

40651

**MARLY PEDROSO DA COSTA**

**DESENVOLVIMENTO E TEOR DE ALCALÓIDES EM PLANTAS DE IPECA  
(*Cephaelis ipecacuanha*, A. Richard.) OBTIDAS *IN VITRO* SUBMETIDAS ÀS  
CONDIÇÕES NUTRICIONAIS EM CASA DE VEGETAÇÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de "Mestre".

**Orientador**

**Prof. JOSÉ EDUARDO BRASIL PEREIRA PINTO**

**LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
1995**

FICHA CATALOGRÁFICA PREPARADA PELA SEÇÃO DE CATALOGAÇÃO E  
CLASSIFICAÇÃO DA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFLA

Costa, Marly Pedroso da.

Desenvolvimento e teor de alcalóides em plantas de ipeca (*Cephaelis ipecacuanha*, A. Richard.) obtidas *in vitro* submetidas às condições nutricionais em casa de vegetação. / Marly Pedroso da Costa. -- Lavras : UFLA, 1995.

61 p. : il.

Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto.

Dissertação (Mestrado) - UFLA.

Bibliografia.

1. Ipecacuanha - Nutriente. 2. Emetina. 3. Propagação *in vitro*. 4. Casa de vegetação. 5. Alcaloide. 6. Planta medicinal. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-581.634

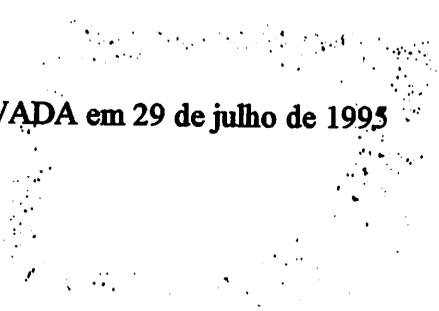
-633.88352

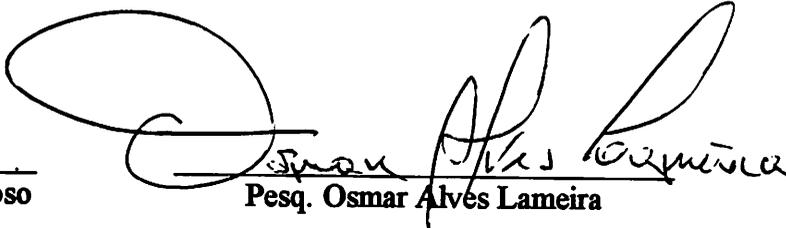
**MARLY PEDROSO DA COSTA**

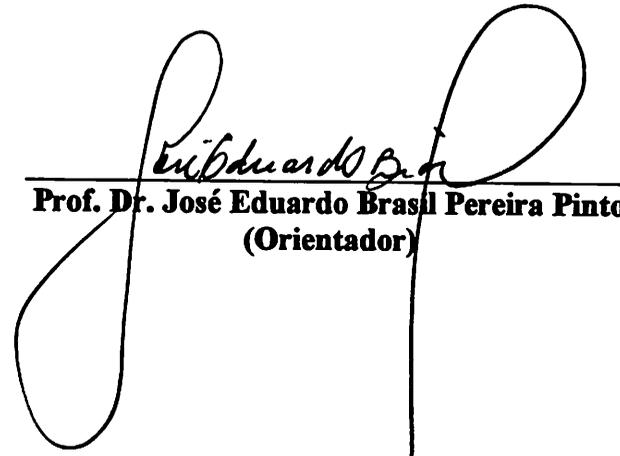
**DESENVOLVIMENTO E TEOR DE ALCALÓIDES EM PLANTAS DE IPECA  
(*Cephaelis ipecacuanha*, A. Richard.) OBTIDAS *IN VITRO* SUBMETIDAS ÀS  
CONDIÇÕES NUTRICIONAIS EM CASA DE VEGETAÇÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de "Mestre".

APROVADA em 29 de julho de 1995

  
Maria das Graças Cardoso  
Profa. Dra. Maria das Graças Cardoso

  
Pesq. Osmar Alves Lameira

  
Prof. Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto  
(Orientador)

**Aos meus pais,**

**Waler Lima da Costa e**

**Maria Severa Miranda e**

**as minhas irmãs.**

**DEDICO**

### **ORAÇÃO DA SABEDORIA**

**Senhor, dá-me a esperança para vencer minhas ilusões, todas.**

**Plantai em meu coração a sementeira do amor.**

**E ajuda-me a fazer feliz o maior número da humanidade possível, para ampliar os seus dias risonhos e reduzir as noites tristonhas.**

**Transforma meus rivais em companheiros, meus companheiros em amigos e meus amigos em entes queridos.**

**Não me deixes ser um cordeiro perante os fortes e nem um leão diante dos fracos.**

**Dá-me o sabor de saber perdoar e afastai de mim o desejo de vingança.**

**Senhor iluminai meus olhos para que eu veja os defeitos de minha alma e vendai-os para que eu não comente os defeitos alheios.**

**Senhor, levai de mim a tristeza e não a entregueis a mais ninguém.**

**Enchei meu coração com divina fé, para sempre louvar o vosso nome e arrancai de mim o orgulho e a presunção.**

**Deus fazei de mim um homem realmente justo.**

**Ao Centro Espírita Augusto Silva**

**OFEREÇO**

## **AGRADECIMENTOS**

À todos que compartilharam comigo momentos pouco felizes e momentos felizes. Àqueles que sem saberem, me proporcionaram alegria por um simples sorriso, abraço, cumprimento ou por pequenas frases de incentivo carinhoso.

Àqueles também que quando eu pedi ou quando me viram precisar, me deram a ajuda necessária. À todos que aceitaram a minha amizade mesmo conhecendo as minhas qualidades e os meus defeitos.

**ANDRÉ, SÔNIA, BETH, MAGÊ, MARLON, GIDELMA, ANA, FÁTIMA, ARI, SÉRGIO, SANDRA, DOUGLAS, ROGÉRIO, MOEMY, LÚCIO, EVARISTO, LEIDE, FÁBIO, URQUISA, IZABEL, SOLANGE, MÁRCIA, LUCY, LAURA, MARLY, DARTANHAN, RICARDO, CLÓVIS, WALTER, MARCEL, LUCIVANE, TÂNIA, VESPAZIANO, DÉBORA, POLIANA, EVALDO, VANTUIL, FLÁVIA, BENI, DULCIMARA, AURORA, RUTH, GERALDO, REGINA, TITINA, DUM, VILAS, VILMA, LALI.**

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES e Universidade Federal de Lavras - UFLA, pela oportunidade de incentivo financeiro e educacional que me foram dados.

À Dr<sup>a</sup> SUZELEI DE CASTRO FRANÇA (UNAERP), com a ajuda prestada na quantificação do alcalóide.

À banca examinadora de minha dissertação , pela transmissão de tranquilidade, segurança e amizade.

Ao Professor José Eduardo e ao Pesquisador Osmar Alves Lameira, pela orientação e amizade.

Existem pessoas que preenchem todas as nossas expectativas do que pode ser para nós um grande *amigo*. À pessoas assim não dá para deixar de fazer um agradecimento especial. À você *Chicão* eu ofereço uma frase muito conhecida de todos nós: **AMIGO É COISA PRA SE GUARDAR DEBAIXO DE SETE CHAVES DENTRO DO CORAÇÃO...**

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS .....	vii
LISTA DE FIGURAS .....	viii
LISTA DE ABREVEATURA .....	x
RESUMO .....	xi
SUMMARY .....	xiii
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	4
2.1 A planta .....	4
2.1.1 Nutrição × crescimento e desenvolvimento .....	7
2.1.2 Cultura de tecidos vegetal × plantas medicinais .....	10
2.1.3 Nutrição × produtos secundários .....	12
2.1.4 Produtos secundários × alcalóides .....	15
2.1.5 Emetina .....	19
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	22
3.1 Obtenção de plântulas <i>in vitro</i> .....	22
3.1.1 Aclimação .....	23
3.1.2 Tratamentos nutricionais realizados .....	23
3.1.3 Características Avaliadas .....	24
3.1.4 Delineamento Experimental e Análise Estatística .....	26
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	27
4.1 Acumulação de biomassa na parte aérea e no sistema radicular .....	27
4.2 Particionamento da matéria seca .....	30
4.3 Comprimento do sistema radicular .....	34
4.4 Número de raízes primárias .....	36

	<b>Página</b>
4.5 Biossíntese de emetina .....	37
4.6 Produção de proteínas solúveis totais .....	41
4.6.1 Produção de proteína × emetina .....	43
5 CONCLUSÕES .....	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	49
APÊNDICE .....	55

## LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Condições Físico-Químicas do solo utilizado na composição do substrato de cultivo de plantas de ipecacuanha. UFLA, Lavras - MG, 1995 .....	24
2	Rendimento de emetina (mg) por produção de biomassa seca das raízes de ipecacuanha, influenciadas pelas concentrações das soluções nutritivas e época de cultivo. UFLA, Lavras - MG, 1995 .....	30
3	Particionamento da biomassa seca (g) na parte aérea e no sistema radicular das plantas de ipecacuanha, submetidas a diferentes concentrações das soluções nutritivas durante três épocas de cultivo. UFLA, MG- Lavras, 1995 .	31
4	Valores médios do número de raízes de ipecacuanha induzidos por diferentes concentrações da solução nutritiva. UFLA, Lavras - MG, 1995 .....	36
5	Valores médios dos teores de emetina contidos em mat.seca das raízes de ipecacuanha em %, provenientes da cultura <i>in vitro</i> , e tratadas com diferentes concentrações da solução nutritiva da formulação do meio MS, em diferentes épocas de cultivo. UFLA, Lavras - MG, 1995 .....	41

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Fotografia ilustrativa da descrição botânica da planta de ipecacuanha. Lavras - MG, 1995 .....	5
2	Representação esquemática dos compostos nitrogenados precursores da síntese dos alcalóides (James, 1950) .....	15
3	Representação resumida da via metabólica do alcalóide emetina. UFLA, Lavras - MG, 1995 .....	19
4	Estruturas químicas de (A) Ácido chiquímico, (B) Tirosina e (C) Emetina. UFLA, Lavras - MG, 1995 .....	20
5	Representação gráfica da influência das soluções nutritivas na acumulação de biomassa na parte aérea das plantas de ipecacuanha durante as épocas de cultivo. UFLA, Lavras - MG, 1995 .....	28
6	Representação gráfica da influência das soluções nutritivas na acumulação de biomassa nas raízes das plantas de ipecacuanha durante as épocas de cultivo. UFLA, Lavras - MG, 1995 .....	29
7	Fotografia ilustrativa das plantas de ipecacuanha durante a época de doze meses de cultivo e submetidas as diferentes concentrações das soluções nutritivas. Representações das concentrações das soluções nutritivas: 0 MS= controle; 1/1 MS= 100%; 1/2 MS= 50%; 1/4 MS= 25%. Lavras - MG, 1995 .....	33
8	Representação gráfica do comprimento do sistema radicular ao longo do período de 12 meses de cultivo. UFLA, Lavras - MG, 1995 .....	35
9	Fotografia ilustrativa dos sistemas radiculares de plantas de ipecacuanha com doze meses de cultivo, submetidas as diferentes concentrações das soluções nutritivas. Representações das concentrações das soluções nutritivas: 0 MS = controle; 1/1 MS = 100%; 1/2 MS = 50%; 1/4 MS = 25%. UFLA, Lavras - MG, 1995 .....	37

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
10	Representação gráfica do efeito da interação solução nutritiva e época na indução da biossíntese do alcalóide emetina. UFLA, Lavras - MG, 1995 .....	38
11	Representação gráfica dos efeitos das diferentes concentrações das soluções nutritivas sob a produção de proteínas nas raízes de ipecacuanha. UFLA, Lavras - MG, 1995 .....	42
12	Representação gráfica da influência das concentrações nutritivas sob a produção de proteína e emetina em raízes de ipecacuanha com seis meses. UFLA, Lavras - MG, 1995 .....	44
13	Representação gráfica da influência das concentrações nutritivas sob a produção de proteína e emetina em raízes de ipecacuanha com nove meses de cultivo. UFLA, Lavras - MG, 1995 .....	45
14	Representação gráfica da influência das concentrações nutritivas sob a produção de proteína e emetina em raízes de ipecacuanha com doze meses de cultivo. UFLA, Lavras - MG, 1995 .....	47

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**AIA = ácido indolacético**

**ANA = ácido naftalenoacético**

**BAP, BA = benzil aminopurina**

**AIB = ácido indolbutírico**

**KIN = Kinetina**

**AG<sub>3</sub> = Ácido**

**TDC = tirosina descarboxilase**

**MS = Murashig e Skoog (Meio de Cultura)**

**B<sub>5</sub> = Gamborg et al. (Meio de Cultura)**

**WP = Wood Plant (Meio de Cultura)**

## RESUMO

COSTA, Marly Pedroso. **Desenvolvimento e teor de alcalóides em plantas de ipeca (*Cephaelis ipecacuanha*, A. Richard.) obtidas *in vitro* submetidas às condições nutricionais em casa de vegetação.** Lavras: UFLA, 1995. 61p. (Dissertação - Mestrado em Fisiologia Vegetal)\*.

A planta *Cephaelis ipecacuanha*, A. Richard., é uma planta medicinal que possui em sua raízes o princípio ativo emetina, o qual é eficazmente utilizado no combate da disenteria amebiana. O objetivo deste trabalho, foi estudar o desenvolvimento e crescimento de plântulas provenientes de cultura de tecidos em relação a diferentes níveis de nutrição mineral, e a sua correlação com a produção deste alcalóide no sistema radicular. As plantas foram multiplicadas a partir de segmentos internodais cultivados no meio MS sólido, adicionado com 6,66  $\mu\text{M}$  de BAP, os brotos obtidos foram induzidos ao enraizamento no meio MS com a metade das concentrações dos sais, suplementado com 4,92  $\mu\text{M}$  de AIB. Posteriormente as plântulas foram transferidas para casa de vegetação e submetidas a regimes nutricionais semanalmente, utilizando como solução nutritiva a formulação dos macros e micronutrientes do meio MS, nas seguintes concentrações (%): 0; 25; 50 e 100. As plantas foram avaliadas durante seis, nove e doze meses de cultivo. No período de seis meses, a concentração de 25% foi a que proporcionou melhor indução da biossíntese do alcalóide emetina, maior rendimento por matéria seca acumulada na raiz. Durante

---

\* Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto. Membros da Banca: Osmar Alves Lameira e Maria das Graças Cardoso.

aos nove meses, 50% da solução de sais do MS apresentaram melhores resultados. Já aos doze meses quando foi alcançada a maior síntese do alcalóide, verificou-se que 100% da solução foi a melhor na indução da emetina. Entretanto, neste período as plântulas irrigadas com a solução nutritiva de 50%, alcançaram maior rendimento de emetina em relação a biomassa do sistema radicular (110,37 mg).

## SUMMARY

### **DEVELOPMENT AND CONTENT OF ALKALOID IN IPECAC PLANTS (*Cephaelis ipecacuanha*, A. Richard.) OBTAINED IN VITRO AND SUBJECTED TO NATURAL CONDITIONS IN GREENHOUSE.**

The plants *Cephaelis ipecacuanha*, A. Richard., is a medicinal plant which has in its roots the active principle emetine, which is effectively utilized in the combat of amebian desintery. The aim of this work was to investigate the development and growth of plantlets from tissue culture relative to different levels of mineral nutrition and its correlation with the production of alkaloid in the root system. The plantlets were multiplied from internodal segments on Murashige and Skoog medium with 6,66  $\mu\text{M}$  of benzyladenine (BAP) and shoots obtained were induced to rooting on MS medium with the half the concentrations of the salts, supplemented with 4,92  $\mu\text{M}$  of IBA. Rooted plantlets were transplanted to pots in a greenhouse and subjected to nutritional regimes weekly, utilizing as a nutritive solution, the formulation of macro and micronutrients of the MS medium in the following concentrations: 0, 25%; 50% and 100%. The plants were evaluated during six, nine and twelve months of cultivation. In the period of six months, the concentration of 25% was the one which yield best induction of biosynthesis of the alkaloid emetine, greatest yield per dry matter accumulated in the root biomass production in the root system. For nine months, 50% of the solution of MS salts showed the best results. However, at twelve months when the highest synthesis of the alkaloid, it was verified that 100% of the solution was the best in inducing emetine. Meanwhile, the plants irrigated with the nutritive solution of 50%, reached highest yield of emetine in relation to the root system biomass (110,37 mg).

## 1 INTRODUÇÃO

As reservas naturais estão sendo sistematicamente destruídas e milhares de espécies estão se extinguindo antes dos cientistas as estudarem. Nas últimas décadas, perto da metade das florestas tropicais foram perdidas, e com elas grande parte da vida na terra.

