos TR-VIC 09 ($t_m = 6,15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) (quadro 1, tabela 1).

Tabela 1: Resumo da análise de variância da atividade de PAL ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) em folhas (TRF-MOC) em frutos (TFR-MOC) e em plantas jovens (TR-VIC) de *D. mollis*.

F.V.	G.L. MOC	Quadrados médios			
				G.L.	TR-VIC
		TFR- MOC	TRF-MOC	VIC	
TRAT	11	15534,36*	0,28***	15	3292,912*
RESIDUO	36	343428	0,11	48	371,7157
CV (%)		77,78	22,823		31,50

*** F significativo ao nível de 10% de probabilidade.

* F significativo ao nível de 5% de probabilidade

Quadro 1: Teores médios de PAL ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) nas folhas de *Dimorphandra mollis* dos tratamentos TRF – MOC 01 a TR-MOC 12.

TRATAMENTOS	MÉDIAS (♦)
TRF – MOC 08	1,77 A
TRF – MOC 03	1,68 A
TRF – MOC 05	1,64 A
TRF – MOC 07	1,62 A
TRF – MOC 04	1,62 A
TRF – MOC 11	1,55 A
TRF – MOC 12	1,42 AB
TRF – MOC 02	1,41 AB
TRF – MOC 10	1,40 AB
TRF – MOC 06	1,34 AB
TRF – MOC 01	1,20 AB
TRF – MOC 09	0,78 B

As médias seguidas de uma mesma letra não variam estatisticamente pelo teste de Tukey a 10% de probabilidade.

♦ Dados transformados log (PAL).

Quadro 2: Teores médios de PAL ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) nos frutos de *Dimorphandra mollis* correspondentes aos tratamentos TFR-MOC 01 a TFR-MOC 12.

TRATAMENTOS	MÉDIAS
TFR – MOC 12	206,88 A
TFR – MOC 11	159,40 AB
TFR – MOC 10	157,03 AB
TFR – MOC 06	71,78 AB
TFR – MOC 07	53,41 B
TFR – MOC 02	52,00 B
TFR – MOC 01	48,00 B
TFR – MOC 09	38,45 B
TFR – MOC 03	34,40 B
TFR – MOC 08	33,46 B
TFR – MOC 05	27,00 B
TFR – MOC 04	22,25 B

As médias seguidas de uma mesma letra não variam estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Quadro 3: Teores médios de PAL ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) de plantas de *Dimorphandra mollis* cultivadas em Viçosa (MG) correspondentes aos tratamentos TR-VIC 02 a TR-VIC 16 comparados a testemunha TR-VIC 01 – Água destilada.

TRATAMENTOS	MÉDIAS	COMPARAÇÕES	
		TUKEY	DUNNETT
TR-VIC 07 - <i>Kali phosphoricum</i> 12 CH	110,02	A	*
TR-VIC 05 - <i>Phosphorus</i> 12 CH	104,23	AB	*
TR-VIC 09 - <i>Sulphur</i> 12 CH	86,91	ABC	
TR-VIC 03 – Água destilada 12 CH	85,14	ABC	
TR-VIC 08 - <i>Sulphur</i> 6 CH	74,87	ABC	
TR-VIC 06 - <i>Cyrtopodium</i> 1D	64,00	BC	
TR-VIC 12 - <i>Carbo vegetalis</i> 12 CH	62,85	BC	
TR-VIC 11 - Etanol 70% 12 CH	59,75	BC	
TR-VIC 01 – Água destilada (TESTEMUNHA)	59,05	BC	
TR-VIC 10 - Etanol 70% 6 CH	57,55	C	
TR-VIC 15 - <i>D. mollis</i> fungi 6 CH	55,90	CD	
TR-VIC 16 - <i>D. mollis</i> fungi 12 CH	51,69	CD	
TR-VIC 14 - <i>C. brasiliensis</i> frutis 12 CH	50,10	CD	
TR-VIC 02 - Água destilada 6 CH	45,38	CDE	
TR-VIC 04 - <i>Phosphorus</i> 6 CH	11,97	DE	*
TR-VIC 13 - <i>C. brasiliensis</i> frutis 6 CH	$0,7 \cdot 10^{-14}$	E	*

As médias seguidas de uma mesma letra não variam estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

As médias com asterisco (*) diferiram da testemunha (Água destilada – TR-VIC 01) ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Dunnett.