Possuidor de umas das mais ricas floras do mundo, o Brasil conta com 120.000 espécies das quais cerca de 10% são consideradas medicinais, deste total muito pouco está sendo estudado. Com o maior patrimônio de diversidade genética vegetal do planeta, o nosso país investe pouco nas pesquisas em bioquímica, genética e fisiologia vegetal referentes a este grupo de plantas. Entretanto, nos E. U. A, estimativas de vendas de medicamentos derivados de plantas, constataam que o mercado destes produtos movimenta anualmente US\$ 12 bilhões de dólares (Fundação Brasileira de Plantas Medicinais, 1991). Este alto valor comercial é decorrente do fato de que, a tradição no uso de plantas medicinais vem aumentando de geração à geração. Mesmo em países bastantes desenvolvidos, como os do Oeste da Europa, onde o consumo de medicamentos de origem vegetal dobrou nos últimos anos, uma das principais razões desta renovação pode está relacionado com a eficácia, de um grande número de preparações farmacêuticas terem demonstrado através dos estudos, a mesma aplicabilidade no padrão científico das drogas sintéticas (Hamburguer e Hosttemann, 1991).

Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS), 80% da população mundial usa medicações tradicionais (populares) para suprir as necessidades de assistência médica

primária. Nos países desenvolvidos, as drogas químicas derivadas de plantas também desempenham um papel importante na composição dos medicamentos. Nos EUA, por exemplo 25% de todas as receitas médicas de 1959-1980 continham extratos de plantas ou princípios ativos preparados de plantas, em 1980 os consumidores americanos gastaram US\$ 8 bilhões em receitas médicas que continham composto obtidos a partir de espécies vegetais. Em torno de 7.000 compostos atualmente utilizados na medicina moderna são derivados de produtos naturais. Em países altamente industrializados, 40-45% dos produtos farmacêuticos comerciais são de origem natural (Elisabetsky, 1987).

Entre 1980 e 1984, foram emitidas no Japão, 39 patentes para utilização de compostos químicos vegetais; 32 das quais (82%) foram para produtos secundários com propriedade medicinal (Fujita e Tabata, 1987).

Devido aos altos custos de importação, o Brasil vem sentindo a necessidade de buscar soluções próprias para o desenvolvimento de tecnologias farmacêutica nacional. Constitui campo de alta relevância, a pesquisa de plantas medicinais da flora brasileira.

A planta *Cephaelis ipecacuanha*, A.Richard, popularmente conhecida por ipeca possui em suas raízes sete alcalóides como princípios ativo, sendo que a emetina se destaca como o principal. Estes alcalóides são eficazmente utilizados no combate da disenteria amebiana, além de possuírem propriedades adstringentes, espectorante e antiinflamatória (Vieira, 1991).

Em decorrência da sua exploração vegetal indiscriminada, destruição das florestas, longo tempo de germinação das sementes, a ipeca se encontra em via de extinção. As plantas são herbáceas, perenes, pertencente a família Rubiaceae (Vieira, 1991). É uma planta indígena do Brasil, encontrada na Amazônia sob árvores de grande porte.

O composto secundário emetina, faz parte dos alcalóides isoquinolínicos, e tem como seu aminoácido precursor, a tirosina. Estes compostos geralmente estão em pequeníssimas quantidades nas plantas, e por isso são avaliados em vários dólares. Os metabólitos secundários são expressados em células, tecidos e órgãos durante específicos estágios de crescimento nos vegetais. Na ipeca, em condições naturais de cultivo, esta expressão ocorre em maior taxa quando a planta está adulta, aproximadamente com 3-4 anos, ou seja, justamente na época de sua floração, apresentando 1,28% de emetina (JHA et. al, 1991).

A cultura de tecidos vegetal, é uma ferramenta promissora para preservação e propagação rápida de espécies que levam longo tempo para germinar, possuem baixa taxa de frutificação e que estão em via de extinção. Atualmente, muitas plantas medicinais já são micropropagadas *in vitro*. Através da biotecnologia é possível aumentar a produção e diminuir o preço de princípio ativos fitoquímicos.

Fatores que estimulam o metabolismo primário, o crescimento e desenvolvimento dos vegetais, como por exemplo a nutrição mineral, podem estimular positivamente a produção dos alcalóides, pois o metabolismo secundário está ligado ao metabolismo primários através de seus aminoácidos precursores.

Não existem relatos sobre a ipeca quanto ao aspecto nutricional influenciando no seu crescimento, desenvolvimento e produção de emetina.

O objetivo do presente estudo, é iniciar o esclarecimento da exigência nutricional da ipeca, correlacionado com a maior produção de emetina em relação ao seu desenvolvimento e crescimento das plântulas provenientes da cultura de tecidos.

## 2 REFERÊNCIAL TEÓRICO

### 2.1 A planta

#### a) Condições atuais

A planta *Cephaelis ipecacuanha*, A. Richard, é conhecida no Brasil vulgarmente como ipeca, poaia e ipecacuanha. Ocorre na América Central (Nicarágua, Costa Rica e Panamá) e na América do sul (Colômbia e Brasil), sendo que no Brasil, as populações estão restritas aos estados de Rondônia, Mato Grosso, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Bahia, Pernambuco e Amazonas. Nas Américas a produção da ipeca é toda por extrativismo, mas há alguns anos, mudas da ipeca foram levadas do Brasil para a Índia, que tornou-se o único país a cultivá-la. A maior parte da produção é exportada sob a forma de planta seca ou de extrato obtido das raízes, e o Brasil está entre os principais exportadores, tendo como principais mercados a Alemanha, Espanha, França, Japão, Malásia, Portugal e Países Baixos. De acordo com informações da Cacex, o quilo da raiz da planta seca de ipecacunha custava em 1990, US\$ 16.48; enquanto que o quilo do extrato em 1988 custava US\$ 242.87. A ipeca do Brasil é considerada a mais valiosa, porque possui maiores teores de emetina que a da América Central e Colômbia (Assis, 1993). Atualmente no mercado interno, o custo do quilo da raiz está em torno de US\$ 29.67.

### b) Descrição botânica

A descrição botânica da ipeca feita por Penna (1946), relata que se trata de uma planta pertencente a família das Rubiaceae, é herbácea, tem comumente 36 cm de altura, possui folhas opostas, ovais e lanceoladas; as flôres são brancas, e os frutos ovóides (Figura 1). A raiz é fibrosa, com depressões circulares, é de 24 cm de comprimento, externamente é cinzenta escura, cheiro fraco e sabor amargo e nauseante. Segundo Gupta (1971), as raízes de plantas de ipeca com a idade de três anos apresentam 30g de peso seco.



FIGURA 1. Fotografia ilustrativa da descrição botânica da planta de ipecacuanha. Lavras - MG, 1995.

### **c) Reprodução da ipecacuanha**

A sua reprodução de acordo com Alzugaray e Alzugaray (1988) ocorre por fragmentos da raiz e sementes. Prefere local sombreado coberto de árvores frondosas que lhe fornecem abrigo, abundante material vegetal em decomposição, e é uma planta de difícil cultivo. A reprodução por sementes é bastante demorada, levando seis meses para a sua germinação, enquanto que a sua propagação por estacas ainda não está dominada (Gatonni, 1959; Kalyanasundaram, 1968).

Plantas provenientes de semente (Chatterjee et al., citado por Ikeda et al., 1988), florescem após dois anos de cultivo, entretanto este último autor cita que plantas de ipeca originadas de cultura de tecidos florescem em casa de vegetação após dois meses de cultivo, no entanto nunca dão frutos. A sua propagação *in vitro* no Brasil, tem alcançado recente sucesso nas pesquisas de Lameira, Costa e Pinto (1994).

### **d) Composição química das raízes**

Nas raízes da ipecacuanha, se encontram sete alcalóides, na proporção de 2 a 3% do peso seco, que estão localizados preferencialmente no córtex, e são: emetina, cefalina, psicotrina, ipecamina, hidroipecamina, metilpsicotrina emetamina, dos quais, os mais importantes devido ao seu interesse farmacológico são os dois primeiros (Ra-Món, 1957). Os vários efeitos medicinais que os alcalóides da poaia oferecem segundo Vieira (1991) são: propriedades adstringentes, hemostáticos, sudoríficos, eméticos, é recomendado para o tratamento de náuseas e vômitos na gravidez e asma. Ele recomenda como uso geral, o chá de 6 gramas de raiz para 200 ml de água fervente, deixar esfriar e tomar 3 xícaras ao dia.

### 2.1.1 Nutrição × crescimento e desenvolvimento

A relação peso seco da parte aérea e raiz, mostra a distribuição de assimilados pela planta, a parte aérea e o sistema radicular estão em constante competição pelas substâncias assimiladas ou sintetizadas pela planta. Assim, isto pode servir como base para identificação dos fatores ambientais e químicos que influenciam no crescimento e desenvolvimento das plantas (Aung, 1982).

Durante o início do crescimento, a raiz é menos exigente ao nível de nitrogênio no solo, a resposta do seu crescimento a este elemento está relacionado com o estágio de desenvolvimento do vegetal (Mackay e Barber, 1986).

Espécies perenes direcionam aproximadamente 50% dos seus fotossintatos para o crescimento da raiz (Person, 1979), enquanto espécies anuais direcionam 30% (Maizlich, Fritton e Kendall, 1980). Quando as plantas estão sob deficiência nutricional de nitrogênio elas chegam a acumular 90% da biomassa total nas raízes (Salisbury e Ross, 1992). Em trabalhos com milho foi verificado que plântulas cultivadas com nitrogênio nas dosagens de 105 e 210 mg/l, as respectivas relações de parte aérea e raiz, 1,25 e 2,89, enquanto que nas plantas controle foi de 0,63 (Maizlich, Fritton e Kendall, 1980). Porém, segundo Salisbury e Ross (1992), plantas que crescem em excesso de nitrogênio, têm as folhas com coloração verde escuro e mostram abundante folhagem, geralmente com alta proporção parte aérea/raiz, e apresentam um retardamento na fase de floração. O nitrogênio na forma de  $\text{NH}_4^+$ , na dosagem de 280 mg/l promove o engrossamento das raízes e elevam o número de raízes laterais.

Durante o desenvolvimento inicial das plantas de *Pipper*, Leskovar, Cantliffe e Stoffela (1989) observaram um requerimento de 84 mg/l de nitrogênio, mas ao chegar próximo a fase de floração, as folhas e as raízes aumentaram sua exigência nutricional para 112 mg/l, e ambas tiveram sua matéria seca aumentadas com o aumento do nível de nitrogênio.

Em ensaios com amendoim adubados com nitrogênio, Singh e Ahuja (1985), constataram aumento da produção de matéria seca, durante todos os estágios de crescimento. O elemento fósforo promoveu o aumento de peso seco, comprimento em raízes de milho, embora elas tenham se tornado mais finas (Anghinoni e Barber, 1980).

Concentrações de 90 mg/l de nitrogênio supridas às plantas de *Hyocymus muticus* parceladas em três épocas, promoveram 62% de aumento de matéria seca, contudo o tempo de aplicação não influenciou significativamente no rendimento (Yadav et al., 1984).

Um dos aspectos que ajuda bastante a ação do nitrogênio, na forma de nitrato a aumentar o rendimento de matéria seca, é sua influência no nível de fito-hormônios, particularmente na formação de citocininas na raiz (Darrall e Wareing, 1981), a qual é estimulada pela presença de  $\text{NO}_3^-$ . É grandemente conhecido que aspectos do crescimento de plantas envolvem o controle hormonal (Magalhães e Wilcox, 1987). Além do mais, a adição de  $\text{NO}_3^-$  no solo resulta no aumento da atividade e na produção de proteínas nitrato redutase nas raízes e na parte aérea (Somer et al., 1983), a qual é responsável pela redução inicial do nitrato e que tornará disponível o nitrogênio na síntese de aminoácidos e conseqüentemente, a produção de outras proteínas (Oaks, 1985). Contudo, para que ocorra tanto a absorção do nutriente como a produção da proteína, a planta precisa produzir mais ATP, uma vez que o passo inicial da síntese protéica, é ativação dos aminoácidos na presença de ATP.

Deste modo, os elementos magnésio, potássio, nitrogênio e fósforo são grandemente necessários para que ocorra a síntese protéica, e conseqüentemente a produção de biomassa vegetal. Pois, o potássio une os RNA<sup>s</sup> aos ribossomos durante o processo de tradução; o magnésio tem a função de agregar as duas subunidades dos ribossomos; o fósforo faz parte dos nucleotídeos e o nitrogênio dos aminoácidos (Marschner, 1990).

Porém as proteínas do vegetal adulto se encontram em um estado dinâmico, sendo continuamente sintetizadas e desdobradas. Faltando nitrogênio para as plantas a partir de um dado momento, o elemento acumulado em órgãos mais velhos, folhas principalmente, é redistribuído para órgãos mais novos. Sem nitrogênio não há proteína, conseqüentemente as plantas deficientes se desenvolvem menos (Malavolta, 1980).

A participação de macro e micronutrientes no processo de rizogênese pode ser analisada em duas fases distintas, na indução dos primórdios radiculares, e em seu desenvolvimento.

Assim, o aumento do eixo principal e a inibição da formação de raízes laterais, são geralmente observadas quando ocorre um suprimento subótimo ou deficiência de nutrientes minerais, por exemplo potássio e nitrogênio (Jensen, 1982). A acumulação de matéria seca da raiz é menos afetada do que a da parte aérea (Heitholt, 1989). Logo se taxas ótimas são supridas, o crescimento da raiz é estimulado, se o nível é excessivo o crescimento é reduzido (Malzlish, Fritton e Kendal, 1980).

O contínuo influxo de nutrientes acima das concentrações que saturam a planta, e que são necessários para o crescimento, causa uma acumulação de luxúria nutricional nas plantas, no entanto esta abundância pode mudar durante as épocas de crescimento (Chapin, 1980).

Em tomates os nutrientes minerais promoveram o alongamento das raízes e induziram a emergência das raízes primárias (Aung, 1982). O aumento da adubação nitrogenada promoveu o comprimento e o número de raízes primárias nas plantas de *Pipper* (Leskovar, Cantliffe e Stoffella, 1989).

Outro fator externo que inibe o crescimento no alongamento das raízes primárias, é a condição de solos aerados pobremente, compactados e com temperatura altas, favorecem a acumulação de etileno na rizosfera, provocando além disso, a absorção de ions que promovem a clorose nas plantas (Jackson, Drew e Griffard, 1981).

### 2.1.2 Cultura de tecidos vegetal × plantas medicinais

A cultura de tecidos vegetal tem sido considerada como uma ferramenta promissora para a preservação de fontes vegetais assim, bem como a propagação comercial de plantas medicinais (Miachir, 1992).

As plantas medicinais são de grande interesse na biotecnologia e um dos seus principais objetivos em suas pesquisas, é aumentar a produção e diminuir o preço de alguns metabólitos secundários (Bajaj, Furmanowa e Olszowsk, 1988).

Durante os últimos anos o interesse na propagação em grande quantidade de plantas medicinais *in vitro*, tem aumentado distintamente por várias razões. Muitas dessas plantas, quando propagadas por métodos convencionais, levam um longo tempo para se multiplicarem, apresentam baixa taxa de multiplicação e germinação das sementes, além de que várias espécies estão em via de extinção. Muitas plantas produtoras de principios ativos já possuem um protocolo

ideal de micropropagação, e mais precisamente 108 plantas medicinais já foram estabelecidas *in vitro* (Bajaj, Furmanowa e Olszowsk, 1988).

Estudando a propagação clonal da ipeca através de segmento internodal, Ikeda et al. (1988) obtiveram apenas dois brotos por segmento, quando inoculados no meio B<sub>5</sub> sólido suplementado com 0,05 µM de ANA e 13,32 µM ou 22,20 µM de BA, enquanto que por segmento apical conseguiu-se apenas um broto.

Através de observações, Yoshimatsu e Shimomura (1991), perceberam que segmentos internodais quando inoculados no meio MS, e adicionado com 0,44 µM de BA ou 0,46 µM de KIN, produziram dez brotos por segmento. Utilizando o mesmo tipo de explante, inoculado com 6,66 µM de BAP no meio B<sub>5</sub>, Lameira, Costa e Pinto (1994) obtiveram até nove brotos por segmentos na cultura inicial, e uma média de cinco brotos no subcultivo.

Na fase de indução de enraizamento dos brotos de ipeca, Ikeda et al. (1988) utilizando o meio B<sub>5</sub> com 17,12 µM de AIA, alcançaram 100% de enraizamento, um sistema radicular com 1,0 cm de comprimento e em média 7,3 raízes por plântula após um a dois meses de cultivo *in vitro*. As plântulas assim obtidas, foram aclimatadas em casa de vegetação, as quais depois de sete meses apresentaram as raízes com 5 cm de comprimento.

Posteriormente Yoshimatsu e Shimomura (1991), utilizaram os meios WP e B<sub>5</sub> sem regulador de crescimento para enraizar brotos *in vitro*. Após um ano em casa de vegetação, obtiveram 5 cm de comprimento do sistema radicular. Em termos de número de raízes formadas em plantas de ipeca *in vitro*, conseguiu-se em média 15 raízes ao utilizar o meio MS com 50% da concentração normal suplementado com 4,92 µM de AIB, 0,87 µM de GA<sub>3</sub> e 0,1% de carvão ativado (Lameira, Costa e Pinto, 1994).

Tanto as auxinas como os nutrientes nitrogenados estimulam o enraizamento, embora a auxina pareça ser o fator mais limitante (Válio, 1986).

Uma toxidez de auxina durante a fase de enraizamento *in vitro*, pela alta concentração ou pelo longo período de exposição dos brotos ao meio indutor, poder-se-ia manifestar somente na fase de alongamento das raízes, onde as raízes não continuam seu crescimento (Grattapaglia e Machado, 1990).

Para melhorar o alongamento das raízes *in vitro*, após a iniciação radicular, alguns pesquisadores transferem os brotos de um meio com auxina para um meio sem reguladores de crescimento (Sivir e Erez, 1980; James e Thurbon, 1981; Lameira, Costa e Pinto, 1994).

Tanto as auxinas como os nutrientes nitrogenados estimulam o enraizamento, embora a auxina pareça ser o fator mais limitante (Válio, 1985).

### 2.1.3 Nutrição × produtos secundários

Fatores que estimulam o metabolismo primário ou o crescimento, podem estimular a biossíntese de alcalóides, como a disponibilidade de nitrogênio, outros nutrientes inorgânicos, temperatura e fonte de carbono metabolizável (Robinson, 1974). Por serem os alcalóides formados de esqueleto carbônico, Alonso (1983), relata que a luz influencia na fotossíntese e consequentemente na produção destes compostos.

Plantas *Papaver somniferum* quando tratadas com fertilizantes nitrogenados e fosfatados, Kharwara; Awasthi e Singh (1986) observaram aumentos de 24% no teor de morfina nas sementes, entretanto, o conteúdo de proteína diminuiu. Winter e Loustalot (1952) trabalhando com a planta *Chinchona ledgeriana* durante um ano de cultivo, identificaram quantidade superior

do alcalóide, nas diferentes dosagens de nitrogênio em relação as plantas controle. Nas raízes de *Atropa belladonna* ocorreu significantes aumentos no conteúdo dos alcalóides (atropina e hyoscyamina), quando nutridas com fósforo, mas pequeno crescimento foi observado nas raízes (James, 1950).

O metabolismo do nitrogênio, é uma característica muito importante porque é ele que entra em maior proporção na constituição dos meios, e a qualidade das fontes de nitrogênio influenciam fortemente o crescimento e a formação de metabolitos secundários.

O uso da forma combinada  $\text{NO}_3^- \cdot [\text{NH}_4]^+$ , resulta em uma grande viabilidade de nitrogênio para o metabolismo secundário, porque ocorre o uso direto do nitrogênio (transformação em glutamato) pelas raízes, quando absorvido com  $\text{NH}_4^+$ , enquanto que parte do nitrogênio na forma de  $\text{NO}_3^-$  é diretamente translocado para a parte superior do vegetal. Assim, o amônio quando absorvido é usado preferencialmente para a síntese de aminoácidos e proteínas (Schrader; Domska; Jung e Peterson, 1972).

Em *Datura stramonium* tratadas com  $\text{NO}_3^- \cdot [\text{NH}_4]^+$ , foi percebido por Demeyer e Dejaegere (1992) altos conteúdos de hyoscyamina quando foi alcançada elevada produção de biomassa.

Outros minerais segundo James (1950), influenciam na produção de alcalóides, porém é mais complexa, especialmente com potássio e cálcio, onde as mudanças nos ensaios são geralmente muito pequenas, não alcançando níveis de significância.

Nos experimentos com *Atropa belladonna*, James (1950), constatou que o uso de potássio fez diminuir o teor dos alcalóides (atropina e hyoscyamina), embora tenha ocorrido um

aumento no peso seco da raiz. Quando tratou as plantas com cálcio, houve aumento no conteúdo do alcalóide mas diminuiu o peso seco da raiz. Ele esclarece que o potássio estimula a síntese protéica, enquanto o cálcio a retarda. Desse jeito, estava havendo uma formação competitiva entre proteína e alcalóide durante o período de crescimento, com o cálcio favorecendo o direcionamento do nitrogênio para os alcalóides e o potássio para a síntese de proteínas.

Recentemente Mantanari Júnior, Figueira e Magalhães (1993), estudaram a influência da fertilização NPK na biomassa e no teor do alcalóide em *Atropa belladonna*, e obtiveram incrementos na biomassa sem alterar o teor de alcalóide. Lindsey e Yeoman (1983), comentam que condições de cultivo que promovem alta taxa de divisão, comumente não conduzem a altas taxas de metabólitos secundários. Entretanto, Yadav; Mohan; Singh e Gupta (1984) obtiveram 50% de rendimento de alcalóides e 55% de rendimento de matéria seca em plantas de *Hyoscyamus muticus*, quando supridas com aproximadamente 90 mg/l de nitrogênio.

Todos os tecidos vegetais contém quantidades variadas de nitrogênio solúvel, compostos nitrogenados simples, tais como amina, aminoácidos, e bases nitrogenadas simples. Estes podem originar-se através da síntese direta através da amônia e produtos de glicose, ou indiretamente pela via da formação e consecutiva decomposição das proteínas. Portanto estes compostos nitrogenados são frações precursoras da síntese dos alcalóides, como mostra o esquema (Figura 2).

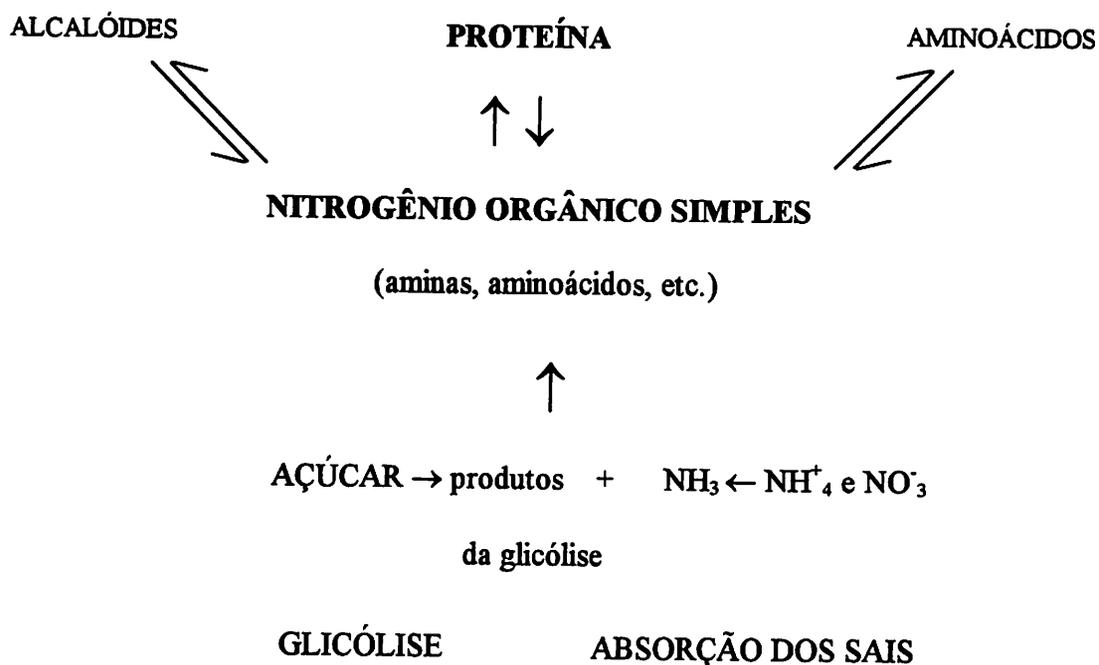


FIGURA 2. Representação esquemática dos compostos nitrogenados precursores da síntese dos alcalóides (James, 1950).

#### 2.1 4 Produtos secundários × alcalóides

Alcalóides são compostos secundários que contém em sua estrutura o elemento nitrogênio, cujos precursores são aminoácidos e geralmente são sintetizados em tecidos com crescimento ativo (Goodwin e Mercer, 1983). Estes compostos são classificados de acordo com os tipos de moléculas de aminoácidos, que se condensam, originando diferentes sistemas de cadeia heterocíclica presente em sua estrutura, como por exemplo os alcalóides isoquinolínicos derivados do aminoácido tirosina (Robinson, 1974). Estes isoquinolínicos, são contidos nas plantas de *Thalictrum rugosum* (alcalóide berberina) Gugler, Funk e Brodelius (1988); *Eschscholtzia*

*californica* (sanguinarina) Piatti, Boller e Brodelius (1991); *Papaver somniferum* (morfina) Williams e Allis (1993).

Estes compostos são sintetizados e acumulados em tecidos e células especiais (Wink, 1990), porém o sítio de armazenagem pode ocorrer no mesmo órgão onde foi sintetizado ou em outra parte da planta, precisando assim, de um transporte a longa distância. A nível celular, Wink (op.cit) relata que os alcalóides se acumulam nos vacúolos. Segundo Alonso (1983), a acumulação da nicotina ocorre nas folhas e entretanto ela é sintetizada nas raízes da planta de tabaco. Em *Lupinus* os alcalóides são sintetizados na parte aérea e translocados para o sistema radicular.

A variação da quantidade de compostos secundários acumulados, é resultado de um conjunto de interações complexas entre biossíntese, transporte e degradação. Balandrin e Klocke (1988), comentam que estes acontecimentos estão correlacionados com o processo de diferenciação e específico estágio de desenvolvimento dos órgãos da planta.

A seletiva indução desses processos de diferenciação e síntese, é governada por princípios de expressão diferencial dos genes (Luckner, citado por Stumpf e Corn, 1981). Hashimoto e Yamada (1994) complementam citando que, igualmente a muitos outros genes, a expressão dos genes que codificam as enzimas biossintetizantes de alcalóides, são reguladas espacialmente e temporariamente, assim bem como pelos estímulos internos e externos, tais como hormônios vegetais, luz e estresses. Assim, sementes de *Lupinus*, demonstram no começo da germinação, o conteúdo baixo dos alcalóides, mais depois aumentam exponencialmente até o final em que o crescimento diminui ligeiramente. Em geral, segundo Wiermann (1981) a forte biossíntese dos alcalóides ocorre no início do florescimento, e diminui ou pára durante esta fase.

Através da curva de crescimento de células em suspensão de *Thalictrum rugosum*, constataram que a produção do alcalóide foi verificada no final da fase de crescimento exponencial, e início da fase estacionária. Eles explicam que, a pouca síntese do produto secundário no início da fase exponencial, pode ser devido ao fato do aminoácido precursor a tirosina, não estar disponível nas células no início do crescimento, pois neste estágio ocorre alta síntese de proteína ou porque, os gens que codificam para a enzima responsável pela síntese do alcalóide, ainda não tenham sido ativados (Funk, Gugler e Brodelius, 1987). Outro motivo para reforçar a falta do aminoácido tirosina, é que segundo Lehninger; Nelson e Cox (1995), a maioria das proteínas vegetais possuem na sua constituição, resíduos de aminoácidos tirosina. Resultados semelhantes foram encontrados em cultura de suspensão de células de *Cephaelis ipecacuanha* (Jha et al., 1991).

Tais indicações confirmam a ligação do metabolismo secundário ao primário, através da dependência dos seus substratos (Barz e Koster, 1981). Células em suspensão de *Thalictrum rugosum*, quando foram elicitadas no início da fase estacionária, ocorreu alta produção do alcalóide paralela a alta produção de proteínas e atividade da enzima TDC (Gugler, Funk e Brodelius, 1988). Os autores confirmam que o aumento da atividade da TDC foi devido a sua síntese de novo, isto porque, não observaram esta atividade quando adicionaram a actinomicina D ou ciclohexamida nas culturas de suspensão celular.

Plantas jovens, utilizam grande parte dos seus aminoácidos para o metabolismo primário, na síntese proteica, enquanto que plantas maduras suprem melhor o metabolismo secundário (Demeyer e Dejaegere, 1992). Em plantas de tabaco, o conteúdo de proteína e nicotina têm suas produções paralelas durante o desenvolvimento da planta, alcançando o máximo no

início do florescimento, vindo a decairem durante esta fase e na formação das sementes (Deleano, citado por James, 1950).

No entanto, Yeoman et al. (1990), relatam a existência de uma relação inversa entre a síntese protéica e a síntese dos metabólitos secundários, baseado na utilização diferencial e antagonista dos metabólitos secundários. Segundo Phillips e Henshaw (1977), em trabalhos com a espécie *Sycamore* identificaram que quando a síntese protéica foi experimentalmente alcançada, a síntese do fenol foi reduzida.

O papel dos produtos secundários nos vegetais, não está relacionado com o seu crescimento, mas estão fisiológica e bioquimicamente relacionados às repostas da planta ao meio ambiente. Estas repostas podem está associadas ao processo de resistência a estresse ambiental, atração de agentes polinizadores, defensivos protetores, contra microorganismos, insetos ou herbívoros predadores, etc. (Miachir, 1992).

Embora os metabólitos secundários sejam derivados dos metabólitos primários, os quais são produzidos em grande quantidade e em todas as espécies, aqueles possuem distribuição limitada no reino vegetal, uma vez que, são geralmente dispendiosos metabolicamente para serem produzidos e acumulados, portanto estão presentes nas plantas em quantidades extremamente baixas (Balandrin e Clocke, 1988). A glucose necessária para produzir 1 g de um composto primário é geralmente menor do que para biossintetizar esta mesma quantidade de um composto secundário (Baas, citado por Begon e Fitter, 1992).

### 2.1.5 Emetina

O princípio ativo emetina faz parte do grupo dos isoquinolínicos dos alcalóides, os quais originam-se da condensação de moléculas do aminoácido tirosina (Claus e Tyler, 1968). Crocomo (1985) relatou que este aminoácido aromático, é sintetizado através do metabolismo do ácido chiquímico.

A enzima chave, que liga o metabolismo primário ao secundário, através da descarboxilação da tirosina, e dando início a síntese de emetina, assim como vários outros alcalóides, é a TDC, citada por vários pesquisadores (Gugler, Funk e Brodelius, 1988; Piatti, Boller e Brodelius, 1991).

A emetina tem como seus primeiros intermediários na via metabólica secundária, duas unidades de dopamina e uma molécula de secologamina (Kaplan e Gottlieb, 1990) (Figura 3) e a sua estrutura molecular é mostrada na Figura 4C.

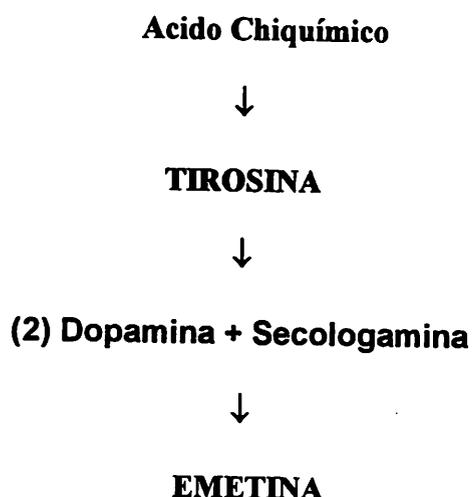


FIGURA 3. Representação resumida da via metabólica do alcalóide emetina. UFLA, Lavras - MG, 1995.

Este alcalóide, em nosso século, se transformou em droga principal para o tratamento da disenteria amebiana, embora tenha sido isolada no século XIX (Kaplan e Gottlieb, 1990). Segundo dados contidos no catálogo da Sigma (1995), 1 g de emetina custa US\$ 34.90.

Dos 2% do total de alcalóides contidos nas raízes da ipeca; 1,32% é referente ao conteúdo de emetina (Claus e Tyler, 1968). Em plantas adultas com 3-4 anos de cultivo na Índia, a produção deste alcalóide atingiu 1,28% (Chatterjee et al, citados por Jha, Sahu e Mahato (1988).

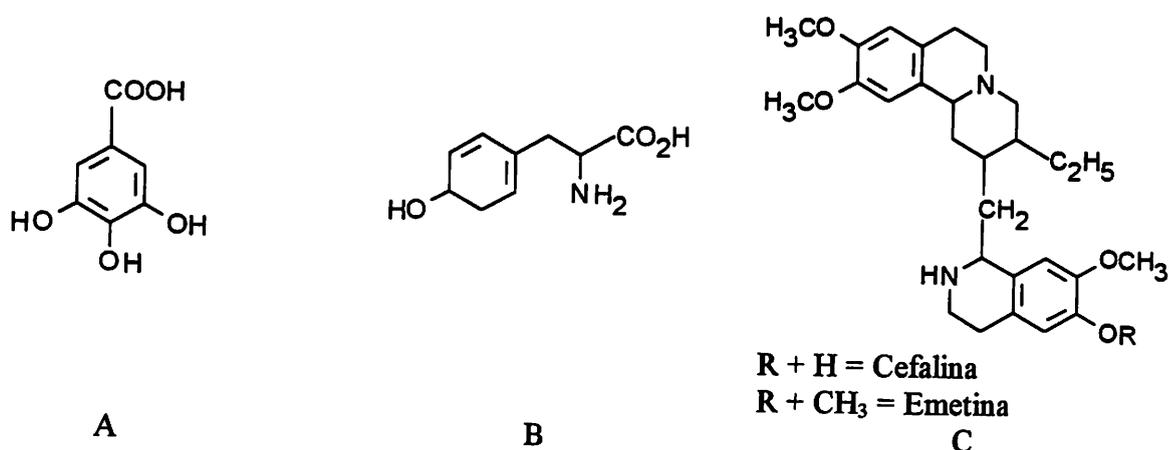


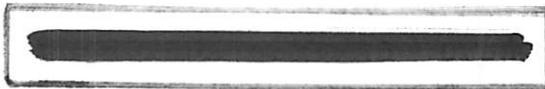
FIGURA 4. Estruturas químicas de (A) Ácido chiquímico, (B) Tirosina e (C) Emetina. UFLA, Lavras - MG, 1995.