4.1.2. Determinação de lignina em sementes de *D. mollis*

O percentual de embebição foi maior nos tratamentos TRL-VIC 01 Água destilada (testemunha) (tm = 35,29%) e em TRL-VIC 08 Rutina 12 CH (tm = 32,98%) e menor em TRL-VIC 06 *Phosphorus* 12 CH (tm = 17,41%) e TRL-VIC 07 Rutina 6 CH (tm = 20,27%) (quadros 4 e 5).

Após contato com floroglucinol por 1 hora nas 24 primeiras horas, as maiores notas foram atribuídas ao TRL-VIC 06 - *Phosphorus* 12 CH (4,25) e TRL-VIC 07 - Rutina 6 CH (3,25), sendo superior as testemunhas TRL-VIC 01 - Água destilada (2,5) e TRL-VIC 02 - Etanol 70% (2,25); e as menores notas em TRL-VIC 03 - *D. mollis* fungi 6 CH (1) e TRL-VIC 04 - *D. mollis* fungi 12 CH (1,25). Nas 2 horas por contato com floroglucinol em 24 horas, as maiores notas foram atribuídas ao TRL-VIC 03 - *D. mollis* fungi 6 CH (3,5) e TRL-VIC 03 - *D. mollis* fungi 12 CH (3,25) e menor em TRL-VIC 05 - *Phosphorus* 6 CH (2,25) (quadros 4 e 5, tabela 2) (figura 2).

O percentual de embebição nas 48 horas foi superior nos tratamentos TRL-VIC 02 - Etanol 70% (tm = 43,80%) e TRL-VIC 06 - *Phosphorus* 12 CH (41,80) e inferior em TRL-VIC 01 - Água destilada (tm = 14,72%) e TRL-VIC 04 - *D. mollis* fungi 12 CH (tm = 19,43%) (quadros 4 e 5).

Após contato com floroglucinol por 1 hora em 48 horas, as maiores notas foram atribuídas ao TRL-VIC 03 - *D. mollis* fungi 6 CH (3,25) e TRL-VIC 07 - Rutina 6 CH (3), sendo superior as testemunhas TRL-VIC 01 - Água destilada (2,50) e TRL-VIC 02 - Etanol 70% (1,25); e a menor nota em TRL-VIC 05 - *Phosphorus* 6 CH (1) (quadro 4 e 5) (figura 3).

Nas 2 horas por contato com floroglucinol em 48 horas, as maiores notas foram atribuídas ao TRL-VIC 08 - Rutina 12 CH (4), TRL-VIC 07 - Rutina 6 CH (4)

e em TRL-VIC 06 - Phosphorus 12 CH (3,75), superiores as testemunhas água destilada e Etanol 70% (TRL-VIC 01 e 02) e menor em TRL-VIC 04 - *D. mollis* fungi 12 CH (1,25) (quadro 4 e 5).

Tabela 2: Resumo da análise de variância em função do percentual de embebição (EMB %) e de lignina em sementes de *D. mollis* nos tratamentos TRL-VIC 01 a 08, nos tempos de 24 e 48 horas após 1 e 2 horas com floroglucinol.

QUADRADOS MÉDIOS							
F.V.	G.L.	EMB		24H	24H	48H	48H
		24H	48H	1H	2H	1H	2H
TRAT.	7	160,66*	400,99*	4,33*	0,76*	2,70*	0,64*
RESÍDUO	24	167,94	180,49	1,02	1,22	1,05	0,26
CV (%)		48,74	46,35	43,69	39,42	47,56	30,41

* F significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Quadro 4: Teores de lignina em sementes de *D. mollis* após embebição (EMB), 24 horas de clarificação e adição de floroglucinol por 1 e 2 horas em meio ácido, nos tratamentos TRL-VIC 02 a 08, comparados as testemunhas Etanol 70% (TRL-VIC 02 *) e água destilada (TRL-VIC 01 *).