O teor da emetina de 1,025% e 1,0621%, foram obtidos por Ikeda et al. (1988), em raízes primárias e secundárias nas plantas de ipeca respectivamente, obtidas através de mergulhia de estacas, e cultivadas por dois anos em casa de vegetação. O autor comenta ainda, que plantas originadas in vitro e cultivadas em casa de vegetação durante sete meses, apresentaram 0,251; 0,513 e 0,673% de teores de emetina nas raízes primárias respectivamente quantificados em

plantas com um, dois e sete meses. Enquanto que nas raízes secundárias com sete meses, observou-se 1,291% do teor do princípio ativo.

Plantas de ipeca provenientes de cultura de tecidos, e cultivadas em casa de vegetação, segundo relatos de Yoshimatsu e Shimomura (1991) apresentaram 0,82% de emetina nas suas raízes.

Trabalhando com cultura de raiz de ipeca, Jha et al (1991) verificaram 0,77% do conteúdo de emetina. Recentemente, Yoshimatsu, Kaio e Shimomura (1994) quando transferiram plantas de ipeca com um ano de idade cultivada em casa de vegetação para o campo, verificaram 1,8% do teor de emetina nas raízes após sete meses de cultivo. Yoshimatsu e Shimomura (1991) trabalhando com plantas de ipeca regeneradas *in vitro* e, mantidas em casa de vegetação por 17 meses de cultivo, obtiveram nas raízes secundárias 1,14% de emetina.



### 3 MATERIAL E MÉTODO

#### 3.1 Obtenção de plântulas *in vitro*

Brotos de *Cephaelis ipecacunha* provenientes de cultura de tecidos foram cedidos pelo Laboratório de Biotecnologia da EMBRAPA-CPATU como fonte inicial de inóculo para o desenvolvimento deste trabalho.

Com o objetivo de se obter material asséptico o suficiente para instalação do experimento, segmentos internodais foram subcultivados três vezes no meio basal de Murashige e Skoog (Murashige e Skoog, 1962) - MS, sólido (0,7% ágar) suplementado com 6,66  $\mu\text{M}$  de BAP.

Os brotos originados da terceira subcultura que atingiram após três meses 2,0 cm de altura mínima, foram individualizados e transferidos para o meio de indução de raiz com a metade das concentrações dos sais do meio básico MS, solidificado com ágar (0,7%) e suplementado com 4,92  $\mu\text{M}$  de AIB. Após um mês quando se observou o surgimento de raízes, os brotos foram transferidos para o mesmo meio com ausência de regulador de crescimento. Este material então, foi mantido durante quatro meses nestas condições até que o sistema radicular das plântulas chegassem a um tamanho mínimo de 3 cm de comprimento. As melhores plântulas com aspectos nutricionais e de sanidade, foram destinadas a fase de aclimação.

### **3.1.1 Aclimatação**

As plântulas inicialmente, foram submetidas a uma seleção para uniformizar as raízes, e posteriormente fez-se uma classificação quanto a altura das mesmas em pequena, média e grande. No momento do transplântio para a casa de vegetação, todo o material vegetal foi colocado em copos plásticos de 250 ml com substrato plantimax. Após, pegou-se um número igual de plântulas dentro de cada classificação e direcionou-se para cada tratamento nutricional, depois de duas semanas de aclimatação.

### **3.1.2 Tratamentos nutricionais realizados**

As plantas foram transferidas para sacos de polietileno de 1,0 L contendo como substrato, a mistura de terra e areia fina na proporção 1:1. As condições químicas do solo se encontram na Tabela 1.

Nos tratamentos nutricionais, utilizou-se como soluções nutritivas a formulação do meio MS, composto de quatro diferentes concentrações dos macros e micronutrientes: T1- Controle; T2- 25% (1/4 MS); T3- 50% (1/2 MS) e T4 - 100% (1/1 MS). O pH das soluções foi aferido para 5,5.

As aplicações das soluções nutritivas foram realizadas direto na superfície do substrato, e a quantidade fornecida foi de 20 ml por planta, no período semanal. A irrigação se manteve constante a cada dois dias.

**TABELA 1. Condições Físico-Químicas do solo utilizado na composição do substrato de cultivo de plantas de ipecacuanha. UFLA, Lavras - MG, 1995.**

<b>Condições Físico-Químicas</b>	<b>Características</b>
pH em Água	5.0 Áidez Média
P (ppm )	1 Baixo
K (ppm )	19 Baixo
Ca (meq/100cc)	0.5 Baixo
Mg (meq/100cc)	0,2 Baixo
Al (meq/100cc)	0,1 Baixo
H + Al (meq/100cc)	3.2 Médio
S soma das bases trocáveis (meq/100cc)	0.7 Baixo
t <sub>CTC</sub> efetiva (meq/100cc)	0.8 Baixo
T <sub>CTC</sub> a pH 7 (meq/100cc)	3,9 Baixo
m saturação de Al da TCT efetiva (%)	12 Baixo
V saturação de bases da CTC a pH 7 (%)	19 Muito Baixo

### 3.1.3 Características Avaliadas

Os parâmetros foram avaliados apartir do sexto mês, e se repetiram a cada três meses dentro de um ano de duração do experimento, ou seja, com nove e doze meses de idade.

#### a) Características Físicas:

- a.1) - massa de matéria fresca da parte aérea e raiz
- b.2) - massa de matéria seca da parte aérea e raiz
- c.3) - altura
- d.4) - comprimento da raiz
- e.5) - número de raízes primárias

Quanto a obtenção de matéria seca, o material vegetal foi submetido a uma secagem em estufa de circulação forçada a ar em 45-50°C por 48 horas.

## **b) Características Bioquímicas:**

O material vegetal seco das raízes foi moído em um moinho tipo Willi, com peneira de 20 MESH.

### **b.1) - Proteínas solúveis**

A quantificação de proteínas foi feita segundo o método de Bradford (1967). O reagente foi preparado diluindo 100 mg de Comassie blue G-250 em 50 ml de etanol a 95%. Feito isso, adicionou-se 100 ml de ácido fosfórico a 85% (v/v) e completou-se o volume para 1,0 litro com água destilada. O reagente foi então filtrado 3 vezes em papel de filtro WATMAN n° 40. A determinação do teor de proteína foi feita adicionando-se 0,4 ml do extrato em 5,0 ml do reagente seguido de agitação em vórtex. A curva utilizada foi feita com um padrão de soroalbumina-bovina (BSA) na faixa de 20 a 100 µg/0,1 ml. Utilizou-se como extrator uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 0,5N, na qual adicionou-se 15mg do material vegetal. O tempo de extração foi mantido durante 24 horas.

### **b.2) - Análise do alcalóide emetina**

A análise de emetina por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) foi realizada como mostra o procedimento a seguir:

- 100 mg de raiz foram submetidas a extração com 4 ml de água e 0,025 ml de NH<sub>4</sub>OH 2N com pH 9,0, sob agitação por 30 seg. Posteriormente 10 ml de éter etílico foi adicionado à solução que foi mantida sob agitação por 2 min. Esta mistura foi então centrifugada

por cinco minutos para separação das fases orgânicas e aquosa. A fase aquosa foi reextraída e as fases orgânicas resultantes das duas partições foram reunidas e evaporadas até a secura resultando no extrato final. Posteriormente este extrato foi solubilizado em 100  $\mu\text{L}$  da fase móvel dos quais 20  $\mu\text{L}$  foram injetados no cromatógrafo. A quantificação foi realizada utilizando o método de padrão externo, com curva de calibração.

#### **Condições de trabalho:**

- Fase móvel: Tampão acetato pH 5.0 - 0,25N : acetonitrila (80 : 20).
- Coluna : Lichrospher C-18, Merck - tamanho de partícula 5 $\mu\text{m}$  - 125 mm X 5 mm.
- Fluxo : 1,0 mL/min.
- $\lambda$  : 282 nm.

#### **3.1.4 Delineamento Experimental e Análise Estatística**

O delineamento experimental utilizado foi o Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), em esquema fatorial ( $4 \times 3$ ) com parcelas subdivididas, constituído de quatro concentrações das soluções nutritivas (0; 25; 50 e 100%) e três épocas de cultivo (6; 9 e 12 meses). O experimento teve 12 plantas como repetição.

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Acumulação de biomassa na parte aérea e no sistema radicular**

A interação entre solução nutritiva e época de cultivo atingiu a significância ao nível de 1% para ambas variáveis. Aos seis meses não houve diferenças entre as soluções (Figuras 5 e 6). Mas após este período houve um incremento na matéria seca da parte aérea bastante acentuado com a utilização das soluções nutritivas, chegando por volta de 2.8 a mais em relação ao tratamento sem a aplicação da solução nutritiva após 12 meses de cultivo.

Aos nove meses de cultivo, foi a época que incorporou os fotossintatos na matéria seca em maior proporção, tanto na parte aérea quanto no sistema radicular, quando da utilização de 50% da solução de sais do MS (Figura 5 e 6). Assim este tratamento neste período, pode ser considerado como o suprimento ótimo para o desenvolvimento das plantas, uma vez que, dosagens mais elevadas promovem um estado de luxúria nutricional, fazendo com que as plantas absorvem os nutrientes mas não os revertam em biomassa, sendo que esta reversão em biomassa pode ser revertida em estágios de crescimento posteriores (Chapin, 1980).

As plantas aos nove meses sem nutrição e com 100% da solução nutritiva, tiveram efeitos semelhantes e superiores ao tratamento com 25%, o qual produziu menor quantidade de matéria seca nas raízes (Figura 6). Em relação a parte aérea (Figura 5), obteve menor acumulação

de biomassa no tratamento controle, isto porque o sistema radicular é um forte drenó, e plantas mantidas sob deficiência nutricional, direcionam seus fotossintatos para as raízes (Salisbury e

Ross, 1992).

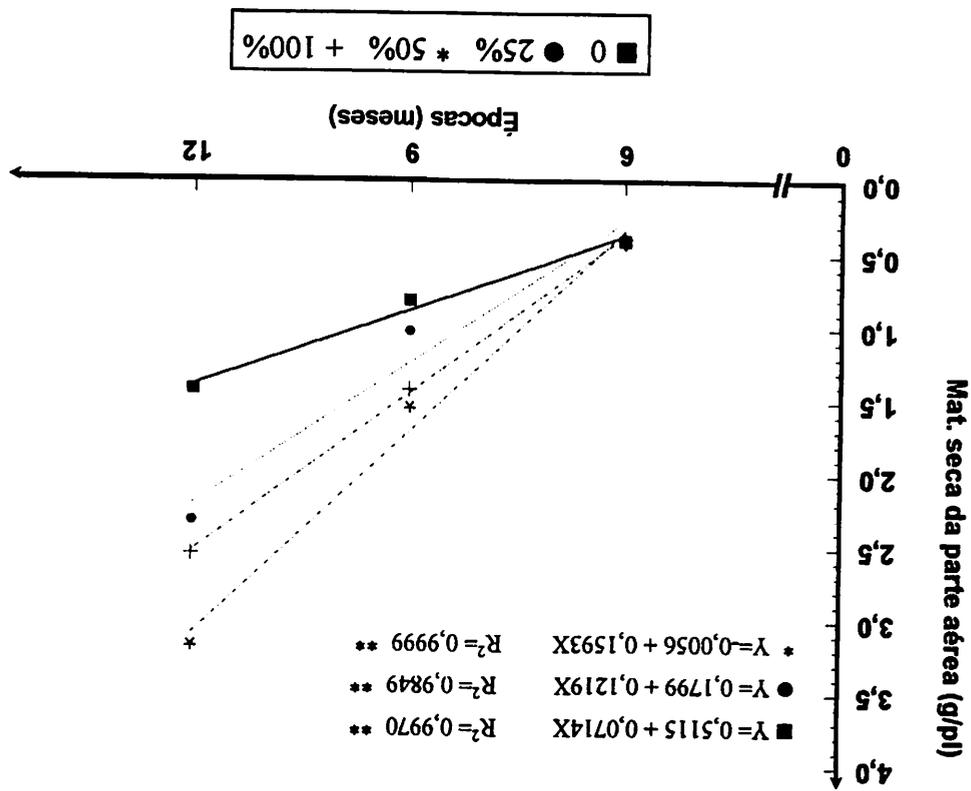


FIGURA 5. Representação gráfica da influência da nutrição das solções nutritivas na acumulação de biomassa na parte aérea das plantas de ipêcaçuana durante as épocas de cultivo. UFLA, Lavras - MG, 1995.

Aos doze meses de cultivo, o crescimento da parte aérea da planta em relação as solções nutritivas, continuaram aumentando o seu peso (Figura 5). O sistema radicular manteve a mesma resposta para o tratamento com 50% dos sais, e assim, continuou sendo o que induziu

maior biomassa (Figura 6). As soluções nutritivas com 25% e 100% dos sais, promoveram maiores acumulações de biomassa no sistema radicular e foram semelhantes entre si, quando comparados ao tratamento sem solução nutritiva.

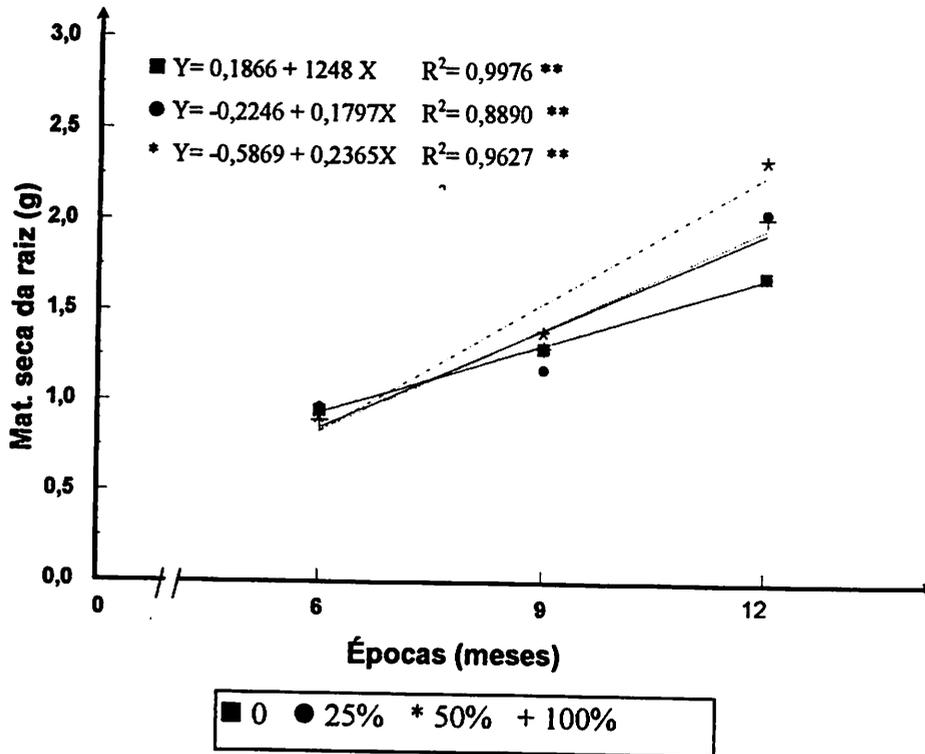


FIGURA 6. Representação gráfica da influência das soluções nutritivas na acumulação de biomassa nas raízes das plantas de ipecacuanha durante as épocas de cultivo. UFLA, Lavras - MG, 1995.

O rendimento de emetina, está intimamente relacionado com a produção de biomassa. Os dados contidos na Tabela 2, demonstram que as soluções nutritivas após 12 meses de cultivo, promoveram maiores teores de emetina por biomassa seca de raiz produzida, quando comparadas as plantas sem solução nutritiva. O tratamento irrigado com 50% de sais do MS induziu um maior sistema radicular com aproximadamente 5g de peso seco, o que conseqüentemente proporcionou maior rendimento de emetina, 241,45% a mais do que o

tratamento sem solução nutritiva. Um maior incremento no sistema radicular está de acordo com os encontrados por Mackay e Barber (1986) em raízes de milho, eles citam que no início do crescimento as raízes são menos exigentes ao nível de nitrogênio no solo e a resposta do crescimento da raízes ao nitrogênio suprido está na dependência do estágio de crescimento.

TABELA 2. Rendimento de emetina (mg) por produção de biomassa seca das raízes de ipecacuanha, influenciadas pelas concentrações das soluções nutritivas e época de cultivo. UFLA, Lavras - MG, 1995.

Concentração da Solução Nutritiva	Épocas (meses)			
	6	9	12	% Relativa
0	1,15	20,53	45,71	100,00
25 %	5,13	14,82	77,98	170,59
50%	3,49	27,69	110,37	241,45
100%	2,98	16,86	82,60	180,70

#### 4.2 Particionamento da materia seca

As soluções mais concentradas (50% e 100%), durante o sexto mês direcionaram seus fotossintatos em maior proporção para a parte aérea, enquanto que a concentração de 25% acumulou mais no sistema radicular, o tratamento controle manteve o equilíbrio, acumulando quantidades iguais de biomassa nas duas regiões da planta (Tabela 3).

Estes resultados demonstram que as plantas de ipeca provenientes de cultura in vitro e cultivadas durante seis meses em cada de vegetação, não são muito exigentes nutricionalmente, bastando assim cultivá-las com uma solução nutritiva em baixa concentração dos

macro e micronutrientes, para que o objetivo de maior proporção de biomassa seja acumulado nas raízes.

TABELA 3. Particionamento da biomassa seca (g) na parte aérea e no sistema radicular das plantas de ipecacuanha, submetidas a diferentes concentrações das soluções nutritivas durante três épocas de cultivo. UFLA, MG- Lavras, 1995.

Concentração da Solução Nutritiva	Épocas (meses)								
	6			9			12		
	Parte Aérea	Sist. Radic.	P.Aérea / Raiz	Parte Aérea	Sist. Radic.	P.Aérea / Raiz	Parte Aérea	Sist. Radic.	P.Aérea / Raiz
0	0,39	0,39	1,00	0,80	1,16	0,68	1,39	2,38	0,58
25 %	0,37	0,42	0,88	1,00	0,87	1,14	2,28	3,67	0,62
50%	0,40	0,33	1,21	1,52	1,40	1,08	3,14	4,94	0,63
100%	0,38	0,29	1,31	1,40	1,16	1,20	2,50	3,55	0,70

Maizlich, Fritton e Kendal (1980) trabalhando com plântulas de milho submetidas a 105 e 210 mg/l de nitrogênio, verificaram as respectivas relações de parte aérea/raiz, 1,25 e 2,89; enquanto as plantas controle alcançaram a relação de 0,63. Semelhantes resultados foram encontrados neste trabalho com a ipecacuanha, as soluções mais ricas foram as que alcançaram maiores valores das relações, enquanto que a solução menos concentrada e o controle, alcançaram valores inferiores das relações parte/raiz. Segundo Aung (1974), a parte aérea e o sistema radicular estão em constante competição pelas substâncias assimiladas ou sintetizadas. Assim, relação parte aérea/raiz serve como base para identificar os fatores ambientais e químicos que influenciam no crescimento e desenvolvimento das plantas.

No período de nove meses de cultivo, todas as soluções nutritivas acumularam maior proporção de biomassa na parte aérea, embora perceba-se na Tabela 3 que todos os valores das relações parte aérea/raiz diminuíram, com exceção da solução com 25% de concentração. Esta queda nos valores da relação mostram claramente que neste período, a exigência nutricional das

plantas aumentou. O tratamento com 50% foi o que direcionou maior produção de matéria seca para o sistema radicular (1,40 g), e também manteve o equilíbrio do direcionamento da biomassa entre o sistema radicular e a parte aérea (1,52 g).

Este último resultado está de acordo com os relatos de Person (1979), espécies perenes direcionam aproximadamente 50% dos seus fotossintatos para o crescimento das raízes. Heiltholt (1989), cita que a deficiência de nitrogênio reduz o crescimento das raízes e da parte aérea, entretanto a acumulação de matéria seca da raiz pode ser menos afetada. Salisbury e Ross (1992), declaram que plantas nutricionalmente deficientes em nitrogênio, chegam a acumular nas raízes 90% da biomassa total.

Na época dos doze meses o tratamento com 50% foi o que direcionou maior produção de matéria seca para o sistema radicular (4,94 g). Todos os tratamentos direcionaram a acumulação da biomassa para o sistema radicular (Tabela 3), induzindo as relações parte aérea/raiz diminuírem significativamente. O excesso nutricional, principalmente de nitrogênio, provocam nas folhas das plantas a coloração verde escuro e mostram abundante folhagem, geralmente com alta proporção parte aérea/raiz, e apresentam retardamento na fase de floração (Salisbury e Ross, 1992); o que não aconteceu com as plantas de ipeca submetidas a soluções mais concentradas, pois a maioria das plantas floresceram com 1 ano de cultivo (Figura 7).

Assim, o efeito do nitrogênio no crescimento da raiz pode ser negativo ou positivo, dependendo se a concentração é ótima fornecendo assim, o requerimento nutricional que uma determinada espécie necessita para ter o seu crescimento estimulado (Malzlish, Fritton e Kendall, 1980). Se taxas excessivas são supridas, o crescimento da raiz é reduzido (Comfort, Malzer e Busch, 1988).

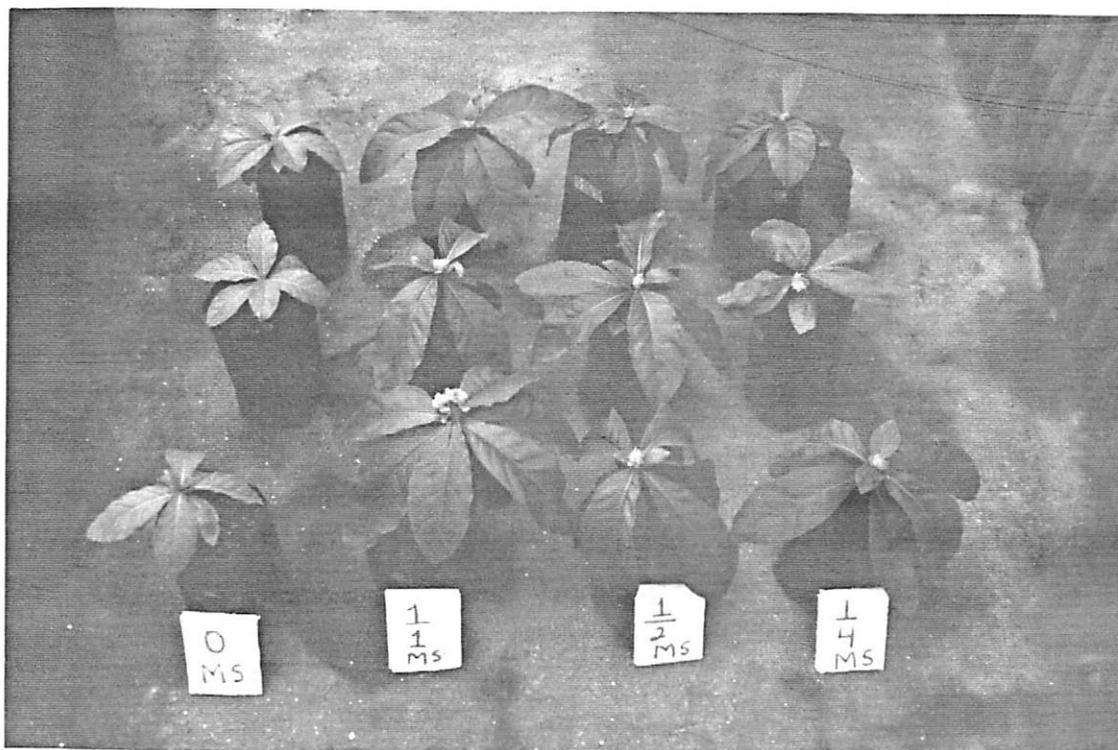


FIGURA 7. Fotografia ilustrativa das plantas de ipecacuanha durante a época de doze meses de cultivo e submetidas as diferentes concentrações das soluções nutritivas. Representações das concentrações das soluções nutritivas: 0 MS= controle; 1/1 MS= 100%; 1/2 MS= 50%; 1/4 MS= 25%. Lavras - MG, 1995.

Percebe-se que uma dosagem de nitrogênio considerada ótima para uma espécie vegetal, pode não ser para outra. Deste modo, plantas de ipeca durante a fase inicial de desenvolvimento (seis primeiros meses de cultivo), exigiram concentração de nitrogênio da ordem de 205 mg/l (solução nutritiva com 25% da concentração dos sais), e durante a fase de floração (doze meses de cultivo) aumentaram sua exigência nutricional de nitrogênio para 410 mg/l (solução nutritiva com 50% da concentração dos sais) para assim alcançarem maior acúmulo de biomassa no sistema radicular. Enquanto que plantas de pimenta também na fase inicial de

desenvolvimento exigiram 84 mg/l de nitrogênio, e durante a floração requereram dosagem de 112 mg/l de nitrogênio para aumentar a biomassa tanto da parte aérea como da raiz (Leskovar, Cantliffe e Stoffella, 1989). Por outro lado, plantas de *Hyoscyamus muticus* exigiram 90 mg/l de nitrogênio para terem sua biomassa radicular aumentada (Yadav et al., 1984).

As plântulas de ipeca mostraram um aumento da biomassa seca em todos os tratamentos, embora o controle tenha obtido valores menores, o que se explica pelo fato de que sem nitrogênio não há produção de proteínas, conseqüentemente as plantas deficientes se desenvolvem menos (Malavolta, 1980). possivelmente, a presença do nitrogênio em diferentes concentrações nas soluções nutritivas estimulou o maior ganho de biomassa.

#### 4.3 Comprimento do sistema radicular

Para este parâmetro, não houve diferenças significativas entre as soluções e nem para a interação entre solução nutritiva e época de cultivo. Somente alcançou significância no fator época de cultivo.

Observa-se na (Figura 8), o aumento linear ocorrido no comprimento das raízes durante os doze meses de cultivo.

O comprimento do sistema radicular das plantas de ipeca neste trabalho, atingiu em média 13,70; 17,04 e 18,42 cm de comprimento aos seis, nove e doze meses respectivamente. Ikeda et al. (1988) também trabalhando com plântulas de ipeca provenientes de cultura de tecidos, obtiveram um sistema radicular de 5 cm após sete meses de cultivo em casa de vegetação.

Posteriormente Yoshimatsu e Shimomura (1991) trabalhando com a mesma planta, após doze meses de cultivo em casa de vegetação, obtiveram este mesmo comprimento de 5 cm do sistema radicular. Ambos os pesquisadores não forneceram nutrientes para as plantas, além dos que se encontravam no substrato de plantio.

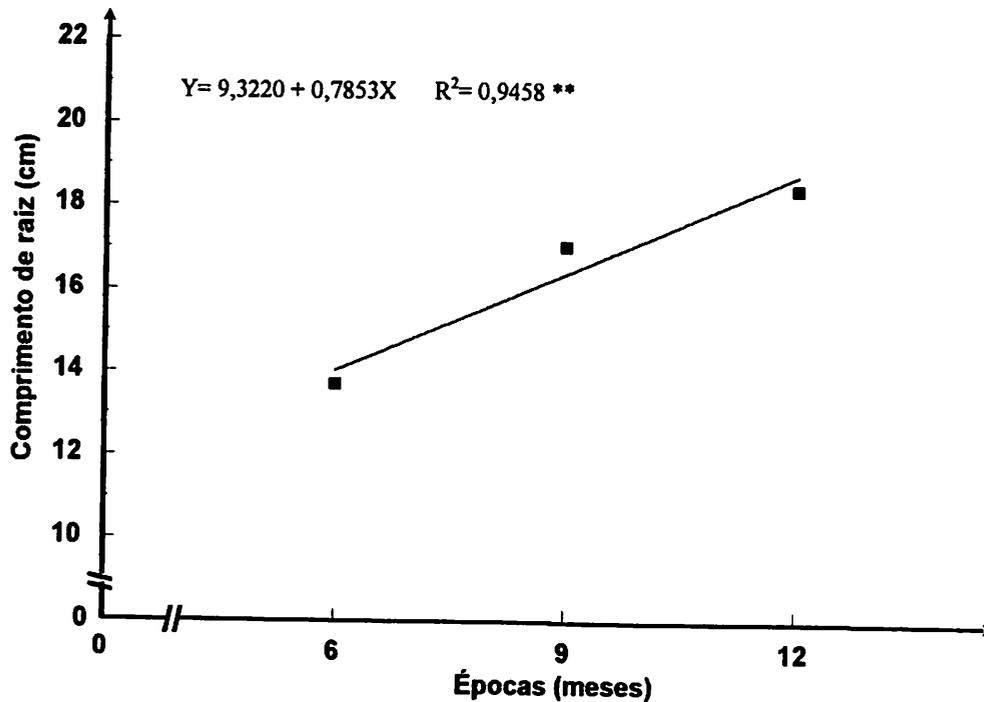


FIGURA 8. Representação gráfica do comprimento do sistema radicular ao longo do período de 12 meses de cultivo. UFLA, Lavras - MG, 1995.

O comprimento médio (18,42 cm), obtido neste trabalho representa 76,75% do comprimento do sistema radicular de plantas de três a quatro anos, desenvolvidas em matas florestais (Penna, 1946).

#### 4.4 Número de raízes primárias

Esta variável não alcançou significância entre as épocas de cultivo e nem para a interação entre solução nutritiva e época de cultivo. O fator solução nutritiva é que obteve diferenças significativas.

Estes resultados são contrários aqueles encontrados por Aung (1982), onde observou que os nutrientes minerais promoveram a emergência das raízes primárias em plantas de tomate, e em plantas de pimenta Leskovar, Cantliffe e Stoffella (1989), verificaram que a adubação nitrogenada promoveu o aumento do número destas raízes.

Observando-se os valores contidos na Tabela 4, constata-se que as soluções nutritivas de 50% e 100% proporcionaram maior número de raízes primárias.

TABELA 4. Valores médios do número de raízes de ipecacuanha induzidos por diferentes concentrações da solução nutritiva. UFLA, Lavras - MG, 1995.

Concentrações das Soluções Nutritivas	Número de raízes
0	6,78
25%	6,43
50%	7,47
100%	7,61

Conforme observações feitas no sistema radicular (Figura 9), os tratamentos com soluções nutritivas apresentaram raízes mais grossas, quando comparadas com o sistema radicular de plantas sem aplicação de soluções nutritivas.

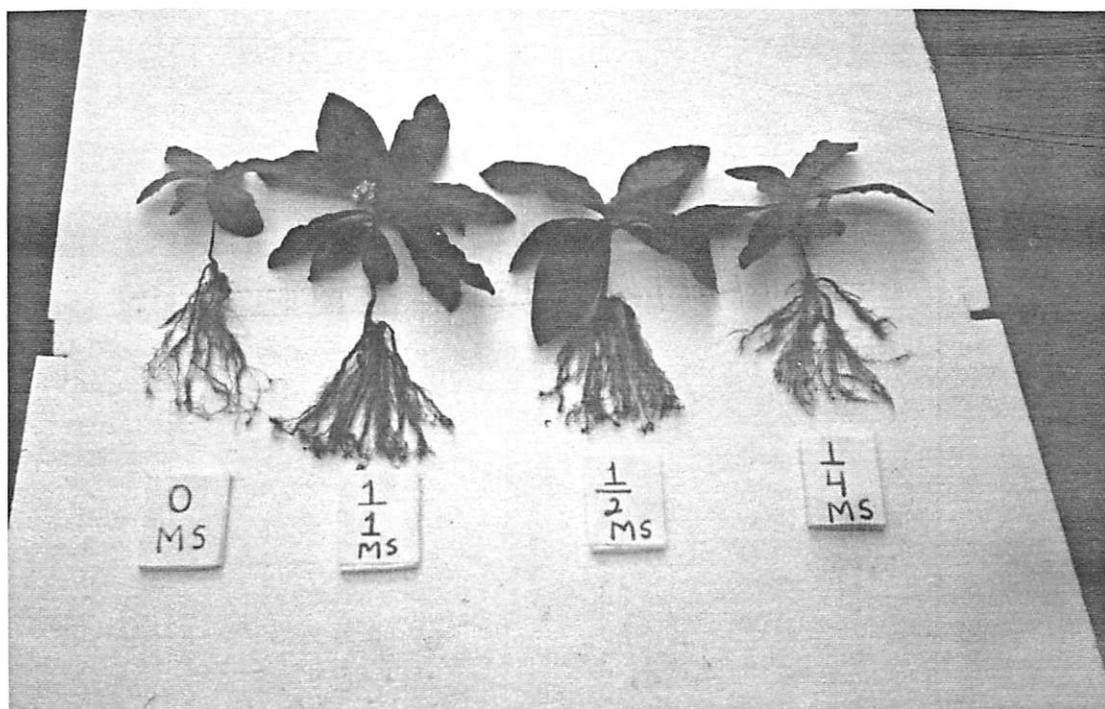


FIGURA 9. Fotografia ilustrativa dos sistemas radiculares de plantas de ipêacuanha com doze meses de cultivo, submetidas as diferentes concentrações das soluções nutritivas. Representações das concentrações das soluções nutritivas: 0 MS = controle; 1/1 MS = 100%; 1/2 MS = 50%; 1/4 MS = 25%. UFLA, Lavras -MG, 1995.