TRATAMENTOS	MEDIAS 24 HORAS		
	EMB	1H	2H
TRL-VIC 01 – Água destilada (TESTEMUNHA 1)	35,29 A	2,50 AB	3,00 A
TRL-VIC 02 – Etanol 70% (TESTEMUNHA 2)	29,50 A	2,25 AB	2,50 A
TRL-VIC 03 – <i>D. mollis</i> fungi 6 CH	27,88 A	1,00 B	3,50 * A
TRL-VIC 04 – <i>D. mollis</i> fungi 12 CH	21,30 A	1,25 B	3,25 * A
TRL-VIC 05 – <i>Phosphorus</i> 6 CH	28,06 A	2,00 AB	2,25 * A
TRL-VIC 06 – <i>Phosphorus</i> 12 CH	17,41 A	4,25* A	2,50 A
TRL-VIC 07 – Rutina 6CH	20,27 A	3,25 AB	2,50 A
TRL-VIC 08 – Rutina 12 CH	32,98 A	2,25 AB	3,00 A

As médias seguidas de uma mesma letra não variam estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

As médias com asteriscos (* *) diferiram das testemunhas (água destilada – TR-VIC 01*) e (etanol 70% – TR-VIC 10*) pelo teste de Dunnett a de 5% de probabilidade.

Quadro 5: Teores de lignina em sementes de *D. mollis* após embebição (EMB), 48 horas de clarificação e adição de floroglucinol por 1 e 2 horas em meio ácido, nos tratamentos TRL-VIC 02 a 08, comparados as testemunhas Etanol 70% (TRL-VIC 02 *) e água destilada (TRL-VIC 01 *).

TRATAMENTOS	MÉDIAS		
	48 HORAS		
	EMB	1H	2H •
TRL-VIC 01 – Água destilada (TESTEMUNHA 1)	14,72 * B	2,50 AB	1,70 AB
TRL-VIC 02 – Etanol 70% (TESTEMUNHA 2)	43,80 * A	1,25 AB	1,84 A
TRL-VIC 03 – <i>D. mollis</i> fungi 6 CH	29,19 AB	3,25 * A	1,60 AB
TRL-VIC 04 – <i>D. mollis</i> fungi 12 CH	19,43 * AB	1,50 AB	0,75 * * B
TRL-VIC 05 – <i>Phosphorus</i> 6 CH	30,92 AB	1,00 B	1,68 AB
TRL-VIC 06 – <i>Phosphorus</i> 12 CH	41,80 * AB	2,50 AB	1,90 A
TRL-VIC 07 – Rutina 6CH	25,11 AB	3,00 AB	1,98 A
TRL-VIC 08 – Rutina 12 CH	26,88 AB	2,25 AB	1,97 A

As médias seguidas de uma mesma letra não variam estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

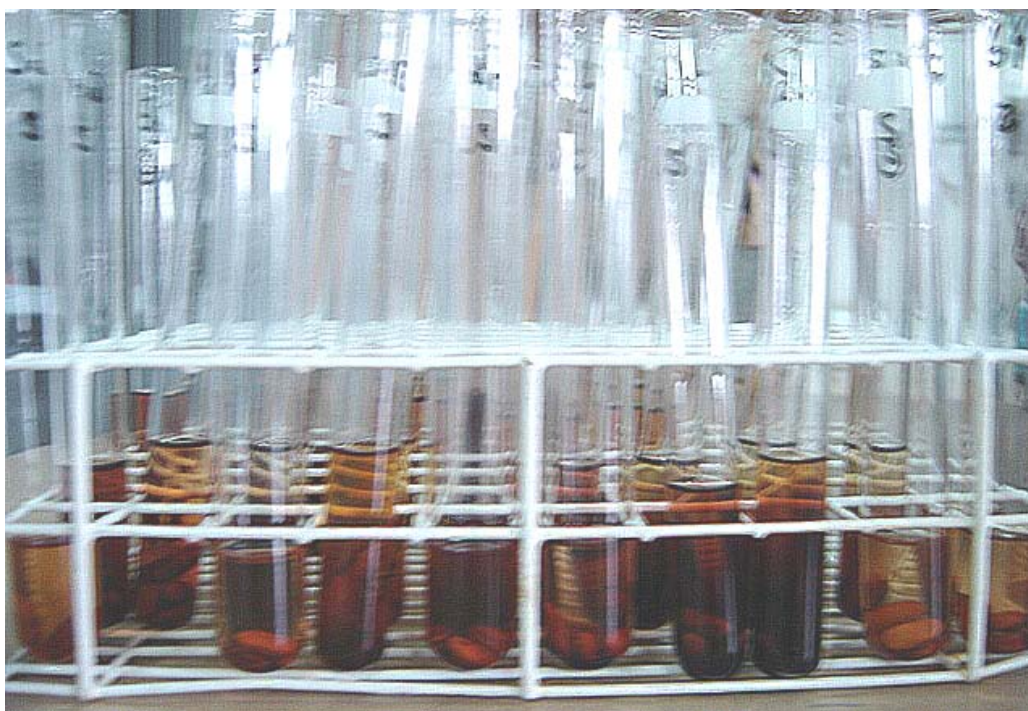
As médias com asterisco (*) diferiram das testemunhas (água destilada – TR-VIC 01*) e (etanol 70% – TR-VIC 10*) pelo teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade.