#### 4.5 Biossíntese de emetina

A produção de emetina durante o desenvolvimento e crescimento da plântula, em relação a irrigação com as soluções nutritivas, foi estatisticamente significativa ao nível de 5%. Durante o período de cultivo de 6,9 e 12 meses (Figura 10), as soluções nutritivas induziram a síntese de emetina linearmente; enquanto as plântulas sem irrigação com as soluções nutritivas tiveram uma produção crescente até aos 9 meses, começando a partir desta data mostrar uma queda nos níveis de emetina (Figura 10).

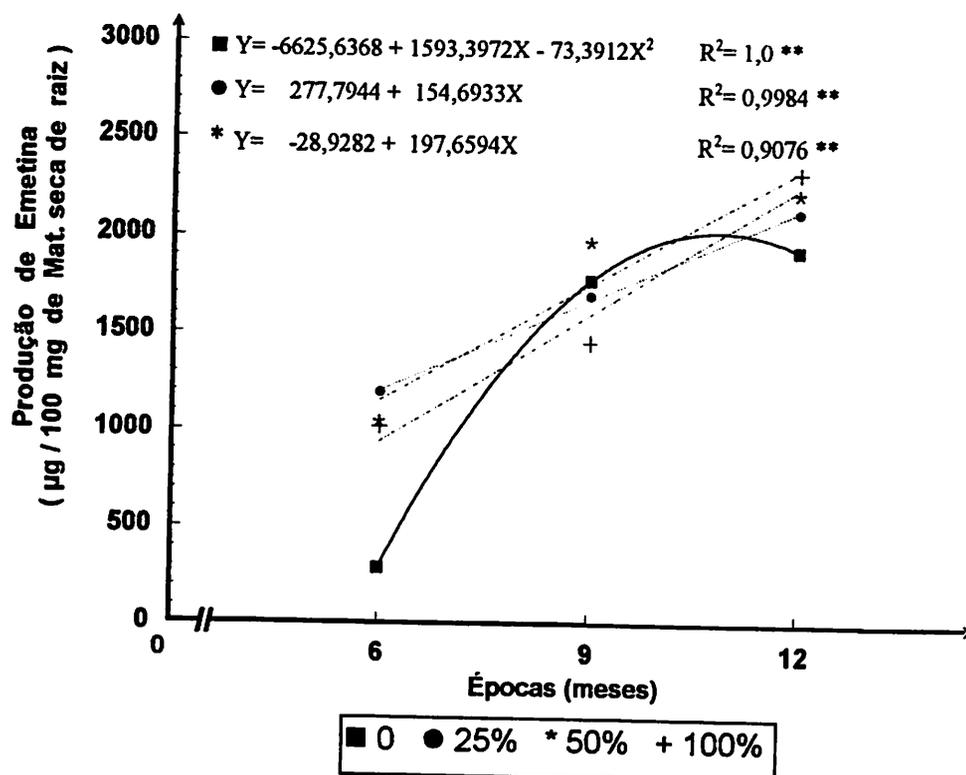


FIGURA 10. Representação gráfica do efeito da interação solução nutritiva e época na indução da biossíntese do alcalóide emetina. UFLA, Lavras - MG, 1995.

Durante o sexto mês de cultivo (Figura 10), as plântulas que receberam as soluções nutritivas apresentaram um comportamento semelhante em relação ao conteúdo de emetina e diferentes do tratamento sem solução nutritiva. As plântulas irrigadas com 25% dos sais do MS apresentaram uma tendência maior no conteúdo de emetina (1195,12 µg/100 mg de matéria seca da raiz) e a concentração total de sais mostrou ser inferior (1016,58 µg/100 mg de mat. seca da raiz). No período de nove meses de cultivo, a solução de 50% foi a que apresentou maior teor de emetina, enquanto que o menor teor foi observado a 100%, o tratamento sem solução nutritiva demonstrou valores de produção superior a 25% e 100% da concentração. Isto talvez seja devido

a algum estresse relativo a nutrição. Na época de doze meses de cultivo, foi verificado que a solução de 100%, apresentou um maior teor de emetina.

Estes resultados confirmam relatos de que, a síntese dos produtos secundários está em função de um determinado estágio de crescimento do vegetal (Balandrin e Klocke, 1988). Com isto pode-se dizer que o funcionamento da rota metabólica de um determinado composto, está sob o controle gênico temporal (Luckner, citado por Stumpf e Conn, 1981). De acordo com Hashimoto e Yamada (1994), fatores que aceleram o desenvolvimento da planta podem ativar estes genes responsáveis pela síntese dos secundários, em maior ou menor proporção.

No decorrer dos 6, 9 e 12 meses de cultivo, houve um crescente aumento na exigência nutricional pelas plântula, e as soluções mais ricas nas concentrações dos nutrientes 25, 50 e 100% respectivamente, ajudaram a promover maiores teores de emetina (1195,12; 1968,49 e 2325,07  $\mu\text{g}/100\text{ mg}$  matéria seca da raiz). Segundo Marschner (1990), alguns destes nutrientes como o nitrogênio e o fósforo, fazem parte direta das moléculas de nucleotídeos, que por sua vez originarão os aminoácidos necessários a produção deste alcalóide. Winter e Loustalot (1952) obtiveram maiores teores do alcalóide sintetizado por *Chincona ledgeriana*, com um ano de idade quando as tratou com nitrogênio. Do mesmo jeito, Kharwara e Awasthi (1986) alcançaram aumentos significativos de alcalóides, ao tratar com fósforo, plantas *Papaver somniferum*. Entretanto, quando ocorre um suprimento acima ou abaixo do ótimo, principalmente no início do crescimento, a tendência do teor do alcalóide é diminuir, isto porque, segundo Demeyer e Dejaegere (1992) as plantas jovens utilizam os seus aminoácidos mais no metabolismo primário, enquanto que plantas adultas o suprem melhor no metabolismo secundário.

As plantas de ipeca tratadas com soluções nutritivas, iniciaram sua fase de floração aos doze meses, quando observou-se a maior produção do alcalóide (2325,07  $\mu\text{g}/100\text{ mg}$  matéria

seca da raiz). Wiermann (1981) cita que a forte biossíntese dos alcalóides ocorre no início do florescimento, e diminui ou pára durante esta fase. Jha et al. (1991) conseguiram alto teor de emetina em cultura de suspensão de células de ipeca, durante o final da fase exponencial e início da fase estacionária, mostrando que uma maior atividade da enzima chave, a TDC, poderia estar atuante. Esta hipótese já havia sido relatada por Gugler, Funk e Brodelius (1988) que trabalhando com a enzima TDC em cultura de suspensão celular de *Thalictrum rugosum*, verificaram elevadas atividades da enzima, paralela a maior produção do alcalóide berberina.

Estes relatos explicam o porque do teor de emetina das plantas controle terem aumentado grandemente aos nove meses, ou seja, o gene da TDC possivelmente foi ativado pelo início do estresse nutricional, o qual provocou precocemente o fim da fase exponencial e início da fase estacionária naquelas plantas. Aos doze meses as plantas mostraram-se amareladas e com o desenvolvimento bastante reduzido, provocando assim, maior degradação de proteínas e consequente liberação dos substratos da enzima, os aminoácidos.

Os dados contidos na Tabela 5, demonstram que plantas com um ano de cultivo em casa de vegetação apresentam teores de emetina superiores as plantas de ipeca com três a quatro anos de idade cultivadas na Índia, as quais apresentaram 1,28% do peso seco das raízes (Chatterjee et al, citado por Jha, Sahu e Mahato, 1988). Plantas de ipecacuanha originadas por mergulhia, e cultivadas por dois anos em casa de vegetação sem tratamento nutricional, apresentaram em suas raízes 1,06% de emetina (Ikeda et al., 1988). Estes autores comentam ainda, que plantas originadas de cultura de tecidos e cultivadas por um ano em casa de vegetação no Japão, apresentaram 1,29% de emetina. Em cultura de raiz de ipeca Jha et al. (1991) obtiveram 0,77% do teor alcalóide, enquanto Yoshimatsu, Aio e Shimomura (1994) obtiveram 1,8% de emetina em plantas com um ano cultivadas em casa de vegetação e que posteriormente foram

transplantadas para o campo, permanecendo ali por sete meses. Ainda Yoshimatsu e Shimomura (1994), trabalhando com regeneração de plantas de ipeca através de segmentos de raízes e por segmentos apicais, alcançaram respectivamente 0,90% e 1,14% de emetina nas raízes secundárias, em plantas com 17 meses de cultivo em casa de vegetação. No Brasil, as plantas nativas com três a quatro anos de idade, contém 1,32% de emetina (Claus e Tyler, 1968).

TABELA 5. Valores médios dos teores de emetina contidos em mat.seca das raízes de ipecacuanha em %, provenientes da cultura *in vitro*, e tratadas com diferentes concentrações da solução nutritiva da formulação do meio MS, em diferentes épocas de cultivo. UFLA, Lavras - MG, 1995.

Concentração da Solução Nutritiva (%)	Épocas (meses)			% Relativa
	6	9	12	
0	0,292	1,770	1,92	100
25	1,195	1,691	2,123	110,57
50	1,047	1,968	2,233	116,30
100	1,016	1,449	2,325	121,09

#### 4.6 Produção de proteínas Solúveis totais

A interação solução nutritiva e época na produção de proteínas, atingiu significância ao nível de 1%.

Constata-se que durante aos seis meses de cultivo (Figura 11), o tratamento com 100% dos sais do MS promoveu maior síntese protéica. Aos nove meses, já se observa claramente a influência das soluções, de acordo com a exigência nutricional do seu estágio de crescimento. As plantas que não receberam solução nutritiva apresentaram quantidades de proteína inferiores as

plantas submetidas aos regimes nutricionais, além de que, percebe-se o início da queda de síntese protéica, demonstrando o estresse nutricional naquelas plantas.

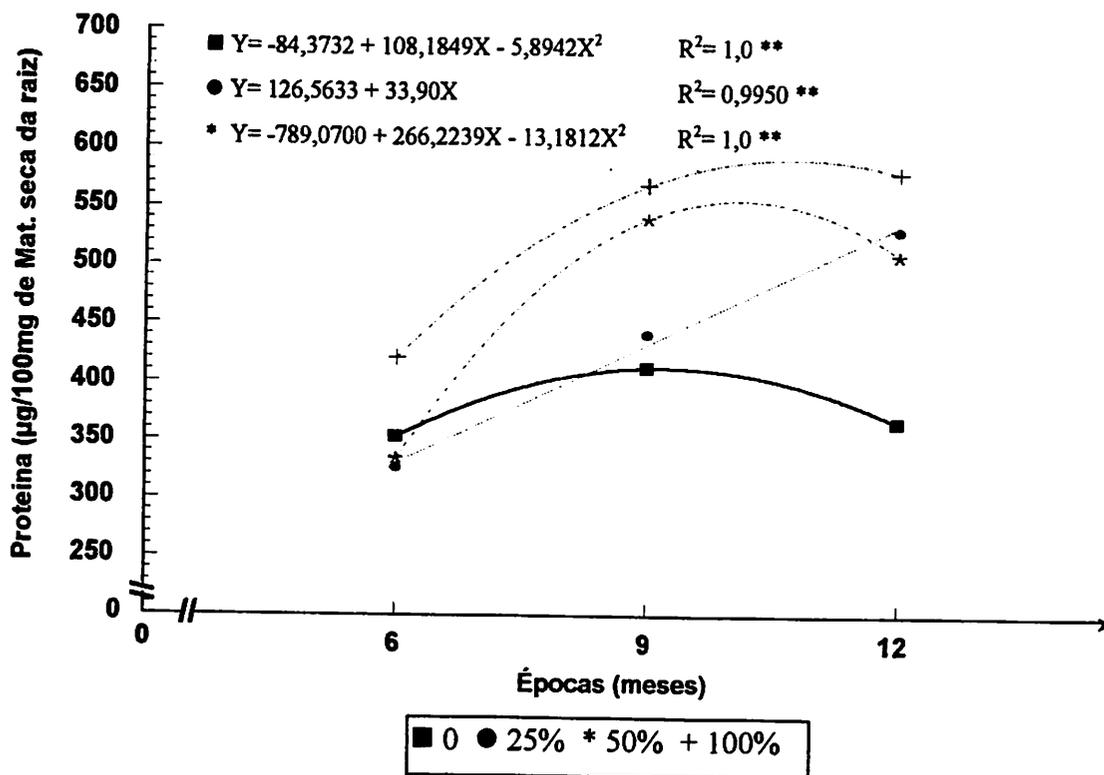


FIGURA 11. Representação gráfica dos efeitos das diferentes concentrações das soluções nutritivas sob a produção de proteínas nas raízes de ipecacuanha. UFLA, Lavras - MG, 1995.

Segundo Boulter (1970) o primeiro passo para que ocorra a síntese protéica é a ativação dos aminoácidos na presença de ATP, entretanto para que ocorra a síntese de aminoácidos, há necessidade da produção de ATP e da presença do nitrogênio na forma de  $\text{NO}_3^-$  na rizosfera, para que seja absorvido, e reduzido pelas enzimas. Com a presença deste elemento no meio, a atividade e produção da enzima nitrato redutase é promovida (Sommer et al., 1983). No entanto, quando

existe poucos nutrientes disponíveis na rizosfera, a planta gasta grande parte do seu ATP na tentativa de absorver os nutrientes (Lambers e Poorter, 1992).

Assim, nestas etapas anteriores citadas acima, a falta dos nutrientes dificulta a disponibilidade de ATP para a síntese protéica, e estar conseqüentemente afetando a síntese de aminoácidos, uma vez, que o elemento fósforo e nitrogênio fazem parte dos nucleotídeos, o magnésio tem a função de agregar as duas subunidades dos ribossomos enquanto que o potássio une os RNA<sup>t</sup> aos ribossomos durante o processo de tradução (Maerchner, 1990).

Entre as soluções nutritivas, 25% da concentração de sais do MS apresentou menor concentração protéica. As plântulas que receberam 50% e 100% de sais do meio básico do MS mostraram uma maior concentração de proteína, mas após 9 meses há uma tendência de queda nos níveis protéicos como é mostrado na Figura 11. Após 12 meses, pode-se dizer que para cada estágio de crescimento as plantas tiveram uma exigência nutricional. Assim, aos seis meses as plantas na fase inicial de crescimento requereram como suprimento ótimo a solução com 25% de concentração nutritiva, aos nove meses aumentou para 50% e aos doze meses, o melhor tratamento que supriu as necessidades das plantas foi de 100% dos sais do MS.

#### **4.6.1 Produção de proteína × emetina**

Observa-se a existência da grande ligação do metabolismo secundário ao primário (Figuras 12, 13 e 14). Durante o sexto mês de cultivo (Figura 12), a menor quantidade de emetina produzida foi no tratamento sem aplicação da solução nutritiva, justamente onde as plantas provavelmente, por terem a sua disposição poucos nutrientes para síntese de aminoácidos, estes então, foram direcionados para a síntese protéica e manutenção do seu desenvolvimento. Esta

ocorrência, é devido a existência de uma forte competição entre as proteínas e os alcalóides pelos aminoácidos produzidos (James, 1950). Além do mais, a maioria das proteínas vegetais contém resíduos do aminoácido tirosina (Lenhinger; Nelson e Cox, 1995), favorecendo baixo teor do alcalóide. Quanto a maior produção de emetina vista na aplicação de 25% dos sais do MS, houve uma leve tendência de menor teor proteico, refletindo que a plântula, direcionou parte dos seus aminoácidos para o metabolismo secundário, embora mantendo um certo equilíbrio entre os dois metabolismos, primário e secundário.