• dados transformados $\sqrt{2 H}$.

Figura 2: Tubos de ensaio contendo a avaliação dos teores de lignina por 24 horas, 1 hora após a adição de floroglucinol em meio ácido, em sementes de *D. mollis* nos tratamentos TRL-VIC 10 a 08.



Figura 2: Tubos de ensaio contendo a avaliação dos teores de lignina por 48 horas, 1 hora após a adição de floroglucinol em meio ácido, em sementes de *D. mollis* nos tratamentos TRL-VIC 10 a 08.



4.2. DISCUSSÃO

4.2.1. Atividade da fenilalanina amônia liase (PAL) nos tratamentos e nas amostras de campo.

Na via de biossíntese de compostos fenólicos a PAL é enzima precursora, conforme discutido anteriormente. A análise de PAL visou relacionar os tratamentos TRF-MOC, TFR-MOC e TR-VIC e confirmar que o aumento da PAL implicaria no aumento de compostos fenólicos.

ANTEROLA *et al* (2002) comentam que a reação catalisada pela PAL é passo comum a biossíntese de muitos outros compostos, tais como flavonóides, lignina, xantonas, taninos, dentre outros, sinalizando a existência de outros pontos importantes na regulação dessa via, que também deveriam ser estudados em *D. mollis*.

Os resultados de análise quantitativa da PAL em TR-VIC 01 a 16 estão de conformidade com os maiores teores de compostos fenólicos, principalmente nos tratamentos TR-VIC 09 (*Sulphur* 12 CH) e TR-VIC 05 (*Phosphorus* 12 CH) (capítulo 4 – quadro 4).

Nos preparados homeopáticos de dinamizações crescentes 6 e 12 CH houve linearidade das respostas em *Phosphorus* e *Sulphur*, onde as dinamizações mais baixas ou menores induzem a diminuição da PAL. Ocorre

também superioridade das maiores dinamizações em todos os tratamentos, destacando-se os medicamentos (*Phosphorus*, *Sulphur*), e os preparados homeopáticos Água, Etanol, Pequi. Pode ser inferido que dinamizações maiores podem interagir mais na via biossintética de compostos fenólicos, com conseqüente indução da PAL, excetuando o isoterápico *D.mollis fungi*, sem linearidade na resposta.

Segundo a teoria quântica, as partículas da solução ou de algum preparado, no caso da Homeopatia, são ondas que se comportam de maneira bastante peculiar. Partículas são confinadas em região pequena do espaço, reagem ao confinamento movimentando-se (dinamização), e quanto menor a região de confinamento mais rapidamente se agitará e maior será a energia formada no sistema (CAPRA, 1983). Essa energia é disponibilizada ao organismo vivo resultando em equilíbrio ou desequilíbrio da força vital do organismo, detectável nas plantas por alterações nutricionais, no metabolismo ou no desenvolvimento.

As homeopatias dos tratamentos TR-VIC podem atuar no metabolismo vegetal interferindo a nível primário (carboidratos, proteínas, aminoácidos, lipídios) ou a nível secundário (compostos fenólicos, alcalóides, terpenos).

Quase todos compostos fenólicos são formados via metabolismo ácido chiquímico e fenilalanina, ambos derivados do metabolismo dos açúcares (HERMANN, 1995). Alteração nas quantidades e tipos de açúcares causa aumento ou diminuição na síntese e degradação da maioria dos metabólitos secundários, inclusive lignina e taninos e flavonóides.

O metabolismo dos polifenóis, em determinadas situações, pode atuar como antioxidante e inativar o centro ativo de numerosas enzimas (PIÑOL &

PALAZÓN, 1996). Por sua vez, a biossíntese de compostos secundários depende da constituição genética da planta, que determina a formação das enzimas de especialização correspondentes, como a PAL.

O uso de preparados homeopáticos funcionou em folhas jovens de *D. mollis* como indutor da biossíntese da PAL e de compostos fenólicos. É essencial lembrar que plantas jovens de *D. mollis* cultivadas com preparados homeopáticos tem maiores teores de compostos fenólicos em suas folhas que em folhas adultas coletadas em Montes Claros (TRF-MOC 01 a 12) (capítulo 4).

A enzima PAL, segundo HARBORNE (1980) é mais ativa em folhas velhas ou adultas totalmente expandidas, o que é plenamente justificável, pois a maioria das folhas adultas tem maiores teores de compostos fenólicos necessários à fotoproteção, à defesa contra patógenos e herbívoros, ficando as folhas mais jovens, os folíolos ou os meristemas muito mais susceptíveis a ataque de afídeos, por exemplo, ou colonização de patógenos.

FEENY, RHOADES & CATES (1976) afirmam que as folhas jovens e plantas no estágio de sucessão são menos atraentes a herbívoros e, portanto, menor seria o investimento em defesas químicas, acumulando-se principalmente nas defesas qualitativas, como por exemplo, alcalóides. Já as folhas maduras e plantas em estágio final de sucessão seriam mais atraentes e teriam mais defesas quantitativas, com maior acúmulo de macromoléculas como taninos, ligninas e fibras.

COLEY *et al* (1985) propuseram que os metabólitos secundários presentes em determinada espécie seriam produzidos segundo a teoria de “translocação dos recursos” que considera que a quantidade de compostos secundários e

defesa anti-herbivoria depende da taxa intrínseca de crescimento da espécie e da disponibilidade de nutrientes no ambiente.

Atualmente admite-se que a produção de compostos fenólicos (metabólitos secundários) estaria interligada as condições estressantes, o que justifica a alta produção em plantas de *D. mollis*. Em estresse bioquímico-fisiológico ocorre a diminuição da síntese de proteínas, redução das defesas químicas e ao aumento de aminoácidos livres tornando-as mais palatáveis; ou ainda, em condições não estressantes, se privilegiaria o vigor da espécie, pois plantas mais vigorosas possuem crescimento mais intenso, com maiores teores de água e nutrientes disponíveis (plantas jovens e plântulas), ficando mais sujeita a herbivoria (FURLAN *et al*, 1998).

Segundo JONES & COLEMAN (1991) a poluição atmosférica pode reduzir o ganho de carbono, diminuindo a relação entre carbono e nitrogênio da planta, pois há redução nos teores de compostos secundários e aumento dos compostos nitrogenados.

Os frutos TFR-MOC 12 e TFR-MOC 11 repetem a relação traçada em compostos fenólicos (capítulo 4) quanto em PAL indicando que os pontos de colheita Pt-P01 e Pt-291 são matrizes em potencial de estudos genômicos (DNA, germoplasma, isoenzimas, variabilidade) e estudos fitotécnicos (germinação, crescimento, resistência, melhoramento).

A tendência de aumento da atividade da PAL nos frutos (TFR-MOC 01 a 12) possivelmente tenha ocorrido em função do aumento da síntese de etileno causado pelo amadurecimento e também pelas condições de armazenamento e manipulação, embora fossem armazenados e processados em baixa temperatura. Outro fator que pode ser fundamental nos maiores teores da PAL em frutos é que

durante a floração e frutificação ocorre aumento na síntese de fenólicos como mecanismo de proteção das sementes.

CHITARRA *et al* (2005) ainda alerta que um dos maiores problemas ao trabalhar com enzimas está associado às membranas celulares e as tentativas de “solubilização” que podem resultar em decréscimo quantitativo e qualitativo da PAL, o que não foi observado.

Os estudos com a PAL podem ser relacionados ao processo de indução de resistência, pois nos frutos houve diferença significativa entre os tratamentos e a concentração foi alta quando comparada com as da folha, levando a supor que essa diferença entre “partes” da planta seja relevante no processo de indução de resistência.

4.2.2. Determinação de lignina em sementes de *D. mollis*

A grande proporção de lignina (componente estrutural das paredes celulares) em sementes de *D. mollis* torna-se importante na dispersão pelos animais do cerrado, principalmente os mamíferos de grande porte como a anta (*Tapirus terrestris*), o lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*), raposa do campo (*Lycalopex vetulus*), uma vez que não é degradada pelos microrganismos ruminais, se mantendo intacta (WILKINS 1972; WILSON 1976; BIZERRIL, RODRIGUES & HASS, 2005, DALPONTE & LIMA, 1999). Além disso, evita o herbivorismo/ parasitismos das sementes, pois está diretamente relacionada a proteção contra à colonização por microrganismos, patógenos ou herbívoros

A lignina, composto fenólico na presença de floroglucinol em meio ácido colore-se de rósea a avermelhada, de acordo com a intensidade e a quantidade

presente nas sementes. Este teste está sujeito às variações individuais dos avaliadores e ao empirismo do método.

Ao se tentar liberar lignina de sementes de *D. mollis* com preparados homeopáticos, infere-se que a dureza tegumentar possa ser rompida ou amenizada por tais tratamentos. Desta forma, *Phosphorus* 12 CH juntamente com Etanol 70% foram mais eficientes, na embebição e quebra de resistência tegumentar, liberando cor mais intensa após 48 horas e mais 2 horas com floroglucinol em meio ácido.

Segundo a matéria médica na agricultura (2006) *Phosphorus* “afeta profundamente a nutrição e a função de cada tecido”, o que justificaria o maior resultado. Outro aspecto que pode ser considerado é que o tratamento TR-VIC 05 *Phosphorus* 12 CH propiciou aumento da PAL que ocasionaria aumento de fenólicos, inclusive lignina.

Os tratamentos homeopáticos foram superiores em 48 horas comparados a 24 horas, indicando que a liberação de lignina é lenta e gradual e a informação transmitida pelas homeopatas facilita o rompimento e a quebra tegumentar propiciando colorações mais intensas após 2 horas, exceto o isoterápico *D. mollis* fungi na 6 CH e 12 CH.

Os medicamentos isoterápicos feitos com o próprio organismo visam reestabeecer o equilíbrio as situações emergenciais, atuam diretamente no problema, buscando aliviar temporariamente. O isoterápico ou nosódio de *D. mollis* fungi foi feito com fungos que cresceram durante a germinação de sementes de *D. mollis*. A escolha desse tratamento baseou-se na possível infestação das sementes por saprófitas de solo, na eficácia dos preparados 12 CH e 6 CH em evitarem o aparecimento de sementes mofadas (capítulo 2), e

conseqüentemente em prevenir ações danosas imediatas (contaminações) nas sementes frente ao etanol 70% e floroglucinol em meio ácido (1 e 2 horas) nos tratamentos 24 e 48 horas. Pelo comportamento emergencial, os tratamentos TRL-VIC 03 e 04 (*D. mollis* fungi 6 CH e 12 CH) tiveram maior eficiência em 24 horas, após 2 horas com reagente de cor em meio ácido, conforme observado no quadro 4, se destacando em relação aos demais tratamentos.

5. CONCLUSÕES

- Os teores de compostos fenólicos (capítulo 4) estão diretamente relacionados a aumentos na PAL em *D. mollis*.
- Os resultados de análise quantitativa da PAL em TR-VIC 01 a 16 estão de conformidade com os maiores teores de compostos fenólicos (capítulo 4), principalmente nos tratamentos TR-VIC 09 (*Sulphur* 12 CH) e TR-VIC 05 (*Phosphorus* 12 CH).
- A PAL pode ser relacionada ao processo de indução de resistência em frutos devido a diferença significativa entre os tratamentos e a diferença de concentração entre as demais amostras (folhas e folhas de plantas jovens) analisadas.
- Os tratamentos homeopáticos influenciam diretamente a liberação de ligninas de sementes de *D. mollis*, após 48 horas.
- O isoterápico *D. mollis* fungi 6 CH e 12 CH tem comportamento emergencial na liberação de ligninas de sementes de *D. mollis*, destacando-se dos demais tratamentos em 24 horas.