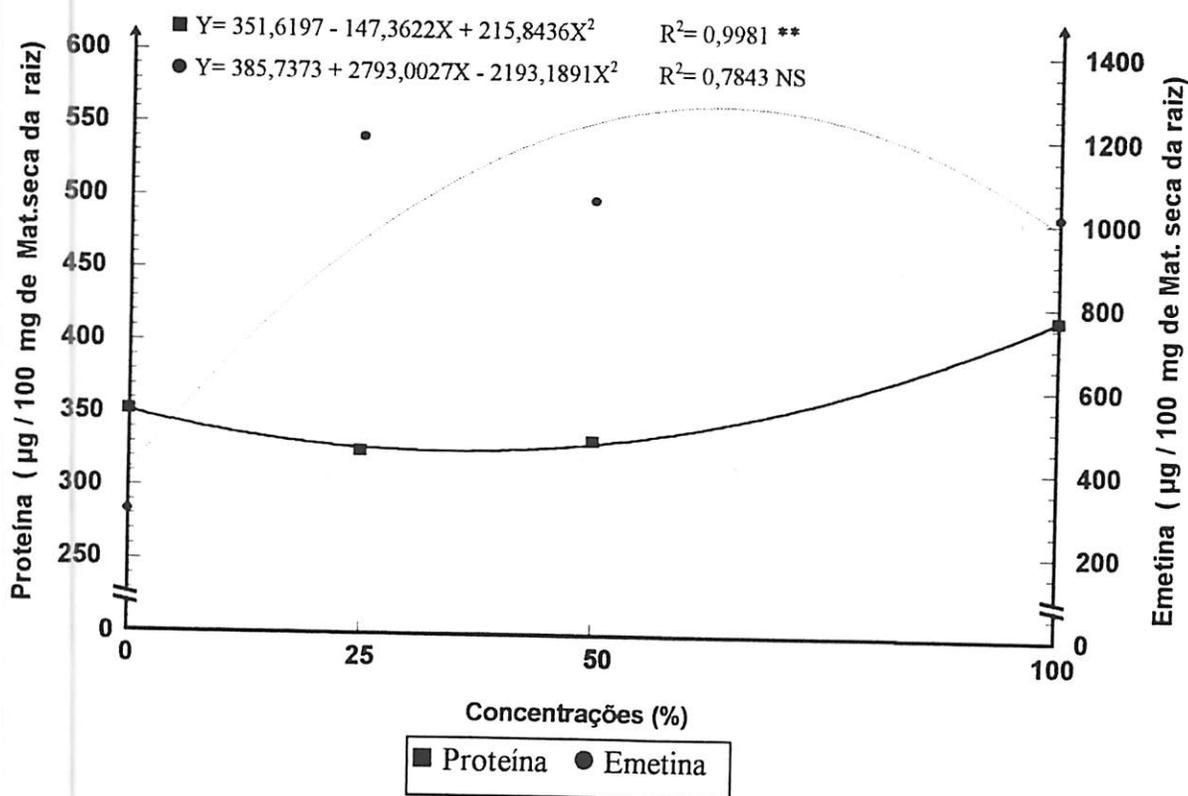


FIGURA 12. Representação gráfica da influência das concentrações nutritivas sob a produção de proteína e emetina em raízes de ipecacuanha com seis meses. UFLA, Lavras - MG, 1995.

Constata-se através das curvas quadráticas na Figura 12, que quando a proteína passa por uma máxima produção a biossíntese de emetina começa a cair, concordando assim com a citação de Yeoman et al. (1990), que existe uma relação inversa entre a síntese protéica e a síntese de metabólitos secundários baseada na utilização diferencial e antagonista dos aminoácidos. Phillips e Henshaw (1977), em trabalhos com a cultura de *Sycamore* observaram que, quando a síntese proteica foi expandida, a biossíntese dos seus fenóis foi reduzida.

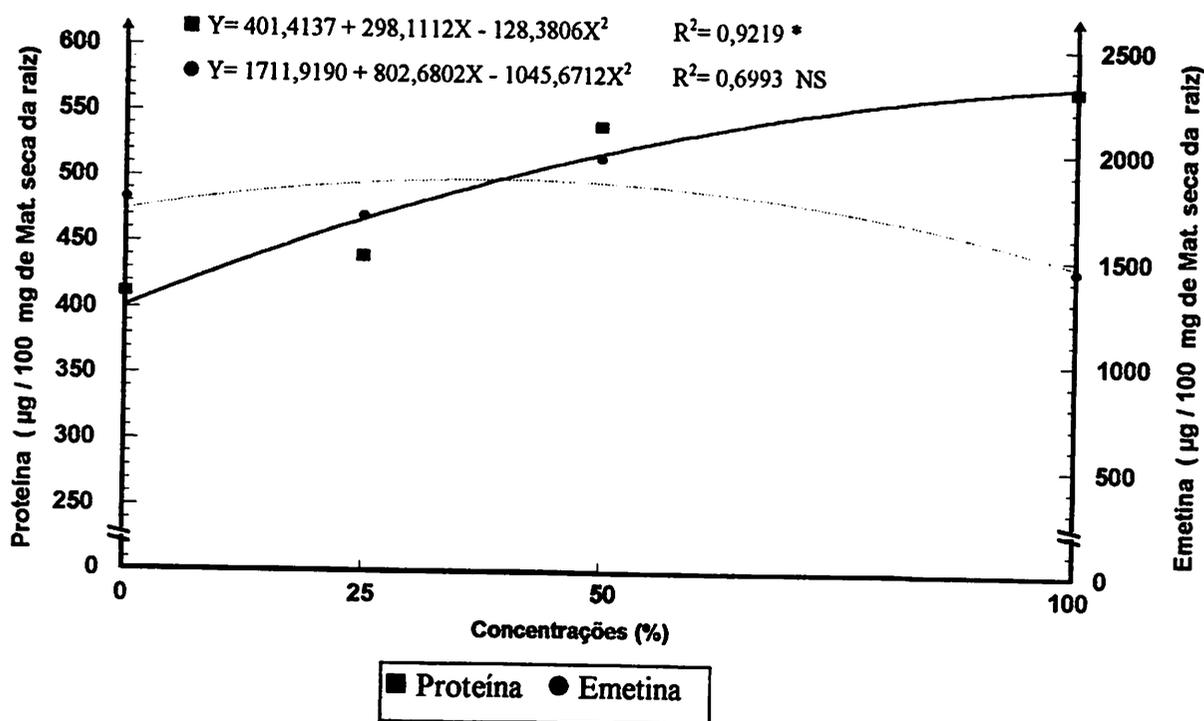


FIGURA 13. Representação gráfica da influência das concentrações nutritivas sob a produção de proteína e emetina em raízes de ipecacuanha com nove meses de cultivo. UFLA, Lavras - MG, 1995.

Durante os nove meses (Figura 13), as plântulas irrigadas com 100% dos sais continua direcionando os seus aminoácidos para síntese protéica em detrimento da biossíntese de emetina, a qual foi mais afetada nesta solução nutritiva. Com 50% de sais as plântulas mantiveram o equilíbrio entre a produção de emetina e proteína. As plântulas que não receberam solução nutritiva mostraram baixos teores de proteína, permitindo que parte dos aminoácidos livres fossem direcionados para a síntese de emetina, o que não é surpresa, uma vez que o metabolismo secundário está ligado ao primário através de seus substratos (Barz e Koster, 1981).

Quando as plantas atingiram os doze meses de cultivo (Figura 14), verificou-se que a solução com 100% foi a que melhor induziu a síntese de proteína e de emetina, provavelmente neste estágio de crescimento, existiu altas proporções de enzimas TDC presente no conteúdo de proteínas solúveis totais. Resultados semelhantes foram encontrados por Gugler; Funk e Brodelius (1988) em células em suspensão de *Thalictrum rugosum*, onde altos teores do seu alcalóide foram paralelos a altas quantidades de proteína. Pode-se então fazer inferências de que, os gens da TDC são induzidos por um determinado estágio de desenvolvimento aliado a um suprimento ótimo nutricional submetido às plantas de ipeca.

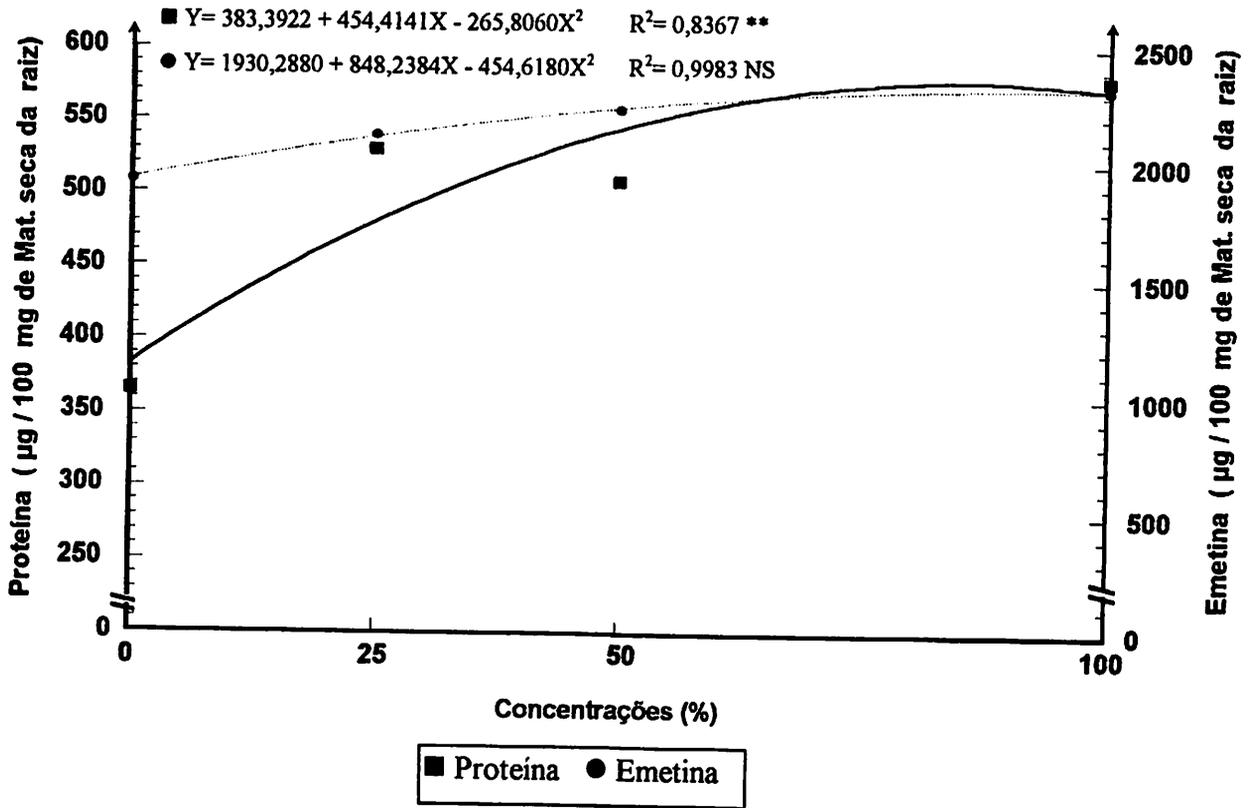


FIGURA 14. Representação gráfica da influência das concentrações nutritivas sob a produção de proteína e emetina em raízes de ipecacuanha com doze meses de cultivo. UFLA, Lavras - MG, 1995.

## **5 CONCLUSÕES**

**As soluções nutritivas influenciaram no ganho de biomassa da parte aérea e do sistema radicular durante o desenvolvimento e crescimento da plântula.**

**As soluções nutritivas induziram uma maior síntese de alcalóide no sistema radicular.**

**A solução nutritiva de 50% dos sais do MS mostrou melhor desenvolvimento vegetativo e produção do alcalóide.**

**A produção de emetina por biomassa de raiz na aplicação de 25, 50 e 100% de sais do MS, foram 70, 59; 141,45 e 80,70% a mais do que o controle, respectivamente.**

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALONSO, J.L.J. *La genetica los alcaloides en el genero *Lupinus**. Madrid: Ministério de Agricultura, Pesca y Alimentacion, 1983. 12p.
- ALZUGARAY, D.; ALZUGARAY, C. *Enciclopédia de plantas brasileiras*. São Paulo: Tres, 1988. 300p.
- ANGHINONI, I.; BARBER, S.A. Phosphorus influx and growth characteristics of corn roots as influenced by phosphorus supply. *Agronomy Journal*, Madison, v.72, n.4, p.685-688, July/Aug.1980.
- ASSIS, M. Desvendado o mistério da ipeca. *Cenargen Informa*, Brasília, v.3, n.11, p.1-15, fev. 1993.
- AUNG, L.H. Root initiation in tomato seedlings. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Alexandria, v.107, n.6, p.1015-1018, Nov.1982.
- AUNG, L.H. Root-shoot relationship. In: CARSON, E.W. *The plant root its environment*, 1974. p. 29-61.
- BAJAJ, Y.P.S.; FURMANOWA, M.; OLSZOWSK, O. Biotechnology of the micropropagation of medicinal and aromatic plants. In: BAJAJ, Y.P.S. *Biotechnology in agriculture and forestry*. Berlin: Springer Vergas, 1988. v.4, p.60-103.
- BALANDRIN, M.F.; CLOCKE, J.A. Medicinal, Aromatic, and Industrial materials from plants. In: BAJAJ, Y.P.S. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Berlin: Springer Vergas, 1988, v.4, 540p.
- BARZ, W.; KOSTER, J. Turnover and degradation of secondary natural products. In: STUMPF, P.K.; CONN, E.E. *The biochemistry of plants*. London: Academic Press, 1981,v.7, p.35-85.
- BEGON, M.; FITTER, A.H. *Advances in Ecological research*. London: Academic Press, 1992, v.23, 355p.
- BOULTER, D. Protein synthesis in plants. *Annual Review Plant Physiology*, Palo Alto, v.21, p.91-114, 1970.

- BRADFORD, L.A. **Form management analysis**. New York: John Wiley, 1967, 438p.
- CHAPIN, F.S. The mineral nutrition of wild plants. **Annual Review Ecology System**, Palo Alto, v.11, p.233-260, 1980.
- CLAUS, E.P.; TYLER, V.E. **Farmacognosia**. Florida: Ateneo, 1968. 533p.
- COMFORT, S.D.; MALZER, G.L.; BUSCH, R.H. Nitrogen fertilization of spring wheat genotypes: Influence on root growth and soil water depletion. **Agronomy Journal**, Madison, v.80, n.1, p.114-120, Jan/Feb.1988.
- CROCOMO, O.J. Assimilação do nitrogênio pelas plantas. In: FERRI, M.G. **Fisiologia vegetal**. 2.ed. São Paulo: E.P.U, 1985. v.1, p.181-212.
- DARRAL, M.M.; WAREING, P.F. The effect of nitrogen nutrition on cytokinin activity and free amino acids in *Betula pendula* R. and *Acer pseudoplatanus* L. **Journal Experimental Botanic**, Oxford, v.32, n.127, p.369-379, Jan.1981.
- DEMEYER, K.; DEJAEGERE, R. Effect of the nitrogen form used in the growth medium ( $\text{NO}_3$ ,  $\text{NH}_4$ ) on alkaloid production in *Datura stramonium* L. **Plant and Soil**, The Hague, v.146, n.10, p.79-86, Oct.1992.
- ELISABETSKY, E. Pesquisas em plantas medicinais. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.39, n.8, p.697-702, Aug.1987.
- FUJITA, Y.; TABATA, M. Secondary from plant cells-pharmaceutical applications and progress in commercial production. In: GREEN, C.E.; SOMERS, D.A.; HACKETT, W. P.; BIESBOER, D.D. **Plant tissue and cell culture**. New York: Alan R. Liss, 1987. p.169-185.
- FUNK, C.; GUGLER, K.; BRODELIUS, P. Increased secondary product formation in plant cell suspension cultures after treatment with a yeast carbohydrate preparation (Elicitor). **Phytochemistry**, Elmsford, v.26, n.2, p.401-405. 1987.
- GATONNI, L.A. **La raicilla a ipecacuanha**. Panamá: Ministério da agricultura, Comércio e Indústria, 1959. 32p.
- GOODWIN, T.W.; MERCER, E.I. **Introduction to plant biochemistry**. Orford: Plorjamon Press, 1983, 671p.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: Ministério da Agricultura, 1990. p.99-170.
- GUGLER, K.; FUNK, C.; BRODELIUS, P. Elicitor-induced tyrosine decarboxylase in berberine-synthesizing suspension cultures of *Thalictrum rugosum*. **Europe Journal Biochemistry**, New York, v. 170, p. 661-666, 1988.

- GUPTA, R. Ipecac a promising crop for north-eastern plantation regions. **Indian Farming**, v.21, p.19-21, 1971.
- HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: The link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, Elmsford, v.30, n.12, p.3864-3874, Dec.1991.
- HASHIMOTO, T.; YAMADA, Y. Alkaloid biogenesis: Molecular aspects. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecule Biology**, Palo Alto, v.45, p.257-285, June.1994.
- HEITHOLT, J.J. Water use efficiency and dry matter distribution in nitrogen and water stressed winter wheat. **Agronomy Journal**, Madison, v.81, n.3, p.464-469, May-June.1989.
- IKEDA, K.; TESHIMA, D.; AOYAMA, T.; SATAKE, M.; SHIMOMURA, K. Clonal propagation of *Cephaelis ipecacuanha*. **Plant Cell Reports**, New York, v.7, p.288-291, 1988.
- INFORMATIVO DA FUNDAÇÃO BRASILEIRA DE PLANTAS MEDICINAIS. Biotecnologia vegetal e produção de fármacos. I, n.02, jun./jul., 1989.
- JACKSON, M.B.; DREW, M.C.; GRIFFARD, S.C. Effects of spraying ethylene flooding tolerance. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v.52, n.1, p.23-28, May.1981.
- JAMES, D.J.; THURBON, I.J. Shoot and root initiation in vitro in the apple rootstock M.9 and effects of phloroglucinol. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v.56, n.1, p.15-20, Jan.1981.
- JAMES, W.O. Alkaloids in the plant. In: MANSKE, R.H.F. **The alkaloids**. New York: Academic Press, 1950. p.15-106.
- JENSEN, P. Effects of interrupted  $K^+$  supply on growth and uptake of  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  and  $Na^{2+}$  in spring wheat. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v.54, n.1, p.259-265, Jan.1982.
- JHA, S.; SAHU, N.P.; MAHATO, S. Production of the alkaloids emetine and cephaeline in callus cultures of *Cephaelis ipecacuanha*. **Planta Médica**, Neckarstr, v.54, n.6, p.483-584, June.1988.
- JHA, S.; SAHU, N.P.; SEN, J.; JHA, T.B.; MAHATO, S.B. Production of emetine and cephaeline from cell suspension and excised root cultures of *Cephaelis ipecacuanha*. **Phytochemistry**, Elmsford, v.30, n.12, p.3999-4003, Dec.1991.
- KALYANASUNDARAM, S. Effect of boron and indole-butyric acid on rooting of ipecac root cuttings. **Madras Agriculture Journal**, Coimbatore, v.56, p.812-820, 1968.
- KAPLAN, M.A.C.; GOTTLIEB, O.R. Busca Racional de Princípios ativos em plantas. **Interciência**, Caracas, v.15, n.1, p.26-29, jan.1990.

- KHARWARA, P.C.; AWASTHI, O.P; SINGH, C.M. Effect of nitrogen, phosphorus and time of nitrogen application on yield and quality of opium poppy (*Papaver somniferum* L.). *Indian Journal Agronomy*, New Delhi, v.31, n.1, p.26-28, Mar.1986.
- LAMEIRA, O.A.; COSTA, M.P. PINTO, J.E.B.P. The efficiency of shoot and plantlet formation of *Cephaelis ipecacuanha* after three subcultures *in vitro*. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.24, n.3, p.523-526, jun. 1994.
- LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. *Princípios de Bioquímica*. 3.ed. São Paulo: Sarvier, 1995. p.514-551.
- LESKOVAR, D.I.; CANTLIFFE. D.J.; STOFFELLA. P.J. Pepper (*Capsicum annum* L.) root growth and its relation to shoot growth in response to nitrogen. *Journal of Horticultural Science*, Hasford, v.64, n.6, p.711-716, Nov.1989.
- LINDSEY, K.; YEOMAN, M.M. The relationship between growth rate, differentiation and alkaloid accumulation in cell cultures. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, v.34, n.145, p.1055-1065, Aug.1983.
- MACKAY, A.D.; BARBER, S.A. Effect of nitrogen on root growth of two corn genotypes in the field. *Agronomy Journal*, Madison, v.78, n.4, p.699-703, July/Aug.1986.
- MAGALHÃES, J.; WILCOX, G. Interação entre formas de nitrogênio e reguladores de crescimento na absorção de nutrientes e produção de matéria seca pelo tomateiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.22, n.6, p.579-585. jun.1987.
- MALZLISH, N.A.; FRITTON, D.D; KENDALL, W.A. Root morphology and early development of maize at varying levels of nitrogen. *Agronomy Journal*, Madison, v.72, n.1, p.25-31, Jan.1980.
- MALAVOLTA, E. *Elementos de nutrição mineral de plantas*. Piracicaba: Agronômica Ceres Ltda, 1980. 251p.
- MANTANARI JUNIOR, L.; FIGUEIRA, G.M.; MAGALHÃES, P.M. Influência da fertilização NPK na biomassa e no teor de alcalóide de *Atropa belladonna*, Linn. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, Brasília, v.5, n.1, p.71, jun.1993.
- MARSCHNER, H. *Mineral nutrition of higher plants*. London: Academic Press, 1990. 674p.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum*, v. 15, p. 473-497, 1962.
- MIACHIR, J.I. *Proposição de um protocolo de cultura de tecidos para produção de compostos secundários para Curcuma zedoaria Roscoe*. Piracicaba: ESALQ, 1992. 126p. (Tese - Mestrado em Fisiologia Vegetal).

- OAKS, A. Nitrogen metabolism in roots. *Annual Review Plant Physiology*, Palo Alto, v.36, p.345-346, 1985.
- PENNA, M. *Dicionário brasileiro de plantas medicinais*. 3.ed. São Paulo: Kosmos, 1946. 409p.
- PERSON, H. Fine root production, mortality, and decomposition in foresty ecosystems. *Vegetatio*, The Hague, v.41, p.101-109, 1979.
- PHILLIPS, R.; HENSHAW, G.G. The regulation of synthesis of phenolics in stationary phase cell cultures of *Acer pseudoplatanus* L. *Journal Experimental Botany*, Oxford, v.28, n.105, p.785-794. Aug.1977.
- PIATTI, T.; BOLLER, T.; BRODELIUS, P.E. Induction of Ethylen biosynthesis is correlated with but not required for induction of alkaloid accumulation in elicitor-treated *Eschscholtzia* cells. *Phytochemistry*, Elmsford, v.30, n.7, p.2151-2154, July.1991.
- RA-MÓN, S.M.C. *Farmacognosia descriptiva*. Barcelona, 1957, 605p.
- ROBINSON, T. Metabolism and function of alkaloids in plants. *Science*, Massachusetts, v.184, n.4135, p.430-435, Apr.1974.
- SALISBURY, F.; ROSS, C.W. *Plant Physiology*. Carlifornia: Wadsworth, 1992. 682p.
- SCHRADER, L.E.; DOMSKA, D.; JUNG, Jr.; PETERSON, L.A. Uptake and assimilation of ammonium-N and their influence on the growth of corn (*Zea mays* L.). *Agronomy Journal*, Madison, v.64, n.5, p.690-695, Sept./Oct. 1972.
- SIGMA. Emetine. In:-*Biochemicals organic compounds*. St. Louis; SIGMA CHEMICAL, p.400. 1995.
- SINGH, K.P.; AHUJA.K.N. Dry matter accumulation, oil content and nutrient uptake in groundnut (*Arachis hypogea*) L. cv. T 64) as affected by fertilizers and plant density. *Índia Journal Agronomy*, New Delhi, v.30, n.1, p.40-45, Mar.1985.
- SIVIR, I.; EREZ, A. In vitro propagation of malling merton apple rootstocks. *HortScience*, Alexandria, v.15, n.5 p.597-598, Oct.1980.
- SOMERS, D.A.; KUO, T.M.; KLEINHOF, A.; WARNER, R.L.; OAKS, A. Synthesis and degradation of barley nitrate reductase. *Plant Physiology*, v.72, n.4, p.949-952, Aug.1983.
- STUMPF, P.K.; CONN, E.E. *The biochemistry of plants*. London: Academic Press, 1981.v.7, 793p.
- VÁLIO, I.F.M. Auxinas. In: FERRI, M.G. *Fisiologia vegetal*. São Paulo: E.P.U., 1986, v.2, p.39-72.

- VIEIRA, L.S. **Manual da medicina popular**. Belém: Agronomia Vozes, 1991. p.247.
- WIERMANN, R. Secondary plant products and cell and tissue differentiation. In: STUMPF, P.K.; CONN, E.E. **The biochemistry of plants**. London: Academic Press, 1981. v.7, p.86-117.
- WILLIAMS, R.D.; ELLIS, B.E. Alkaloids from agrobacterium rhizogenes-transformed *Papaver somniferum* culture. **Phytochemistry**, Elmsford, v.32, n.3, p.719-723. Fev.1993.
- WINK, M. Physiology of secondary product formation in plants. In: CHARWOOD, B.; RHODES, M.J.C. **Secondary products from plants tissue culture**. Oxford: Clarendon Press, 1990. p. 23-42.
- WINTER, H.F.; LOUSTALOT, A.J. The effect and nitrogen levels on growth and alkaloid content of young plants of *Cinchona ledgeriana*. **Plant Physiology**, Washington, v.27, n.3, p.575-583. July.1952.
- YADAV, R.I.; MOHAN, R.; SINGH, R.; GUPTA, M.M. Effect of rate and time of nitrogen application on transplanted *Hyoscyamus muticus* Linn. **Índia Journal Agronomy**, New Delhi, v. 29, n.4, p.553-554, Dec.1984.
- YEOMAN, M.M.; HOLDEN, M.A.; CORCHET, P.; HOLDEN, P.R.; GOY, J.G.; HOBBS, M.C. In: CHARWOOD, B.; RHODES, M.J.C. **Secondary products from plants tissue culture**. Oxford: Clarendon Press, 1990. p.139-166.
- YOSHIMATSU, K.; SHIMOMURA, K. Efficient shoot formation on internodal segments and alkaloid formation in the regenerates of *Cephaelis ipecacuanha* A. Richard. **Plant Cell Reports**, New York, v.9, p.567-570, 1991.
- YOSHIMATSU, K.; KAIO, K.; SHIMOMURA, K. Clonal propagation of *Cephaelis ipecacuanha* (II): Characteristics of regenerated plants field-cultivated in two districts. **Journal Plant Physiology**, v.144, n.1, p.22-25, Jan.1994.

## **APÊNDICE**

TABELA 1A. Resumo do quadro de análise de variância do peso seco da parte aérea raiz (x+0.5) e peso seco de raiz (x+0.5) de plantas de ipecacuanha.

Fonte de Variação	G.L	Quadrados Médios	
		Peso de Matéria seca	
		Parte aérea	Raiz
Solução nutritiva	3	0,4891816	0,3352993**
Resíduo (A)	44	0,0129981	0,0251034
Parcelas	47	-	-
Épocas	2	6,3608015**	14,9049185**
Solução × Época	6	0,1562954**	0,2901791**
Resíduo (B)	88	0,0211692	0,0406264
Total	143	-	-
CV(A) Parte aérea e raiz	5,053 e 6,484%	-	-
CV(B) Parte aérea e raiz	11,169 e 14,287%	-	-

\*\*Significativo ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste F.

TABELA 2A. Resumo da Regressão Polinomial para peso seco da parte aérea(x+0.5) de plantas de ipecacuanha. Níveis de solução dentro de época.

Causa de Variação	Teste F					
	Épocas (meses)					
	6		9		12	
	Parte aérea	Coef. Deter.	Parte aérea	Coef. Deter.	Parte aérea	Coef. Deter.
Regressão Linear	NS	0,0842	**	0,6480	**	0,3965
Regressão Quadrática	NS	0,2200	**	0,8933	**	0,9848
Regressão Cúbica	NS	1.000	*	1.000	NS	1.000

NS. não significativo

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade.

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade.

**TABELA 3A. Resumo da Regressão Polinomial para peso seco da parte aérea (x+0.5) de plantas de ipecacuanha. Níveis de época dentro de solução.**

C. Variação	Teste F							
	Soluções (%)							
	Controle		25		50		100	
	P. aérea	Coef. Deter	P. aérea	Coef. Deter	P. aérea	Coef. Deter	P. aérea	Coef. Deter
Reg. Linear	NS	0,9970	**	0,9849	**	0,9999	**	0,9960
Reg. Quadrát.	NS	1.000	NS	1.000	NS	1.0000	NS	1.000

NS. não significativo

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade.

**TABELA 4A. Resumo da Regressão Polinomial para peso seco da raiz (x+0.5) de plantas de ipecacuanha. Níveis de solução dentro de época.**

Causa de Variação	Teste F					
	Épocas (meses)					
	6		9		12	
	Raiz	Coef. Deter.	Raiz	Coef. Deter.	Raiz	Coef. Deter.
Regressão Linear	NS	0,7549	NS	0,0662	**	0,2116
Regressão Quadrática	NS	0,7693	NS	0,0885	**	0,9765
Regressão Cúbica	NS	1.000	**	1.000	NS	1.000

NS. não significativo

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade.

**TABELA 5A. Resumo da Regressão Polinomial para peso seco da raiz (x+0.5) de plantas de ipecacuanha. Níveis de época dentro de solução.**

C. Variação	Teste F							
	Soluções (%)							
	Controle		25		50		100	
	Raiz	Coef. Deter	Raiz	Coef. Deter	Raiz	Coef. Deter	Raiz	Coef. Deter
Reg. Linear	**	0,9976	**	0,8890	**	0,9627	**	0,9728
Reg. Quadrática	NS	1.000	**	1.000	**	1.0000	*	1.000

NS. não significativo

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade.

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade.

TABELA 6A. Resumo do quadro de análise de variância do comprimento do sistema radicular e número de raízes primárias de plantas de ipecacuanha.

Fonte de Variação	G.L	Quadrados Médios	
		Comprimento (cm)	Número de raízes
Solução nutritiva	3	14,4639286	11,4550117**
Resíduo (A)	44	10,3991138	2,7329911
Parcelas	47	-	-
Épocas	2	281,7263367**	4,4301438NS
Solução × Época	6	5,6372621NS	0,7463937NS
Resíduo (B)	88	7,6468791	3,2611676
Total	143	-	-
CV(A) Compr. e Número	11,359 e 13,495%	-	-
CV(B) Compr. e Número	16,872 e 25,533%	-	-

NS. não significativo

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste F.

TABELA 7A. Resumo da Regressão Polinomial para os níveis de solução no comprimento (cm) do sistema radicular de plantas de ipecacuanha.

Causa de Variação	Teste F	
	Comprimento	Coef.Determinação
Regressão Linear	NS	0,4667
Regressão Quadrática	NS	0,9594
Regressão Cúbica	NS	1,000
NS. não significativo		

TABELA 8A. Resumo da Regressão Polinomial para os níveis de época no comprimento (cm) do sistema radicular de plantas de ipecacuanha.

Causa de Variação	Teste F	
	Comprimento	Coef.Determinação
Regressão Linear	**	0,9458
Regressão Quadrática	*	1,000

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade.

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade.

TABELA 9A. Resumo da Regressão Polinomial para os níveis de solução do número de raízes primárias de plantas de ipecacuanha.

Causa de Variação	Teste F	
	Número de raízes	Coef. Determinação
Regressão Linear	**	0,6422
Regressão Quadrática	NS	0,6422
Regressão Cúbica	*	1,000

NS. não significativo

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade.

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade.

TABELA 10A. Resumo da Regressão Polinomial para os níveis de época do número de raízes primárias de plantas de ipecacuanha.

Causa de Variação	Teste F	
	Comprimento	Coef. Determinação
Regressão Linear	NS	0,9469
Regressão Quadrática	NS	1.000

NS. não significativo.

TABELA 11A. Resumo do quadro de análise de variância do Teor de Proteína e Emetina do sistema radicular de plantas de ipecacuanha.

Fonte de Variação	G.L	Quadrados Médios	
		Proteína ( $\mu\text{g}$ )	Emetina ( $\mu\text{g}$ )
Solução nutritiva	3	32942,8616925**	2999007,7548952 <sup>NS</sup>
Resíduo (A)	8	354,2485700	180240,8456621
Parcelas	11	-	-
Épocas	2	72308,9331731**	4954255,3090479**
Solução $\times$ Época	6	7351,6181072**	209121,4509434*
Resíduo (B)	16	583,3682074	60908,9981289
Total	35	-	-
CV(A) Proteína e Emetina	2,428 e 15,488%	-	-
CV(B) Proteína e Emetina	5,397 e 15,554%	-	-

NS. não significativo

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste F.

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste F.

TABELA 12A. Resumo da Regressão Polinomial para o teor de proteína ( $\mu\text{g}$ ) em raízes de plantas ipecacuanha. Níveis de solução dentro de época.

Causa de Variação	Teste F					
	Épocas (meses)					
	6		9		12	
	Proteína	Coef. Deter.	Proteína	Coef. Deter.	Proteína	Coef. Deter.
Regressão Linear	**	0,5801	**	0,8744	**	0,6986
Regressão Quadrát.	**	0,9981	*	0,9219	**	0,8367
Regressão Cúbica	NS	1.000	**	1.000	**	1.000

NS. não significativo

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade.

TABELA 13A. Resumo da Regressão Polinomial para o teor de proteína ( $\mu\text{g}$ ) em raízes de plantas ipecacuanha. Níveis de época dentro de solução.

C. Variação	Teste F							
	Soluções (%)							
	Controle		25		50		100	
	Proteína	Coef. Deter.	Proteína	Coef. Deter.	Proteína	Coef. Deter.	Proteína	Coef. Deter.
Reg. Linear	NS	0,0402	**	0,9950	**	0,6167	**	0,7992
Reg. Quadrát.	**	1.000	NS	1.000	**	1.0000	**	1.000

NS. não significativo

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade.

TABELA 14A. Resumo da Regressão Polinomial para o teor de emetina ( $\mu\text{g}$ ) em raízes de plantas ipecacuanha. Níveis de solução dentro de época.

Causa de Variação	Teste F					
	Épocas (meses)					
	6		9		12	
	Emetina	Coef. Deter.	Emetina	Coef. Deter.	Emetina	Coef. Deter.
Regressão Linear	NS	0,3030	NS	0,3109	NS	0,8832
Regressão Quadrática	NS	0,7843	NS	0,6963	NS	0,9983
Regressão Cúbica	NS	1.000	NS	1.000	NS	1.000

NS. não significativo

TABELA 15A. Resumo da Regressão Polinomial para o teor de emetina ( $\mu\text{g}$ ) em raízes de plantas ipecacuanha. Níveis de época dentro de solução.

C. Variação	Teste F							
	Soluções (%)							
	Controle	25		50		100		
	Emetina	Coef. Deter	Emetina	Coef. Deter	Emetina	Coef. Deter	Emetina	Coef. Deter
Reg. Linear	**	0,8211	**	0,9948	**	0,9076	**	0,9633
Reg. Quadr.	**	1.000	NS	1.000	NS	1.0000	NS	1.000

NS. não significativo

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade.