



**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ**  
*CAMPUS PATO BRANCO*  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**



DOUGLAS ALVAREZ ALAMINO

**CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS DE FISALIS (*Physalis pubescens* L.) PRODUZIDA POR DIFERENTES MÉTODOS E SUBSTRATOS E ASPECTOS ANATÔMICOS E FITOQUÍMICOS**

DISSERTAÇÃO

**PATO BRANCO**  
**2011**

DOUGLAS ALVAREZ ALAMINO

**CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS DE FISALIS (*Physalis pubescens* L.) PRODUZIDA POR DIFERENTES MÉTODOS E SUBSTRATOS E ASPECTOS ANATÔMICOS E FITOQUÍMICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Agronomia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *Campus* Pato Branco, para à obtenção do título de Mestre em Agronomia - Área de Concentração: Produção vegetal.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Marisa de Cacia Oliveira

PATO BRANCO  
2011

Catálogo na Fonte por Elda Lopes Lira CRB9/1295

- A318c Alamino, Douglas Alvarez  
Características agronômicas de fisalis (*Physalis pubescens* L) produzida por diferentes métodos e substratos e aspectos anatômicos e fitoquímicos / Douglas Alvarez Alamino. – 2011.  
89 p. : il.; 30 cm.
- Orientadora: Marisa de Cacia Oliveira  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Pato Branco/PR, 2011.  
Bibliografia: f. 55-61
1. Anatomia vegetal 2. Camapu 3. Epistefamiersina 4. Metabólitos secundários 5. Substrato. I. Oliveira, Marisa de Cacia, orient. II. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

CDD(22. ed.) 630

Biblioteca da UTFPR – *Campus* Pato Branco



Ministério da Educação  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Campus Pato Branco  
Gerência de Pesquisa e Pós-Graduação  
Programa de Pós-Graduação em Agronomia

UTFPR

### TERMO DE APROVAÇÃO

Titulo da Dissertação n° 043

**Características agrônômicas de fisalis (*Physalis pubescens* L.) produzidas por diferentes métodos e substratos e aspectos anatômicos e fitoquímicos**

por

**Douglas Alvarez Alamino**

Dissertação apresentada às oito horas e trinta minutos do dia dezesseis de março de dois mil e onze, como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE EM AGRONOMIA, Linha de Pesquisa – Sistemas de Produção Vegetal, Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção vegetal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Pato Branco. O candidato foi argüido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho APROVADO.

Banca examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Fabiola Villa  
UNIOESTE

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Sérgio Miguel Mazaro  
UTFPR

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Mário Antônio Alves da Cunha  
UTFPR

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Marisa de Cacia Oliveira  
UTFPR  
Orientadora

Visto da Coordenação

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Idemir Citadin  
Coordenador do PPGAG

A meus pais José Carlos e Valquíria e aos meus irmãos  
pelo carinho, paciência, compreensão e apoio.

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a DEUS, sem o qual nada disso seria possível.

A minha orientadora, Professora Dra. Marisa de Cacia Oliveira, por ter acreditado e confiado em meu trabalho, pelo carinho, paciência, tolerância, amizade e companheirismo. Por ter dedicado parte de seu tempo, em reuniões, orientações, revisões, correções e sugestões, as quais foram imprescindíveis para o bom andamento e enriquecimento da pesquisa. Enfim, agradeço pela possibilidade de ter sido seu primeiro orientado de mestrado.

Aos meus inestimáveis amigos (as), Eli, Cris, Renata e Gustavo, os (as) quais hoje considero como irmãos (ãs). Obrigado por tornarem mais divertidos e luminosos estes dois anos de convivência e parceria que tivemos. Saibam que onde eu estiver sempre levarei comigo as boas recordações e um pedaço de cada um de vocês do lado esquerdo do peito.

Ao Programa de Pós-graduação em Agronomia e seus professores, pela oportunidade e troca de conhecimento.

Ao Professor Dr. Andersson Barisson e ao Doutorando Clebson (pardal) do Centro de Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal do Paraná, pela disponibilidade em analisarem as amostras e interpretarem os espectros de RMN  $^1\text{H}$ ;

Ao Professor Dr. Marcio, do Departamento de Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Pato Branco, pelo auxílio nas análises e interpretação dos dados de CG/EM.

Ao Professor Ms. Olavo Araujo Guimarães, do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná (UFPR), pela identificação do material botânico.

Aos técnicos do Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná (UFPR) por disponibilizarem o espaço e auxiliarem nas análises histológicas.

Ao CNPq/ CAPES pelas bolsas concedidas.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente colaboraram e torceram pela concretização de mais esta etapa.

"As pessoas que vencem neste mundo são as que procuram as circunstâncias de que precisam e, quando não as encontram, as criam."

Bernard Shaw

## RESUMO GERAL

ALAMINO, Douglas Alvarez. Características agronômicas de físalis (*Physalis pubescens* L.) produzidas por diferentes métodos e substratos e aspectos anatômicos e fitoquímicos. 2011. 89 f. - Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2011.

*Physalis pubescens* L., ou camapu, é uma planta herbácea, cujos frutos são comestíveis e folhas, caules e raízes utilizados na medicina tradicional, contra diversas enfermidades. Como os estudos referentes a esta espécie são escassos o presente trabalho teve como objetivos: 1) avaliar os aspectos agronômicos de plantas cultivadas por diferentes métodos e substratos, 2) descrever anatomicamente as principais estruturas da plantas e 3) detectar a presença de compostos de interesse do metabolismo secundário. Para tanto, no primeiro ensaio foram avaliadas plantas produzidas a partir de sementes e estacas herbáceas. Como substratos foram utilizados: (SA) Solo + areia; (SV) Solo + vermiculita; (SP) Solo + Plantmax; (SAV); Solo + areia + vermiculita e (S) Solo. Foram avaliados os comprimentos da parte aérea e da maior raiz; área foliar; massas fresca e seca das folhas, caules e raízes; e volume radicular. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em um esquema fatorial de 2x5, com 10 repetições por tratamento. No segundo ensaio, folhas, caules e flores foram submetidos a cortes parâdermicos e transversais, fixados em FAA 70%, armazenados em etanol a 70% e posteriormente, analisados por microscopia ótica e eletrônica de varredura. No terceiro ensaio, folhas oriundas de plantas cultivadas em vasos mantidos em casa de vegetação foram secas, moídas e extraídas com hexano. O resíduo seco hexânico foi aplicado em coluna cromatográfica, tendo como solventes de partição diclorometano, acetato de etila, metanol e água destilada. As frações foram submetidas à cromatografia em camada delgada (TLC) e ressonância magnética de prótons (RMN <sup>1</sup>H). O extrato bruto foi submetido à cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG/EM). Para o primeiro ensaio observou-se interação significativa entre os fatores substrato e método de propagação somente para massa fresca e seca dos caules, com destaque para o método estaquia e os substratos S, SA, SP. Para as demais variáveis não foram constatadas diferenças significativas. Em relação aos aspectos anatômicos constatou-se que *P. pubescens* apresenta lâmina foliar hipoestomática, mesófilo com a presença de drusas; idioblastos de areia cristalina dispersos aleatoriamente pelo pecíolo, e tricomas glandulares e eglandulares ao longo de toda a lâmina foliar, caule, pecíolo e pétalas. O estudo fitoquímico por CG/EM revelou a possível presença do alcalóide epistefamiersina (86% de probabilidade); também foram observados as presenças de cumarinas, fisalinas, óleo essencial, saponinas, triterpenóides e taninos por TLC, além de triterpenos e compostos aromáticos de baixa intensidade por RMN <sup>1</sup>H. Diante destes resultados, conclui-se que *P. pubescens* possui características anatômicas que auxiliam a diferenciá-la das demais espécies do gênero, e que a mesma sintetiza uma grande variedade de metabólitos secundários, com a estaquia sendo o melhor método de propagação, independente do tipo de substrato.

**Palavras – chave:** anatomia vegetal; camapu; epistefamiersina; metabólitos secundários; substratos.

## ABSTRACT

ALAMINO, Douglas Alvarez. Agronomic characteristics of physalis (*Physalis pubescens* L.) produced by different methods and substrates and anatomical and phytochemical aspects. 2011. 89 f. - Dissertation (Master in Agronomy) - Graduate Program in Agronomy, Federal Technological University of Paraná. Pato Branco, 2011.

*Physalis pubescens* L., or Winter Cherry, is a herbaceous plant, whose fruits are edible and the leaves, stems and roots used in traditional medicine against various diseases. As the studies for this species are scarce this study aimed to 1) assess the agronomic features of crops grown by different methods and substrates, 2) describe the main anatomical structures of plants and 3) the presence of compounds of interest secondary metabolism. For this, the first trials were evaluated plants grown from seed and cuttings. The substrates were used: (SA) Soil + sand; (SV) Soil + vermiculite, (SP) Soil + Plantmax; (SAV) Soil + sand + vermiculite and (S) Soil. We evaluated the length of shoot and main root, leaf area, fresh and dry weight of leaves, stems and roots and root volume. The experimental design was completely randomized in a factorial scheme 2x5, with 10 replicates per treatment. In the second trial leaves, stems and flowers were sectioned transverse paradermic and fixed in FAA 70%, stored in 70% ethanol and subsequently analyzed by optical microscopy and scanning electron microscopy. In the third essay leaves from plants grown in pots in a greenhouse, were dried and extracted with hexane. The hexanic dry residue was applied to the extraction chromatographic column, and as solvents for the partition dichloromethane, ethyl acetate, methanol and distilled water. The fractions were subjected to thin layer chromatography (TLC) and proton magnetic resonance (NMR  $^1\text{H}$ ). The crude extract was subjected to gas chromatography-mass spectrometry (GC / MS). For the first test there was significant interaction between the factors substrate and method of propagation only for fresh and dry weight of stems, especially the cutting method and the substrate S, SA, SP. For the other variables were not significantly different. Regarding the anatomy it was found that *P. pubescens* leaf presents hypostomatic mesophyll with the presence of drusen, crystalline sand idioblasts scattered randomly around the petiole, and glandular and eglandular throughout the leaf, stem, petiole and flower petals. Phytochemical study by GC / MS revealed the possible presence of alkali epistephamsine (86% probability) were also observed the presence of coumarins, physalins, essential oil, saponins, triterpenoids and tannins by TLC, and triterpenes and aromatic compounds of low NMR  $^1\text{H}$  intensity. Given these results it is concluded that *P. pubescens* has anatomical features that help differentiate it from other species of the genus, and that it synthesizes a wide variety of secondary metabolites also that the cutting is the best method of propagation, independent of substrate type.

**Key - words:** plant anatomy; winter cherry; epistephamsine; secondary metabolites; substrates.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01</b> – Estrutura química do ergostano.....	<b>21</b>
<b>Figura 02</b> – Estruturas químicas dos principais grupos de vitaesteróides encontrados no gênero <i>Physalis</i> . Fonte: TOMASSINI et al., (2000) .....	<b>22</b>
<b>Figura 03</b> – Etapas de preparo do extrato bruto das folhas de <i>Physalis pubescens</i> L. e fracionamento cromatográfico do resíduo seco hexânico. UTFPR. Campus Pato Branco, 2011. Fonte: Douglas Alvarez Alamino. ....	<b>60</b>
<b>Figura 04</b> – Espectros de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz – CDCl <sub>3</sub> ) da fração acetato de etila (EtOAc) obtida pelo fracionamento cromatográfico do extrato bruto das folhas de <i>Physalis pubescens</i> L. UTFPR, Campus Pato Branco, 2011. ....	<b>73</b>
<b>Figura 05</b> – Espectros de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz – CDCl <sub>3</sub> ) da fração hidroalcolica, obtida pelo fracionamento cromatográfico do extrato bruto das folhas de <i>P. pubescens</i> . UTFPR, Campus Pato Branco, 2011. ....	<b>74</b>
<b>Figura 06</b> – Cromatograma do extrato bruto das folhas de <i>Physalis pubescens</i> L. evidenciando o pico de retenção do composto epistefamiersina. UTFPR, Campus Pato Branco, 2011.....	<b>75</b>
<b>Figura 07</b> – Estrutura molecular da epistefamiersina. UTFPR, Campus Pato Branco, 2011. ....	<b>75</b>
<b>Figuras 08</b> – Espectro de massa do composto epistefamiersina. ....	<b>76</b>

## LISTA DE FOTOGRAFIAS

- Fotografia 01** – Aspectos morfológicos de *Physalis pubescens* L., onde (A) Planta em estágio vegetativo; (B) folhas; (C) flores; (D) frutos; (E) sementes e (F) cálice inflado que envolve o fruto. UTFPR, Campus Pato Branco, 2011. Fonte: Douglas Alvarez Alamino .....19
- Fotografia 02** – Aspecto visual da parte aérea das plantas de *Physalis pubescens* L. produzidas por estaquia (A) e por sementes (B). UTFPR, Campus Pato Branco 2011. Fonte: Douglas Alvarez Alamino .....34
- Fotografia 03** – Aspecto visual das raízes produzidas por plantas de *Physalis pubescens* L. propagadas por estaquia (A) e por sementes (B). Legenda: SA (Solo + areia); SV (Solo + vermiculita); SP (Solo + Plantmax); SAV (Solo + areia + vermiculita); S (Solo). UTFPR, Campus Pato Branco, 2011. Fonte: Douglas Alvarez Alamino .....38
- Fotografia 04** - Seção transversal da lâmina foliar. Legenda: ead: epiderme adaxial; pp: parênquima paliçádico; plc: parênquima lacunoso; pcl: parênquima clorofiliano; drs: drusas; vxl: vaso xilemático; eab: epiderme abaxial. UTFPR, Campus Pato Branco, 2011. Fonte: Douglas Alvarez Alamino .....47
- Fotografia 05** – Fotomicrografia de varredura das secções paradérmicas de folhas de *Physalis pubescens* L., evidenciando o aspecto anatômico das células da face abaxial (A) e adaxial (B). Legenda: est: estômato; tce: tricoma eglandular. UTFPR, Campus Pato Branco, 2011. Fonte: Douglas Alvarez Alamino e Marisa de Cacia Oliveira .....48
- Fotografia 06** – Secção paradérmica de folhas de *Physalis pubescens* L., evidenciando o grande número de estômatos dispersos face abaxial. UTFPR, Campus Pato Branco, 2011. Fonte: Douglas Alvarez Alamino .....48
- Fotografia 07** – Fotomicrografia de varredura da face abaxial das folhas de *Physalis pubescens* L., A) nervura central (nvc) e os tricomas glandulares (tcg) e eglandulares (tce) presentes sobre a epiderme; B) detalhe dos tricomas glandular estipado e C) eglandulares. UTFPR, Campus Pato Branco, 2011. Fonte: Douglas Alvarez Alamino e Marisa de Cacia Oliveira .....49
- Fotografia 08** - Seção transversal nervura principal. Legenda: ead: epiderme adaxial; col: colênquima; tce: tricoma eglandular; xil: xilema; fl: floema; cam: câmbio; pf: parênquima fundamental; eab: epiderme abaxial. UTFPR, Campus Pato Branco, 2011. Fonte: Douglas Alvarez Alamino .....50
- Fotografia 09** - Seção transversal do pecíolo, região mediana. Legenda: ead: epiderme adaxial; col: colênquima; fv: feixe vascular; trc: tricomas; id: idioblastos; xl:

xilema; fl: floema; pf: parênquima fundamental; eab: epiderme abaxial. UTFPR, Campus Pato Branco, 2011. Fonte: Douglas Alvarez Alamino .....51

**Fotografia 10** - Secção transversal do caule, região mediana. Legenda: epd: epiderme; col; colênquima; trc: tricomas; xl: xilema; fl: floema; fv: feixe vascular; pq: parênquima; pm: parênquima medular; pcl: parênquima clorofiliano. UTFPR, Campus Pato Branco, 2011. Fonte: Douglas Alvarez Alamino .....52

**Fotografia 11** – Fotomicrografias de varredura da face adaxial das pétalas de *Physalis pubescens* L., evidenciando (A) a presença de papilas (pap), tricomas eglândulares (teg); e (B) detalhes das papilas e grãos de pólen (pól). UTFPR, Campus Pato Branco, 2011. Fonte: Douglas Alvarez Alamino e Marisa de Cacia Oliveira .....52

**Fotografia 12** – Aspecto geral das frações obtidas por fracionamento cromatográfico em coluna antes da evaporação dos solventes. Legenda: FDIC (Fração diclorometano); FACE (Fração acetato de etila) FMET (Fração metanol) e FH<sub>2</sub>O (Fração hidroalcoólica). UTFPR, Campus Pato Branco, 2011. Fonte: Douglas Alvarez Alamino .....65

**Fotografia 13** – Perfil cromatográfico das frações do extrato bruto de *P. pubescens* para alcalóides. Sistema de solventes para o desenvolvimento e revelação, respectivamente: tolueno:acetato de etila:metanol (7:2:1 v/v) e reagente de Dragendorff. Legendas: DIC (fração diclorometano), ACE (fração acetato de etila), ME (fração metanol) e H<sub>2</sub>O (fração hidroalcoólica). UTFPR, Campus Pato Branco, 2011. Fonte Douglas Alvarez Alamino .....67

**Fotografia 14** – Perfil cromatográfico das frações do extrato bruto de *P. pubescens* para cumarinas. Sistema de solventes para o desenvolvimento e revelação, respectivamente: tolueno:acetato de etila (9,3:0,7 v/v) e KOH etanólico a 5% + UV (365nm). Legendas: DIC (fração diclorometano), ACE (fração acetato de etila), ME (fração metanol) e H<sub>2</sub>O (fração hidroalcoólica). UTFPR, Campus Pato Branco, 2011. Fonte: Douglas Alvarez Alamino .....68

**Fotografia 15** – Perfil cromatográfico das frações do extrato bruto de *P. pubescens* para fisalinas. Sistema de solventes para o desenvolvimento e revelação, respectivamente: hexano:acetato de etila (3:7 v/v) e reagente fenol sulfúrico. Legendas: DIC (fração diclorometano), ACE (fração acetato de etila), ME (fração metanol) e H<sub>2</sub>O (fração hidroalcoólica). UTFPR, Campus Pato Branco, 2011. Fonte Douglas Alvarez Alamino .....69

**Fotografia 16** – Perfil cromatográfico das frações do extrato bruto de *P. pubescens* para óleo essencial. Tolueno : acetato de etila (93:7 v/v) e reagente fenol sulfúrico. Legendas: DIC (fração diclorometano), ACE (fração acetato de etila), ME (fração metanol) e H<sub>2</sub>O (fração hidroalcoólica). UTFPR, Campus Pato Branco, 2011. Fonte: Douglas Alvarez Alamino .....70

**Fotografia 17** – Perfil cromatográfico das frações do extrato bruto de *P. pubescens* para saponinas e triterpenóides. Sistemas de solventes para o desenvolvimento e revelação, respectivamente: butanol:ácido acético:água (5:1:4 v/v) e reagente de Liebermann – Burchard + UV (365nm). Legendas: DIC (fração diclorometano), ACE (fração acetato de etila), ME (fração metanol) e H<sub>2</sub>O (fração hidroalcolica). UTFPR, Campus Pato Branco, 2011. Fonte: Douglas Alvarez Alamino .....71

**Fotografia 18** – Perfil cromatográfico das frações do extrato bruto de *P. pubescens* para taninos. Sistemas de solventes para o desenvolvimento e revelação, respectivamente: acetato de etila:metanol:água (7,7: 1,5: 0,8 v/v) e reagente de Liebermann – Burchard. Legendas: DIC (fração diclorometano), ACE (fração acetato de etila), ME (fração metanol) e H<sub>2</sub>O (fração hidroalcolica). UTFPR, Campus Pato Branco, 2011. Fonte: Douglas Alvarez Alamino .....72

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 01** – Análise química dos substratos. UTFPR, Campus Pato Branco, 2011. **31**

**Tabela 02** – Resultado da interação entre métodos de propagação e substratos para a massa fresca e seca (g) do caule de *Physalis pubescens* L. UTFPR, Campus Pato Branco, 2011.....**33**

**Tabela 03** – Altura média da parte aérea (cm) e comprimento da maior raiz (cm) em plantas de *Physalis pubescens* L. propagadas por diferentes métodos e substratos. UTFPR, Campus Pato Branco, 2011.....**35**

**Tabela 04** – Área foliar (cm<sup>2</sup>), biomassa fresca e seca das folhas em plantas de *Physalis pubescens* L. propagadas por diferentes métodos e substratos. UTFPR, Campus Pato Branco, 2011. ....**36**

**Tabela 05** – Volume das raízes (mL), biomassa fresca e seca das raízes em plantas de *Physalis pubescens* L. propagadas por diferentes métodos e substratos. UTFPR, Campus Pato Branco, 2011. ....**37**

**Tabela 06** – Resultados da cromatografia em camada delgada quanto a presença ou ausência de metabólitos secundários no extrato das folhas de *P. pubescens*.....**66**

## SÚMARIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>14</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>16</b>
2.1 Objetivo geral .....	16
2.2 Objetivos específicos.....	16
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>17</b>
<b>3.1 FAMÍLIA SOLANACEAE</b> .....	<b>17</b>
3.1.1 Gênero <i>Physalis</i> .....	17
3.1.1.1 Caracterização da espécie <i>Physalis pubescens</i> L.....	18
<b>3.2 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS</b> .....	<b>19</b>
3.2.1 Metabólitos secundários presentes no gênero <i>Physalis</i> .....	21
<b>3.3 TIPOS DE PROPAGAÇÃO</b> .....	<b>23</b>
3.3.1 Estaquia .....	23
3.3.2 Propagação por sementes .....	24
3.3.3 Cultivo em substratos .....	25
<b>CAPITULO 01 ASPECTOS AGRONÔMICOS DE PLANTAS DE <i>Physalis pubescens</i> L. PROPAGADAS POR DIFERENTES MÉTODOS E SUBSTRATOS</b>	
<b>RESUMO</b> .....	<b>27</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>28</b>
<b>4 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>29</b>
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>31</b>
<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>33</b>
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	<b>41</b>
<b>8 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>42</b>
<b>CAPITULO 02 ASPECTOS ANATÔMICOS DE PLANTAS DE <i>Physalis pubescens</i> L.</b>	
<b>RESUMO</b> .....	<b>43</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>44</b>
<b>9 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>45</b>
<b>10 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>46</b>
10.1 Coleta, identificação e preparo do material botânico.....	46

<b>11 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>47</b>
<b>12 CONCLUSÕES .....</b>	<b>53</b>
<b>13 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>54</b>
<b>CAPITULO 03. PERFIL FITOQUÍMICO DE PLANTAS DE <i>Physalis pubescens</i> L.</b>	
<b>RESUMO.....</b>	<b>55</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>56</b>
<b>14 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>57</b>
<b>15 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>59</b>
<b>15.1 Separação dos compostos de <i>P. pubescens</i> por cromatografia em coluna.....</b>	<b>59</b>
<b>15.1.1 Material vegetal .....</b>	<b>59</b>
<b>15.1.2 Processo de extração e separação dos compostos .....</b>	<b>59</b>
<b>15.1.3 Detecção dos compostos por cromatografia em camada delgada (TLC).....</b>	<b>60</b>
<b>15.2 Identificação de compostos produzidos por <i>P. pubescens</i> através de ressonância magnética nuclear de prótons (RMN <sup>1</sup>H).....</b>	<b>63</b>
<b>15.3 Identificação de compostos produzidos por <i>P. pubescens</i> através de cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas .....</b>	<b>63</b>
<b>15.3.1 Material vegetal .....</b>	<b>63</b>
<b>15.3.2 Processo de extração.....</b>	<b>63</b>
<b>15.3.3 Preparo das amostras para injeção no CG/EM .....</b>	<b>64</b>
<b>16 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>65</b>
<b>16.1 Avaliação da presença de compostos do metabolismo secundário de <i>P. pubescens</i> por cromatografia em camada delgada (TLC).....</b>	<b>65</b>
<b>16.2 Identificação dos compostos produzidos por <i>P. pubescens</i> através de RMN <sup>1</sup>H. ....</b>	<b>73</b>
<b>16.3 Identificação dos compostos produzidos por <i>P. pubescens</i> através de CG/EM</b>	<b>74</b>
<b>17 CONCLUSÕES .....</b>	<b>77</b>
<b>18 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>78</b>
<b>19 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>79</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Trabalhos visando à domesticação de plantas medicinais e pequenos frutos são escassos ou quase inexistentes para a maioria das espécies, o que tem tornado necessário o desenvolvimento de estudos relacionados à adaptação destas plantas às condições de cultivo, principalmente em virtude do aumento da demanda por parte das indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética (COSTA et al., 2007).

Com base nestes aspectos, recentemente, tem-se intensificado as pesquisas relacionadas aos métodos de propagação vegetativa de plantas medicinais, os quais buscam verificar os melhores tipos e comprimentos de estaca, quais os efeitos do uso de reguladores de crescimento e de diferentes substratos sobre o desenvolvimento e enraizamento das plantas (COSTA et al., 2007).

Mesmo que a planta responda bem à propagação por via sexuada, a propagação vegetativa possui inúmeras vantagens por ser uma técnica simples, rápida, barata e, além disso, possibilita a produção de um número considerável de mudas em um curto espaço de tempo, condicionando as plantas à maior uniformidade (HARTMANN; KESTER, 2002). Este tipo de propagação também é uma importante ferramenta no melhoramento de espécies lenhosas e herbáceas, de interesse econômico e medicinal, por fazer com que as plantas mantenham as características genéticas da planta matriz (EHLERT et al., 2004).

Evolutivamente e em decorrência da pressão genética e ambiental a que foram submetidas durante as diferentes eras geológicas, as plantas foram induzidas a sintetizar diferentes categorias de compostos, entre as quais alcalóides, compostos fenólicos e terpenos. Estes produtos também chamados de metabólitos secundários, foram, por décadas, considerados como resíduos dos produtos fotossintéticos e respiratórios, sem utilidade específica na planta (MONTEIRO et al., 2005).

Hoje, porém, sabe-se que estes compostos exercem diferentes funções na planta, estando em sua grande maioria relacionados à atração de polinizadores e/ou repelência de insetos fitófagos (MONTEIRO et al., 2005). Além destas funções, os metabólitos secundários servem, ainda, como fonte primária para a produção de muitos fitofármacos e até mesmo como esqueleto estrutural para a formação de novas moléculas sintéticas, caráter este que associado ao impacto da crescente resistência dos microrganismos a antibióticos e substâncias específicas,

intensificaram os investimentos na pesquisa e no desenvolvimento de novas drogas capazes de combater as estratégias de adaptação que esses organismos elaboram (PRATES et al., 2000).

Em relação a estes aspectos, pesquisas recentes com plantas do gênero *Physalis* têm demonstrado que estas possuem elevada capacidade de sintetizar diferentes classes de biomoléculas, principalmente fisalinas (seu princípio ativo) (TOMASSINI et al., 2000), porém, os estudos sobre aspectos como a morfologia e anatomia, propagação, adaptação a diferentes regiões e sua associação com a produção de compostos ativos em plantas de *P. pubescens* ainda são limitados.

Portanto, como boa parte das plantas com interesse medicinal ainda são coletadas em seu habitat natural e não são suficientes para atender uma demanda crescente, principalmente quando a espécie possui características multiusos, a única alternativa de dissolução deste quadro pode estar na busca por novos sistemas de cultivo e manejo, que maximizem a obtenção das referidas biomoléculas, de forma homogênea e mais eficaz, e que garantam uma produção regular, sustentável e em larga escala.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivos comparar diferentes métodos de propagação e substratos no cultivo de *Physalis pubescens* L., detectar a presença de compostos de interesse do metabolismo secundário e descrever anatomicamente suas principais estruturas.

### 2.2 Objetivos específicos

- i) Avaliar a possível interação entre métodos de propagação e substratos no acúmulo de biomassa, enraizamento e desenvolvimento de mudas de *P. pubescens* L.;
- ii) Descrever anatomicamente as estruturas vegetativas e reprodutivas de *P. pubescens* L.
- iii) Separar, detectar e identificar os principais compostos do metabolismo secundário da planta;

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 FAMÍLIA SOLANACEAE

A família Solanaceae, uma das maiores e mais bem distribuídas famílias dentro do grupo das angiospermas, possui em torno de 3000 a 4000 espécies, subdivididas em 96 gêneros, muitos dos quais são endêmicos de determinadas regiões do mundo (STEHMANN; MENTZ, 2006; BALKEN, 2009).

Por ser subcosmopolita, os membros desta família têm distribuição mundial, exceto para o Continente Antártico. A maior riqueza taxonômica se dá em regiões tropicais da América Latina, onde cerca de 40 a 50 gêneros são endêmicos (HUNZIKER, 2001; ENCYCLOPAÉDIA BRITÂNICA, 2009).

No Brasil ocorrem cerca de 28 gêneros e 450 espécies nativas, o que representa quase 40% da riqueza da família (STEHMANN; MENTZ, 2006). Muitas espécies são cultivadas economicamente como fonte alimentar como, por exemplo, *Lycopersicon esculentum* L., *Solanum tuberosum* L., *Solanum melongena* L. e *Capsicum* sp.; outras são cultivadas como plantas ornamentais, entre as quais *Browallia*, *Brunfelsia*, *Cestrum*, *Datura*, *Nicotina*, *Salpiglossis*, *Solanum*, *Solandra*. Além disso, há espécies cultivadas com interesse medicinal como *Atropa belladonna* L., *Datura* sp., *Nicotiana* sp. (BALKEN, 2009).

##### 3.1.1 Gênero *Physalis*

O gênero *Physalis* (Solanaceae), constituído por espécies de caráter herbáceo arbustivo, inclui cerca de 90 a 120 espécies, as quais se encontram espalhadas por vários continentes do mundo, principalmente em regiões tropicais e subtropicais (TOMASSINI et al., 2000; DAMU et al., 2007).

Com origem no idioma grego, o nome *Physalis* vem da palavra “phusa” que significa bolha ou bexiga e tem relação direta com o cálice que encerra seus frutos, que na maioria das espécies são comestíveis (TOMASSINI et al., 2000).

Formado por espécies de reputado valor etnobotânico, nutracêutico e medicinal (MAGALHAES, 2005), as plantas deste grupo são utilizadas para diversos fins, entre eles se destacam a utilização dos frutos de *P. philadelphica*, *P. peruviana*,

*P. grisea*, *P. chenopodifolia*, *P. coztomatl* e *P. angulata* como fonte alimentar (DAMU et al., 2007).

A principal característica do grupo é a produção de esteróides denominados vitaesteróides (vitanólidos, vitafisalinas, acnistinas, ixocarpalactonas, perulactonas e fisalinas), os quais são originados a partir da via do ácido mevalônico e possuem grande interesse farmacológico; dentro do gênero, várias são as espécies produtoras destas substâncias, com destaque para *P. alkekengi*, *P. alkekengi* var. *franchetii*, *P. angulata*, *P. ixocarpa*, *P. lanifolia*, *P. mínima*, *P. peruviana*, *P. phyladelphia*, *P. pubescens*, *P. viscosa* (TOMASSINI et al., 2000).

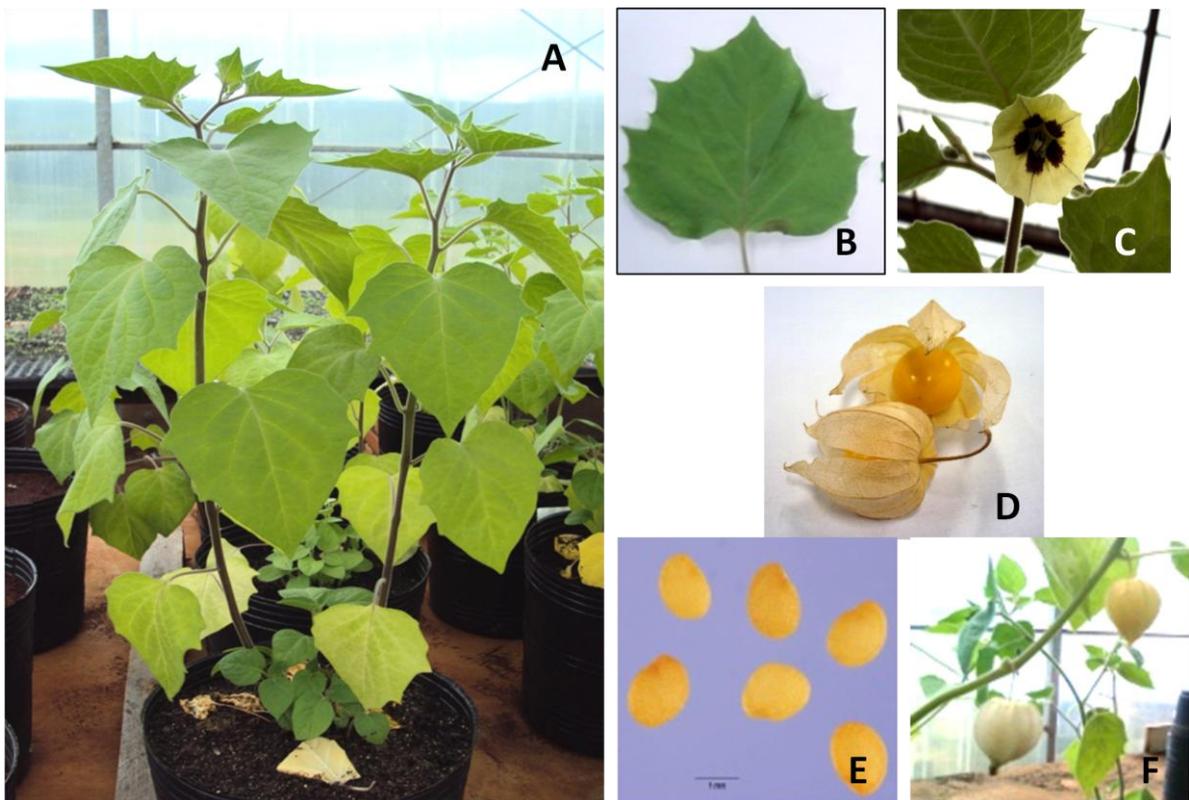
### 3.1.1.1 Caracterização da espécie *Physalis pubescens* L.

*Physalis pubescens* L., assim como os demais exemplares do gênero, é conhecida popularmente como fisalis, joá-de-capote, saco-de-bode, camapu, curuputi, mata-fome, bucho-de-rã; “uchuva” (na Colômbia); “hosuki” (no Japão) e “tomatillo” (na Espanha) (FREITAS et al., 2006). Considerada como erva daninha *P. pubescens* L. é uma planta nativa, com distribuição quase que irrestrita em todo o Brasil, principalmente nas regiões Norte e Nordeste, onde ocorre naturalmente (LORENZI; MATOS, 2002; SANTOS et al., 2003). Seus frutos, raízes, caules e folhas são utilizados na medicina tradicional, principalmente como antipiréticos, diuréticos, antitumorais, analgésicos e antiinflamatórios (CHEN et al., 1990; CHIANG et al., 1992).

É uma planta de caráter herbáceo, arbustivo, anual, que pode atingir até 2m de altura se devidamente tutorada (Fotografia 01A). Seus ramos são verdes, angulosos e hialinos com a presença de tricomas glandulares e eglandulares distribuídos por toda a superfície da planta. As folhas (Fotografia 01B) podem variar de diâmetro, são isoladas, de aspecto membranáceo, com bordas recortadas, pubescentes ao longo das nervuras, com grande quantidade de tricomas (CARVALHO; BOVINI, 2006).

Suas flores (Fotografia 01C) são pequenas, axilares e hermafroditas; a coloração das pétalas vai do amarelo à palha, com manchas de cor castanha na base (CARVALHO; BOVINI, 2006). O fruto maduro (Fotografia 01D) é uma baga globosa, alaranjada, de aspecto macio e suculento, com sabor doce, levemente ácido o qual possui cerca de 2 cm de diâmetro e uma grande quantidade de

sementes (Fotografia 01E). Todos os frutos são recobertos pelo cálice inflado (Fotografia 01F), uma capa esverdeada que depois passa a amarelada e finalmente, a palha, com textura de papel, ponto ideal para a coleta dos mesmos (CARVALHO; BOVINI, 2006; FREITAS et al., 2006).



**Fotografia 01** – Aspectos morfológicos de *Physalis pubescens* L., onde (A) Planta em estágio vegetativo; (B) folhas; (C) flores; (D) frutos; (E) sementes e (F) cálice inflado que envolve o fruto. UTFPR, Campus Pato Branco, 2011. Fonte: Douglas Alvarez Alamino.

### 3.2 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Entende-se por metabólitos secundários compostos químicos com estrutura molecular complexa, os quais exercem funções específicas na planta e encontram-se distribuídos limitadamente em diferentes grupos taxonômicos, dentro do reino vegetal. Geralmente, não estão associados ao crescimento direto dos vegetais, mas contribuem significativamente para que o mesmo ocorra (RAVEN et al., 2001; BESSA et al., 2009).

Considerados por muito tempo como resíduo ou lixo metabólico, os metabólitos secundários vegetais passaram por um longo período de incompreensão, pois muitos pesquisadores não conseguiam interligar a ação e/ou função destes compostos com os processos habitualmente realizados pelas plantas, o que acabou gerando um grande desconhecimento sobre sua importância adaptativa e ecológica (TAIZ; ZEIGER, 2004; NICIOLI, 2006). Este quadro só foi revertido devido à intensa pesquisa e interesse gerados por esses compostos. Sabe-se, hoje, que os metabólitos secundários são de suma importância para a sobrevivência e reprodução dos vegetais, já que podem estar relacionados tanto a respostas contra ferimentos, ataque de herbívoros e microrganismos, quanto à atração de polinizadores e de microrganismos (como bactérias fixadoras de nitrogênio em leguminosas) (FUMAGALI et al., 2008).

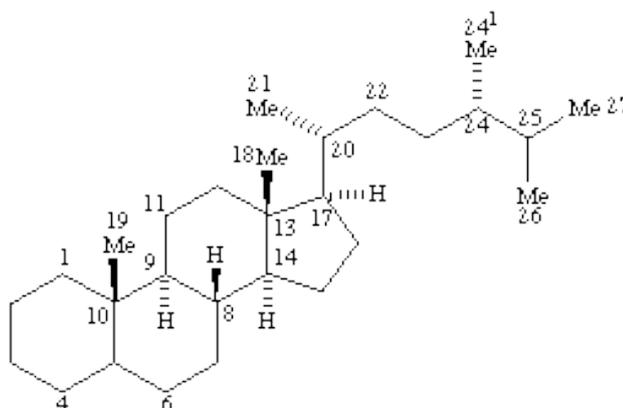
A produção dos compostos secundários é sensível a vários fatores ambientais, tais como temperatura, umidade, fotoperíodo, fertilidade do solo, competição com outros vegetais, com animais e microrganismos (NICIOLI, 2006). São classificados em grupos específicos de acordo com a sua via biossintética de origem (BALBUENA, 2006), sendo que os principais são os terpenos, biossintetizados a partir de duas rotas distintas (rota do ácido mevalônico e do metileritritol fosfato), derivados da união de unidades pentacarbonadas que apresentam um esqueleto ramificado de isopentano, sendo muitas vezes chamados de unidades isoprênicas (HOPKINS; HUNER, 2004; KERBAUY, 2004; TAIZ; ZEIGER, 2004); compostos fenólicos biossintetizados a partir de produtos da rota do ácido chiquímico, os quais desempenham inúmeros papéis importantes para as plantas, entre os quais o fortalecimento das paredes celulares (lignina), proteção contra a radiação ultravioleta e como atrativo para polinizadores e dispersores de sementes (flavonóides), adstringência de frutos e/ou produtos (taninos), que isoladamente ou em conjunto proporcionam defesa contra herbívoros e patógenos (HOPKINS; HUNER, 2004; KERBAUY, 2004; TAIZ; ZEIGER, 2004); e compostos nitrogenados, biossintetizados a partir de aminoácidos comuns ou aromáticos, com a presença de um átomo de nitrogênio na molécula, considerados de grande interesse devido ao seu efeito tóxico para seres humanos e suas propriedades medicinais. Seus representantes mais comuns são os alcalóides produzidos pelos vegetais, com o seu acúmulo relacionado à defesa contra predadores,

principalmente mamíferos, em função de sua alta toxicidade e capacidade de deterrência (HOPKINS; HUNER, 2004; KERBAUY, 2004; TAIZ; ZEIGER, 2004).

### 3.2.1 Metabólitos secundários presentes no gênero *Physalis*

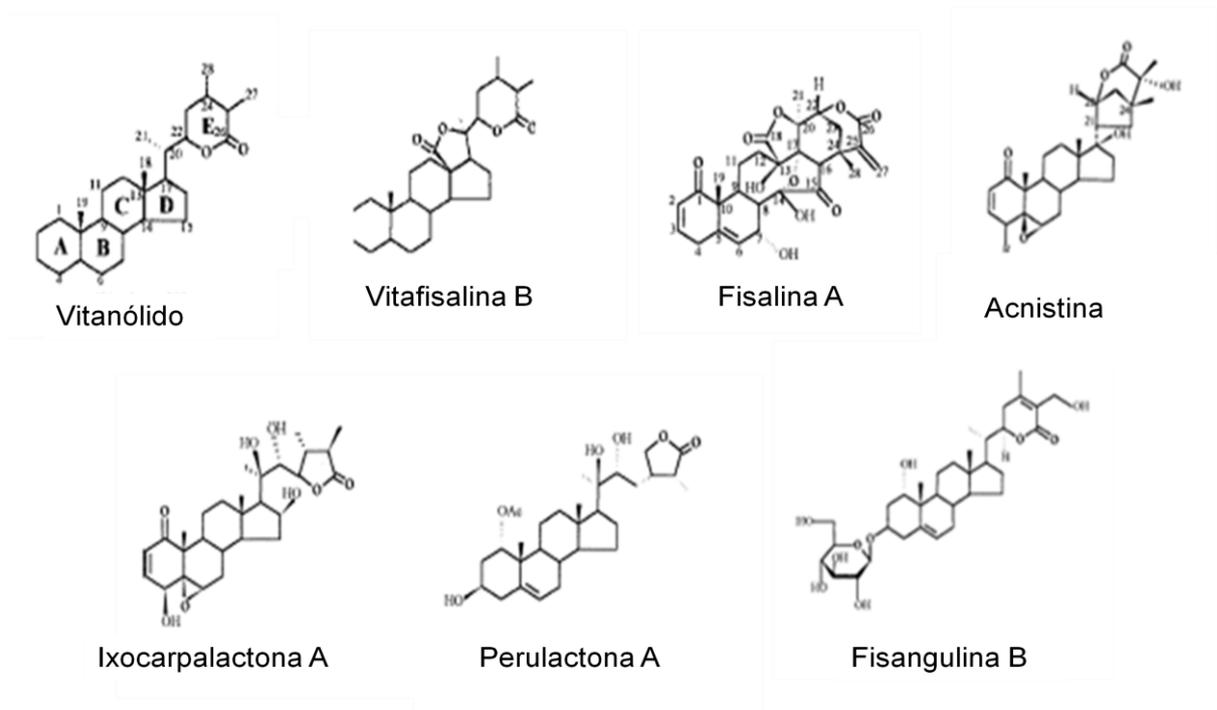
Estudos químicos com exemplares do gênero *Physalis* apontaram a existência de várias classes de compostos ativos que ocorrem naturalmente, incluindo flavonóides (3-*o*-neoesparidosedio-mirecitina); alcalóides (acetil colina, figrina; higrina; ornitina; tigloidina; *N*-Metilpirrolidinaligrina em folhas de *P. peruviana*; calisteginas em diferentes estruturas de *P. alkekengi* L. var. *francheti*, *P. philadelphica* Lam. , *P. ixocarpa* Brot e *P. peruviana* L.); triterpenóides ( $\beta$ -amirina em sementes de *P. alkekengi* L.); ceramidas (1,3,4-trihidroxi-2-2'-hidroxitetracosanoilamino-9-octadecano em folhas e estames de *P. philadelphica*); fenilpropanóides (ácido clorogênico); inúmeras classes de ácidos graxos nas sementes e muitos tipos diferentes de esteróides (fitoequidizonas, além dos vitaesteróides) alguns dos quais sem precedentes (SU et al., 2002; EICH, 2008; QIU et al., 2008).

Entre todos os grupos de compostos citados, o que desperta maior interesse devido às suas propriedades farmacológicas são os vitaesteróides, uma classe de substâncias bioativas caracterizadas como lactonas esteroidais que reproduzem o esqueleto intacto do ergostano (Figura 01), sendo, em sua grande maioria, polioxigenados (TOMASSINI et al., 2000).



**Figura 01** – Estrutura química do ergostano.

Por possuírem função lactônica no carbono 26, os vitaesteróides têm a capacidade de gerar uma grande variedade de estruturas, as quais são subdivididas em oito grupos principais, sendo eles os vitanólidos, vitanólidos "modificados" (anéis A ou D aromatizados), vitafisalinas, acnistinas, ixocarpalactonas, perulactonas e fisalinas (Figura 02) (TOMASSINI et al., 2000).



**Figura 02** – Estruturas químicas dos principais grupos de vitaesteróides encontrados no gênero *Physalis*. Fonte: TOMASSINI et al., (2000).

As classes de vitaesteróides estão presentes de forma mais expressiva em espécies pertencentes à família Solanaceae, porém, podem ocorrer em menor frequência nas famílias Fabaceae e Taccaceae (TOMASSINI et al., 2000; VERAS et al., 2004; MAGALHÃES, 2005).

No caso de *P. pubescens*, além de elaborarem em sua biogênese os vitanólidos e vitafisalinas, esta espécie também sintetiza algumas classes de fisalinas, as quais são definidas quimicamente como lactonas sesquiterpênicas esteroidais, com estrutura bastante complexa, já que apresentam uma  $\gamma$  lactona, além da lactona original da cadeia. Estas moléculas têm sido alvos de várias pesquisas no campo da medicina, demonstrando resultados promissores como

imunoestimulantes, com atividade citotóxica para vários tipos de células cancerígenas e leucêmicas, além de possuírem propriedades antimicrobianas (TOMASSINI et al., 2000; PÉREZ-CASTORENA et al., 2004; MAGALHÃES, 2005; TAYLOR, 2009).

### **3.3 TIPOS DE PROPAGAÇÃO**

#### **3.3.1 Estaquia**

Considerada como uma via de reprodução assexuada, a estaquia é um dos processos de propagação mais utilizados no campo de fruticultura e de plantas ornamentais, devido à facilidade de execução e rápida resposta das plantas (KAMPF, 2005).

Entre muitas características, a produção de plantas a partir de estacas permite a multiplicação de progênes idênticas à planta da qual se obteve o material vegetal, possibilitando consideráveis e rápidos ganhos genéticos nos programas de melhoramento. Além disso, ajuda a manter uniformes os caracteres genotípicos e fenotípicos dentro de uma determinada população (altura, taxa de crescimento, época de floração e colheita, entre outras) e diminui o tempo para início da produção (HARTMANN et al., 2002; FACHINELLO et al., 2005).

Como esta técnica dispensa a etapa sexual, a estaquia passa a ser dependente da capacidade de adaptação e enraizamento de cada espécie, já que as respostas à estaquia, dentro de um mesmo grupo, podem diferir entre as cultivares (COSTA; COSTA, 2003). Em relação aos complexos aspectos que agem sobre o enraizamento de estacas, destacam-se o manejo das plantas-matrizes, relacionado ao rejuvenescimento das plantas, além de fatores internos como a concentração de fitorreguladores (neste caso auxinas), e externos, como disponibilidade de água, temperatura, luz, teor de carboidratos disponíveis, relação C/N, anelamento de caules, tipo de estaca e período de coleta (RODRIGUES, 1996; MARTINS, 1998). Além desses aspectos, é outro fator importante a predisposição genética ao enraizamento, que pode variar entre e dentro das espécies.

Segundo Hartmann et al. (2002), em geral, as raízes adventícias, formadas em estacas, têm origem em células vizinhas ao câmbio e ao floema. Isto ocorre

porque, geralmente, células parenquimáticas, devido sua totipotencialidade e por conta de estímulos internos e externos, diferenciam-se em meristemas radiculares, dando início à formação das raízes.

Em relação ao tipo de estaca, Hartmann et al. (2002) sugerem a caulinar como sendo a mais importante, podendo esta ser subdividida em quatro grupos de acordo com a natureza do lenho: estacas lenhosas (apresentam tecidos endurecidos), herbáceas (apresentam tecidos tenros), semilenhosas e semi-herbáceas (apresentam-se num estágio intermediário entre os dois extremos). De acordo com Hoppe e Brun (2004) as estacas herbáceas de plantas lenhosas, geralmente, enraízam com maior facilidade do que estacas lenhosas, porém, apresentam o inconveniente de exibirem baixa resistência à desidratação.

Aliados ao tipo de estaca estão os substratos, os quais exercem efeito direto sobre o enraizamento e devem ser considerados como parte fundamental em qualquer sistema de propagação. De acordo com Hartmann et al. (2002), o bom substrato combina boa aeração com alta capacidade de retenção de água, boa drenagem e ausência de contaminantes. A presença de folhas nas estacas também é um aspecto importante, já que assim como os meristemas apicais, são responsáveis pela síntese e translocação de auxinas e cofatores de enraizamento (WOODWARD; BARTEL, 2005).

### **3.3.2 Propagação por sementes**

A propagação por via seminífera pode ser definida como a forma natural pela qual as plantas se reproduzem em seu ambiente de origem ou em ambiente artificial através de ações antrópicas. Como esta é uma técnica sexuada, é dependente da utilização de sementes (KAMPF, 2005).

Ao se propagar espécies de forma gâmica, as quais possuam alguma propriedade de interesse, muito raramente se obtêm descendentes com características idênticas à planta da qual foram originados, porém, a técnica é de grande importância, pois devido às variações a que as espécies podem estar expostas, às vezes, acabam surgindo plantas com características especiais, como frutos de maior tamanho ou aumento na produção de compostos bioativos, as quais

poderão ser perpetuadas através da seleção desta espécie e sua propagação por técnicas assexuadas (LORENZI et al., 2006).

Para que seja bem sucedida, a propagação através de sementes é interdependente do processo germinativo, o qual envolve várias etapas, as quais são afetadas por uma série de condições intrínsecas e extrínsecas, dentre as quais umidade, temperatura, luz e oxigênio, que em conjunto, são essenciais para que o processo se realize normalmente. A possível ausência de qualquer um destes fatores poderá vir a intervir na germinação das mesmas (OLIVEIRA et al., 2005).

Por ser uma das técnicas mais acessíveis e de fácil execução, a propagação por via sexuada é vantajosa por estimular a variabilidade genética das espécies, sendo, portanto, amplamente utilizada em vários campos das ciências agrônômicas, seja para a produção de grãos de importância econômica, ou mudas e porta enxertos de fruteiras e ornamentais.

### **3.3.3 Cultivo em substratos**

Independente do método de propagação adotado, a primeira etapa de produção tende a ser o desenvolvimento de mudas, das quais dependerá a produção, seja a campo ou em vasos, como é o caso de boa parte das plantas ornamentais de pequeno porte, algumas olerícolas e frutíferas. Para que este processo inicial seja satisfeito, muitas vezes se faz necessário o uso de materiais alternativos ao solo, seja por exigências de ordem física ou fisiológica das plantas, sendo nestes casos utilizados os substratos (FERNANDES; CORÁ, 2001).

Por possuírem comportamento singular, quando condicionados a um espaço limitado (no caso de vasos, tubetes e sacos de polietileno), os substratos, assim como o solo, também influenciam na arquitetura do sistema radicular e nas associações biológicas das plântulas com o meio, estando prioritariamente relacionados à nutrição e translocação de água no sistema planta-atmosfera (MACIEL, 2000).

Como não existe um material que satisfaça todas as condições para o ótimo crescimento e desenvolvimento das plantas (SOUZA et al., 1995) a escolha do(s) material(is) para compor um substrato deve levar em consideração as características físicas e químicas, como por exemplo, densidade, capacidade de economia hídrica,

aeração, permeabilidade, poder de tamponamento, capacidade de retenção de nutrientes (FERREIRA et al., 2005; KAMPF, 2005), a espécie a ser cultivada, além dos aspectos econômicos, como baixo custo e disponibilidade (FONSECA, 2001).

Muitas vezes, para atender a todos os aspectos citados anteriormente se faz necessária a utilização de mais de um material para compor um substrato de boa qualidade. Atualmente, é grande a variedade de materiais empregados para tal fim, os quais vão desde os de origem mineral, orgânica e natural até os sintéticos (SCHIMITZ et al., 2002), sendo o esfagno, a turfa, a vermiculita, a areia, cascas, bagaços, serragem entre outros, os mais utilizados (FERRAZ et al., 2005).

Ao mesmo tempo em que os materiais são utilizados em combinações entre si, Negreiros et al. (2004) apontam para a conveniência da associação destes materiais, em diferentes proporções com o solo, o que melhoraria a textura do substrato, além de proporcionar boas condições físicas e nutricionais necessárias ao desenvolvimento das raízes e da muda.

## CAPITULO 01 ASPECTOS AGRONÔMICOS DE PLANTAS DE *Physalis pubescens* L. PROPAGADAS POR DIFERENTES MÉTODOS E SUBSTRATOS

### RESUMO

ALAMINO, Douglas Alvarez. Características agronômicas de fisalis (*Physalis pubescens* L.) produzidas por diferentes métodos e substratos e aspectos anatômicos e fitoquímicos. 2011. 89 f. - Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2011.

O presente ensaio teve por objetivo avaliar a relação entre métodos de propagação e tipo de substrato no desenvolvimento de plantas de *Physalis pubescens* L.; para tanto foram avaliadas plantas produzidas a partir de sementes e estacas herbáceas. Como substratos foram empregados os seguintes tratamentos: (SA) Solo + areia; (SV) Solo + vermiculita; (SP) Solo + Plantmax®; (SAV); Solo + areia + vermiculita e (S) Solo. As seguintes variáveis foram analisadas: comprimento da parte aérea e da maior raiz; área foliar; massas fresca e seca das folhas, caules e raízes; volume radicular. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em um esquema fatorial de 2x5, com 10 repetições por tratamento. Observou-se interação significativa entre os fatores para massa fresca e seca dos caules, com destaque para o método estaquia e os substratos SA, SP e S. Para o comprimento da parte aérea e da maior raiz, a propagação por estaquia foi superior à via seminífera, ao contrário da área foliar, massas fresca e seca de folhas e raízes, que não apresentaram esta diferença. Quanto aos substratos, não houve diferença significativa para nenhuma das variáveis citadas anteriormente. Portanto, conclui-se que a utilização da estaquia, somada a qualquer um dos substratos empregados, em condições controladas, é mais eficiente na produção de mudas se comparada a produção por sementes.

**Palavras – chave:** cultivo em vaso; estaquia; fisalis; sementes.

## ABSTRACT

ALAMINO, Douglas Alvarez. Agronomic characteristics of physalis (*Physalis pubescens* L.) produced by different methods and substrates and anatomical and phytochemical aspects. 2011. 89 f. - Dissertation (Master in Agronomy) - Graduate Program in Agronomy, Federal Technological University of Paraná. Pato Branco, 2011.

This test was to evaluate the relationship between propagation method and substrate type on plant growth of *Physalis pubescens* L., were evaluated for both plants produced from seeds and cuttings. The substrates were used the following treatments: (SA) Soil + sand; (SV) Soil + vermiculite, (SP) Soil + Plantmax, (SAV) Soil + sand + vermiculite and (S) Soil. The following variables were analyzed: length of shoot and main root, leaf area, fresh and dry weight of leaves, stems and roots, root volume. The experimental design was completely randomized in a factorial scheme 2x5, with 10 replicates per treatment. We observed significant interaction between the factors for fresh and dry weight of stems, especially the cutting method and substrates SA, SP and S. For shoot length and main root, the propagation by cuttings was higher than that via seminiferous instead of leaf area, fresh and dried leaves and roots, which did not show this difference. As for substrates, no significant differences in any of the variables mentioned above. Therefore, we conclude that the use of cutting, plus any one of the substrates used in controlled conditions, it is more efficient in the production of seedlings as compared to production by seeds.

**Key - words:** cultivation in pots; cuttings; seeds; winter cherry.

## 4 INTRODUÇÃO

A produção de espécies medicinais e pequenas frutas, de modo geral, tem se mostrado uma excelente alternativa ao desenvolvimento econômico das pequenas propriedades, caracterizando-se como uma atividade com baixo custo de implantação e manutenção, boa adaptação às condições socioeconômicas e ambientais, com possibilidades de ser desenvolvida através de cultivo orgânico (SCHNEIDER et al., 2007).

Visando suprir demandas de mercado, muitos produtores têm optado pela produção de uma ampla variedade de espécies, muitas das quais ainda desconhecidas pela grande maioria dos consumidores. Dentre as “novas” espécies cultivadas, estão as do gênero *Physalis*, com destaque para *Physalis peruviana* e em menor proporção *P.angulata* e *P. pubescens* (RUFATO et al., 2008).

A propagação das espécies citadas anteriormente se dá, em sua maior parte, através da via sexuada, já que estas possuem um elevado percentual de germinação (85-90%), porém, este não é o único método empregado, já que muitas plantas são propagadas por estaquia e cultura de tecidos, sendo este último método utilizado em menor proporção devido a seu alto custo de implantação, inviável ao para o pequeno produtor (RUFATO et al., 2008).

O solo não é o único substrato utilizado na propagação, seja ela sexuada ou assexuada, em ambientes protegidos (estufas ou casa de vegetação). Substratos orgânicos e/ou sintéticos utilizados isoladamente ou em combinação, principalmente com solo, podem significar a obtenção de mudas em número e grau de sanidade elevados (FERNANDES; CORÁ, 2001).

Diferentemente do solo, boa parte dos materiais possibilitam o manejo adequado da água, evitando a umidade excessiva em torno das raízes e o conseqüente aparecimento de doenças de origem fúngica e/ou bacteriana, além de manter teores adequados de oxigênio para a manutenção destas estruturas (FERNANDES; CORÁ, 2001). Como não existe uma combinação universal ou específica ao desenvolvimento de todas as espécies vegetais, é prudente que sejam feitos testes com diferentes matérias, visando identificar o substrato ou a combinação de materiais que satisfaçam com maior eficiência os requisitos fisiológicos e nutricionais de fisalis sem, no entanto, inviabilizar o processo a pequenos produtores.

Portanto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência de diferentes métodos de propagação e substratos no acúmulo de biomassa, enraizamento e desenvolvimento de mudas de *fisalis*.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em casa de vegetação localizada no Centro de Biotecnologia Agroindustrial do Paraná – CENBAPAR na Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *Campus Pato Branco* (26°11' S, 52°36' W), entre outubro de 2009 e fevereiro de 2010.

As estacas herbáceas de *fisalis* foram obtidas a partir da porção mediana de plantas matrizes com aproximadamente um ano de idade, cultivadas no horto medicinal da UTFPR, livres de injúrias (as sementes também foram retiradas dos frutos produzidas por estas). O preparo do material vegetal consistiu em um corte na base, em bisel, próximo a uma gema, ficando a estaca com aproximadamente 15 cm. Foi realizada, também, a retirada das folhas remanescentes, deixando-se somente o primeiro e segundo pares de folhas, as quais foram seccionadas ao meio visando, assim, reduzir a superfície transpiratória.

Os substratos utilizados foram: SA (Solo do tipo latossolo vermelho + areia lavada / 1:1 v/v); SV (Solo + vermiculita de granulometria média / 1:1 v/v); SP (Solo + Plantmax® / 1:1 v/v); SAV (Solo + areia + vermiculita / 1:1:1 v/v); S (Solo). Na Tabela 01 é apresentada a análise química dos respectivos substratos.

**Tabela 01** – Análise química dos substratos. UTFPR, Campus Pato Branco, 2011.

Substratos*	Matéria orgânica						Saturação de bases	pH
	g.dm <sup>-3</sup>	P -- mg.dm <sup>-3</sup> --	K <sup>+</sup>	Al <sup>+3</sup>	Ca <sup>+2</sup>	Mg <sup>+2</sup>	%	
				----- cmol <sub>c</sub> .dm <sup>-3</sup> -----				CaCl <sub>2</sub>
SA	30,82	5,36	84,06	0,33	3,54	1,74	44,7	4,5
SV	33,50	24,4	211,14	0,07	5,47	6,51	71,0	5,6
SP	87,11	53,51	220,91	0,07	11,92	5,26	66,0	5,0
SAV	34,17	18,23	147,27	0,22	3,93	4,49	60,1	4,9
S	60,31	4,83	148,58	0,15	6,22	3,04	50,9	4,7

\* SA (Solo + areia); SV (Solo + vermiculita); SP (Solo + Plantmax®); SAV (Solo + areia + vermiculita); S (Solo).

Os substratos foram acondicionados em vasos de polipropileno preto com capacidade para 5 L. As mudas originadas de sementes foram produzidas em bandeja alveolada de isopor com 58 células, contendo Plantmax, em casa de

vegetação e ao atingirem cerca de 10 cm foram transplantadas para os vasos contendo os respectivos tratamentos. As estacas, sem nenhum tipo de tratamento hormonal, foram colocadas nos vasos, com cerca de 1/3 de seu comprimento coberto pelo substrato.

Os vasos foram mantidos em condições de casa de vegetação acrílica, sem sombreamento, com temperatura controlada ( $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ ). A irrigação foi realizada através de nebulização intermitente nos primeiros 30 dias. Após este período, a irrigação passou a ser realizada uma vez por dia, e do 60º dia até o final do experimento, além da nebulização foi realizada rega manual com 100 mL de água por vaso, devido ao grande diâmetro das folhas que escoavam a água e não permitiam que a mesma entrasse em contato com os substratos.

Decorridos 30 dias da implantação do experimento, a altura das plantas passou a ser mensurada quinzenalmente. Aos 60 dias do transplante e estaquia, realizou-se adubação orgânica com a incorporação de 100 g de húmus de minhoca por vaso. Além disso, deu-se início ao tutoramento das mudas com estacas de madeira. Não foram realizados tratamentos fitossanitários nas plantas durante o experimento a não ser a retirada manual de plantas daninhas.

Aos 120 dias após o início do experimento, foram avaliados os seguintes parâmetros: área foliar ( $\text{cm}^2 \text{ planta}^{-1}$ ); biomassa fresca e seca (g) das folhas, caules e raízes; comprimento (cm) da maior raiz e volume (mL) radicular, calculado como sendo o volume de água removido pela imersão das raízes em proveta graduada com 2 L de água em seu interior. A massa seca das folhas, caules e raízes foi obtida pela secagem, em estufa com circulação de ar, a temperatura de  $60^{\circ}\text{C}$ , até massa constante.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em um esquema fatorial de  $2 \times 5$ , sendo 2 métodos de propagação e 5 substratos, com 10 repetições por tratamento. Todos os dados coletados foram transformados em arco-seno  $\sqrt{x/100}$  e submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de significância, através do aplicativo ASSISTAT 7.5 Beta (Silva, 2010). Para melhor apresentação, as médias das variáveis transformadas foram reconvertidas e apresentadas na escala original.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

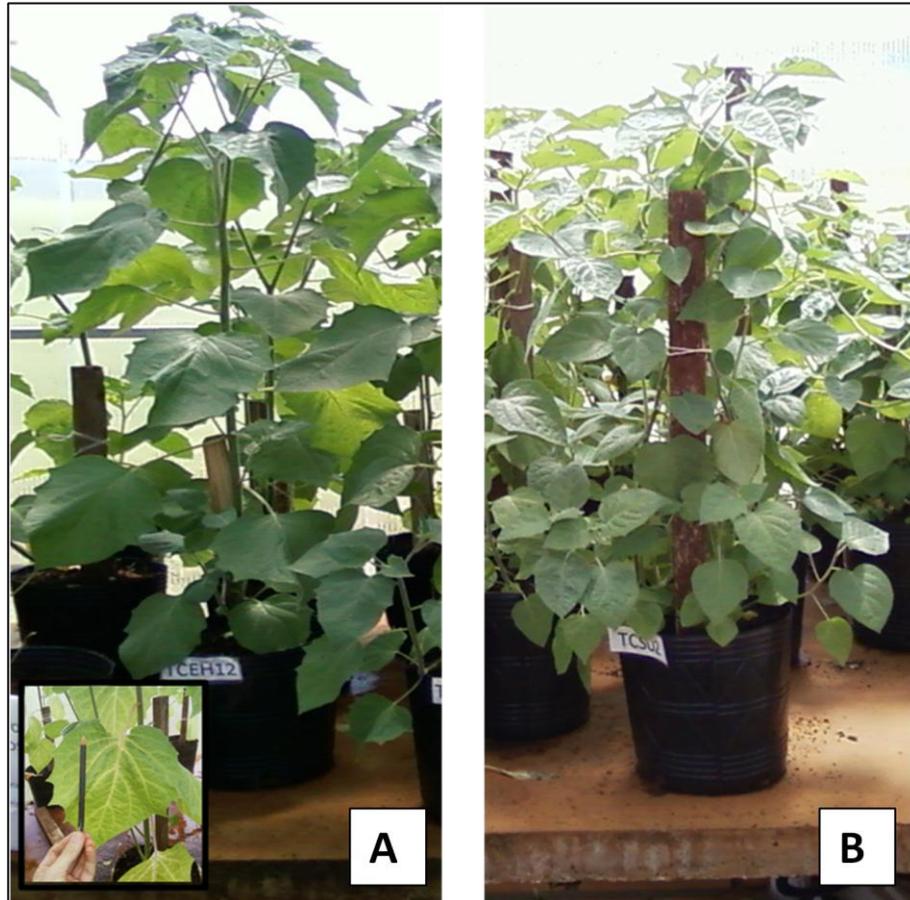
Através do ensaio realizado foi constatada interação significativa entre os fatores método de propagação e tipo de substrato somente para a variável biomassa, tanto fresca quanto seca dos caules, onde a propagação através de estacas herbáceas mostrou-se estatisticamente superior à propagação por sementes, principalmente para os tratamentos SP (solo + Plantmax) e S (solo) (Tabela 02).

**Tabela 02** – Resultado da interação entre métodos de propagação e substratos para a biomassa fresca e seca (g) do caule de *Physalis pubescens* L. UTFPR, Campus Pato Branco, 2011.

SUBSTRATOS	Biomassa fresca do caule (g)		Biomassa seca do caule (g)	
	Sementes	Estacas	Sementes	Estacas
SOLO + AREIA	97,69 Aba	129,27 Aa	21,83 Ab	31,10 Aa
SOLO + VERMICULITA	95,47 Aba	114,31 Aa	20,92 Aa	27,34 Aa
SOLO + PLANTMAX	82,11 Aba	124,03 Aa	16,93 Ab	25,59 Aa
SOLO + AREIA + VERMICULITA	112,36 Aa	100,49 Aa	23,06 Aa	18,60 Aa
SOLO	64,85 Bb	126,86 Aa	14,37 Ab	28,57 Aa
CV%	10,51		12,54	

Médias seguidas por letra maiúscula nas colunas e minúscula nas linhas não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância. Dados transformados em  $\sqrt{x/100}$ .

No caso do método de propagação, o melhor desempenho da estaquia em relação às plantas produzidas a partir de sementes pode estar relacionado à arquitetura da parte aérea, já que pela estaquia as plantas apresentaram caules únicos (Fotografia 02A), os quais permaneceram com esta característica durante todo o experimento, contrário ao que foi observado para o segundo método, já que após algumas semanas do transplântio as plantas passaram a apresentar inúmeras brotações adventícias na base (Fotografia 02B) as quais mesmo sendo eliminadas retornavam a aparecer em poucos dias, o que sem dúvida obrigou as plantas a disponibilizarem e realocarem água e seus assimilados para estas regiões.



**Fotografia 02** – Aspecto visual da parte aérea das plantas de *Physalis pubescens* L. produzidas por estaquia (A) e por sementes (B). UTFPR, Campus Pato Branco 2011. Fonte: Douglas Alvarez Alamino

Aliado a arquitetura da parte aérea, a formação de folhas com maior diâmetro nas estacas (12 a 15 cm) pode ter sido outro fator favorável ao acúmulo eficiente de biomassa nos caules, já que esta característica possibilita às plantas maior área de captação da luz, induzindo-as a realizarem taxas fotossintéticas mais intensas, o que segundo Negreiros et al. (2004) faz com que aspectos biométricos como diâmetro e massa fresca de caule e altura média de plantas aumentem consideravelmente.

Em relação aos substratos, esta interação significativa pode estar relacionada à disponibilidade de nutrientes, devido à grande quantidade de matéria orgânica e dos altos teores de fósforo e potássio encontrados nos tratamentos SA (solo + areia) e S (solo). Para Oliveira e Hernandez (2008), ambos são considerados essenciais ao desenvolvimento das plantas por estarem ligados à formação de esqueletos carbônicos, o que garante o acúmulo de biomassa vegetal. Segundo Marschener (1995) e Malavolta (1974) esta capacidade estrutural decorrente destes nutrientes acontece porque o fósforo absorvido pela planta está diretamente relacionado à

fotossíntese, já que faz parte da composição do ATP, aos processos de respiração, degradação de açúcares, armazenamento, transferência e utilização de energia, além de participar da divisão celular, favorecendo o desenvolvimento das plantas como um todo. Assim como o fósforo, o potássio também exerce funções fisiológicas importantes, estando vinculado ao balanço osmótico, controle da abertura e fechamento dos estômatos, fotossíntese, ativação enzimática, síntese de proteínas e transporte de carboidratos (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Para a variável altura das plantas, comprimento da maior raiz, aérea foliar, biomassas fresca e seca das folhas e raízes e volume das raízes não foram constatadas as mesmas interações encontradas para as variáveis anteriores, indicando que os fatores substrato e método de propagação não exercem influência um sobre o outro, resultando em diferença não significativa (ao nível de 5%). Porém, novamente a propagação por estacas foi superior a por sementes, apresentando valores médios de 123,14 e 90,02 cm, respectivamente, para a altura de plantas e 54,63 e 43,16 cm, respectivamente, para o comprimento da maior raiz (Tabela 03).

**Tabela 03** – Altura média da parte aérea (cm) e comprimento da maior raiz (cm) em plantas de *Physalis pubescens* L. propagadas por diferentes métodos e substratos. UTFPR, Campus Pato Branco, 2011.

Método de propagação	Altura média da parte aérea (cm)	Comprimento da maior raiz (cm)
SEMENTES	90,02 b*	43,16 b
ESTAQUIA	123,14 a	54,63 a
<b>Substratos</b>		
SOLO + AREIA	109,95 ns**	47,41 ns
SOLO + VERMICULITA	108,85 ns	50,49 ns
SOLO + PLANTMAX	102,85 ns	51,49 ns
SOLO + AREIA + VERMICULITA	114,65 ns	48,41 ns
SOLO	96,60 ns	46,66 ns
CV%	28,82	20,38

\* Médias seguidas por letra minúscula nas colunas não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância. \*\* Diferença não significativa, Dados transformados em  $\sqrt{x}/100$ .

No caso da área foliar a ausência de diferença significativa entre os métodos de propagação (Tabela 04) pode estar relacionada ao número de folhas, já que independente do diâmetro menor, o total de folhas foi muito maior nas mudas produzidas a partir de sementes quando comparadas com as estacas, isto em

decorrência do aparecimento de inúmeras brotações adventícias na base, como já citado, o que sem dúvida contribuiu para os resultados de biomassa fresca e seca das folhas (Tabela 04), já que estas são variáveis interdependentes.

**Tabela 04** – Área foliar (cm<sup>2</sup>), biomassa fresca e seca das folhas em plantas de *Physalis pubescens* L. propagadas por diferentes métodos e substratos. UTFPR, Campus Pato Branco, 2011.

Método de propagação	Área foliar (cm <sup>2</sup> )	Biomassa fresca das folhas (g)	Biomassa seca das folhas (g)
SEMENTES	1537,74 ns*	33,31 ns	4,12 ns
ESTAQUIA	1530,72 ns	33,94 ns	4,05 ns
<b>Substratos</b>			
SOLO + AREIA	1588,78 ns	34,45 ns	4,21 ns
SOLO + VERMICULITA	1403,82 ns	31,30 ns	4,04 ns
SOLO + PLANTMAX	1489,72 ns	33,52 ns	4,02 ns
SOLO + AREIA + VERMICULITA	1465,74 ns	32,95 ns	3,77 ns
SOLO	1723,08 ns	35,91 ns	4,38 ns
CV%	11,48	10,14	12,34

\* Diferença não significativa. Dados transformados em  $\sqrt{x}/100$ .

Mesmo não havendo interação significativa entre substrato e método de propagação para volume, biomassa fresca e seca das raízes, a inexistência de diferença entre plantas produzidas por estacas e por sementes (Tabela 05) pode estar associada aos substratos, os quais sem dúvida proporcionaram, de forma homogênea, condições favoráveis ao desenvolvimento das raízes, já que todas as misturas continham solo em sua composição. De acordo com Hartmann et al. (2002), o sistema radicular só se desenvolve satisfatoriamente quando o substrato combina boa aeração com alta capacidade de retenção de água, boa drenagem e ausência de contaminantes, o que em consequência gera um bom desenvolvimento da parte aérea.

Outro ponto relevante ao enraizamento diz respeito ao teor de hormônios endógenos. Segundo Hartmann et al. (2002), este processo é dependente de uma delicada combinação de compostos, sendo a relação entre auxinas e citocininas essencial ao desenvolvimento das raízes, já que estes auxiliam na “desdiferenciação” e reorganização dos tecidos da base da estaca. Portanto pode-se inferir que as reservas e translocação destes hormônios endógenos e cofatores

podem ter sido semelhantes nas plantas em desenvolvimento, já que estes estímulos são diferenciados quando se trata de sementes e no processo de germinação.

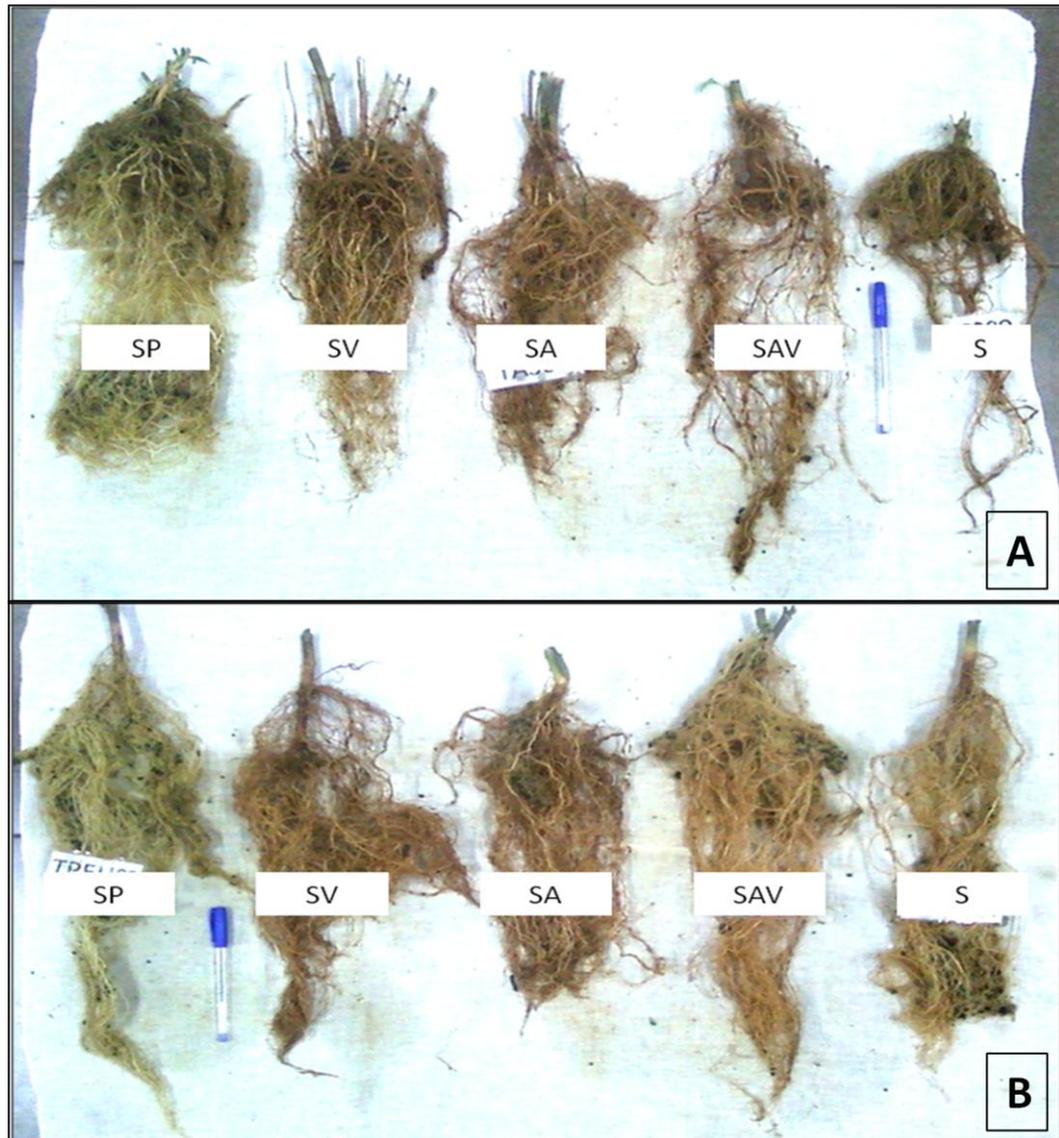
**Tabela 05** – Volume das raízes (mL), biomassa fresca e seca das raízes em plantas de *Physalis pubescens* L. propagadas por diferentes métodos e substratos. UTFPR, Campus Pato Branco, 2011.

Método de propagação	Volume das raízes (mL)	Biomassa fresca das raízes (g)	Biomassa seca das raízes (g)
SEMENTES	278,66 ns*	72,87 ns	21,64 ns
ESTAQUIA	296,66 ns	67,85 ns	15,87 ns
<b>Substratos</b>			
SOLO + AREIA	249,99 ns	51,81 ns	13,67 ns
SOLO + VERMICULITA	283,33 ns	76,96 ns	23,41 ns
SOLO + PLANTMAX	438,33 ns	101,23 ns	23,94 ns
SOLO + AREIA + VERMICULITA	208,33 ns	59,31 ns	13,32 ns
SOLO	258,33 ns	62,48 ns	19,45 ns
CV%	34,61	28,52 a	31,59

\* Diferença não significativa. Dados transformados em  $\sqrt{x/100}$ .

Quanto aos substratos, não foram constadas diferenças significativas entre as possíveis misturas de materiais para as variáveis altura de plantas, área foliar, comprimento da maior raiz, biomassas fresca e seca de folhas e raízes, e volume das raízes (Tabelas 03, 04 e 05). Ao se avaliarem de forma isolada cada uma das variáveis, foi possível constatar que o tratamento solo+Plantmax demonstrou os melhores resultados na maioria dos casos, principalmente no processo de enraizamento (Fotografias 03A e 03B), já que os valores mais expressivos são encontrados para o volume, comprimento, massas fresca e seca das raízes. Estes dados são semelhantes aos encontrados por Braun et al. (2010): ao avaliarem o efeito do substrato e comprimento de estacas na produção de mudas de tomate, constataram que a mistura de solo+areia+esterco bovino e Plantmax isoladamente, proporcionaram um aumento significativo no enraizamento e desenvolvimento das mudas se comparado ao emprego de areia. Segundo estes autores isto ocorreu porque a adição de matéria orgânica ao solo ou a mistura de um material inerte como a areia, a outro biológico como solo ou Plantmax contribuiu para a melhoria das condições físicas deste, como aumento na taxa de nutrientes e da porosidade, essencial à aeração radicular, já que tanto o solo como areia quando utilizados de

forma isolada, devido à sua alta densidade, acabam compactando as partículas e, conseqüentemente, reduzem a porosidade. Além disso, a utilização de areia como única fonte de substrato é limitante para as estacas herbáceas, já que ao contrário de boa parte dos materiais possui baixa retenção de umidade e nenhum nutriente (DUTRA; KERSTEN, 1996).



**Fotografia 03** – Aspecto visual das raízes produzidas por plantas defisalis propagadas por estaquia (A) e por sementes (B). Legenda: SA (Solo + areia); SV (Solo + vermiculita); SP (Solo + Plantmax); SAV (Solo + areia + vermiculita); S (Solo). UTFPR, Campus Pato Branco, 2011. Fonte: Douglas Alvarez Alamino

Ainda sobre estes aspectos, Zietemann e Roberto (2007) sugerem que a alta eficiência do substrato comercial Plantmax sobre o enraizamento e/ou desenvolvimento de plantas se deve, além da alta concentração de matéria orgânica

e porosidade, à grande quantidade de cargas iônicas e retenção de umidade satisfatória.

Resultados semelhantes aos encontrados neste experimento também foram observados por Oliveira et al. (2003) ao avaliarem o efeito de diferentes épocas, substratos e concentrações de ácido indolbutírico no enraizamento de estacas semilenhosas de oliveira. Segundo estes autores, o desenvolvimento das estacas ocorreu com maior significância no tratamento areia + solo. Dutra e Kersten (1996) ao testarem diferentes substratos na estaquia da ameixeira (*Prunus salicina*) observaram que a boa capacidade de drenagem e maior espaço poroso proporcionados pela areia e o equilíbrio entre os teores de água e ar, bem como a adequada densidade proporcionada pela vermiculita, propiciaram um elevado percentual de enraizamento.

Outro aspecto relevante quanto ao bom desempenho do substrato SP (solo + Plantmax) diz respeito ao pH da mistura. Dentre os substratos testados, o tratamento SP, juntamente com o SV (solo + vermiculita) apresentaram um caráter levemente ácido (5,0 e 5,6, respectivamente), faixa esta que segundo Kampf (2005) é a ideal para substratos utilizados em fruticultura. Além disso, pHs como os das misturas favorecem a germinação de sementes e dificultam o desenvolvimento de algumas classes de microorganismos (FACHINELLO et al., 1995).

Outra hipótese sobre a ausência de diferença significativa entre os substratos é que estes foram compostos por uma porção de matéria inerte e outra biológica (solo), fazendo com que as características das misturas fossem bastante semelhantes entre si. Além disso, os tratamentos culturais como rega e adubação orgânica (húmus de minhoca) foram efetuados de forma homogênea e no mesmo período para todos os tratamentos. Correia et al. (2001) verificaram que substratos contendo componentes orgânicos, como húmus de minhoca, em sua composição foram eficientes para a formação de porta-enxertos de gravioleira em tubetes. Okumura et al. (2002) verificaram que com a utilização de húmus de minhoca na proporção de 25% no substrato, excluiu a necessidade de adubação mineral. Negreiros et al. (2004) testando diferentes substratos na produção de mudas de mamoeiro grupo solo observaram que as misturas que receberam incorporação de componentes orgânicos foram as que apresentaram os maiores índices de massa seca da parte aérea, provavelmente pelo fato de terem modificado o equilíbrio composicional

desses substratos, proporcionando melhores condições para a muda em relação à aeração, nutrição e sustentação.

Portanto, observa-se que as mudas possuem boa adaptabilidade quando desenvolvidas em diferentes substratos, sendo a estaquia o método mais favorável se comparado à propagação por sementes em ambiente protegido, porém, como não foi definido um tipo de substrato específico, já que os mesmos não apresentaram diferença significativa entre si, fica a critério do produtor a escolha, dentre os tratamentos testados, do material mais adequado à sua estrutura de produção.

## **7 CONCLUSÕES**

- A estaquia é o melhor método de propagação para produção de mudas de *fisalis* comparado a propagação por sementes.
- Não foram constadas diferenças significativas entre as misturas de materiais empregados como substratos

## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através do ensaio realizado pode-se concluir que a propagação por estaquia demonstra ser mais eficiente do que a propagação por sementes, na produção de mudas, o que possibilitaria ao pequeno produtor redução de custos e tempo, já que a etapa de semeadura e desenvolvimento inicial das plântulas seria eliminada. Além disso, como as plantas têm um ciclo de vida produtivo de no máximo dois anos, estas, ao mesmo tempo em que produzem os frutos, poderiam servir como matrizes para a retirada das estacas, dando nova vida a um material que provavelmente seria futuramente descartado.

Em relação aos substratos, a ausência de diferença significativa entre as combinações de materiais empregados indica que ao serem mantidas em condições controladas e com a aplicação homogênea de adubação orgânica, as plantas respondem da mesma forma a qualquer um dos tratamentos. Assim, estes resultados abrem precedentes para que novos ensaios sejam realizados com outros substratos, com diferentes tipos de estacas, vasos, épocas de coleta, níveis de irrigação, sombreamento, entre outros.

## CAPÍTULO 02 ASPECTOS ANATÔMICOS DE PLANTAS DE *Physalis pubescens*

L.

### RESUMO

ALAMINO, Douglas Alvarez. Características agronômicas de fisalis (*Physalis pubescens* L.) produzidas por diferentes métodos e substratos e aspectos anatômicos e fitoquímicos. 2011. 89 f. - Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2011.

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de caracterizar anatomicamente algumas estruturas vegetativas e reprodutivas de *Physalis pubescens* L. (Solanaceae). Folhas, caules e flores foram submetidos a cortes paradérmicos e transversais, fixados em FAA a 70%, armazenados em etanol a 70% e, posteriormente, analisados por microscopia eletrônica de varredura. Os mesmos materiais (folhas, caule e flores) também foram analisados por microscopia ótica, sendo estes submetidos a cortes paradérmicos e transversais, e clarificados com hipoclorito de sódio quando necessário. As amostras foram coradas com solução aquosa de azul de metileno a 1% e solução acética de orceína a 1%, montadas sobre lâmina e lamínula. *P. pubescens* apresenta lâmina foliar hipoestomática, seus estômatos localizam-se um pouco abaixo do nível da epiderme, mesófilo composto pelo parênquima paliçádico e lacunoso, com a presença de drusas; a nervura principal, assim como o pecíolo exibem contorno biconvexo, com a presença de feixes vasculares em seu interior e colênquima adjacente à epiderme. Além disso, o pecíolo exhibe idioblastos de areia cristalina dispersos aleatoriamente. O caule possui formato hexagonal com a presença de quatro costelas laterais preenchidas por células do parênquima e feixes vasculares. Ao longo de toda a lâmina foliar, caule e pecíolo ocorrem tricomas glandulares e eglandulares, estes últimos também estão presentes em algumas regiões das pétalas, as quais são recobertas por inúmeras papilas. Conclui-se que *P. pubescens* exhibe as principais características anatômicas da família Solanaceae, sendo a ausência de estômatos na região adaxial da lâmina foliar um caráter distintivo desta em relação às demais espécies do gênero.

**Palavras – chave:** anatomia foliar; drusas; fisalis, hipoestomática, tricomas glandulares; papilas.

## ABSTRACT

ALAMINO, Douglas Alvarez. Agronomic characteristics of physalis (*Physalis pubescens* L.) produced by different methods and substrates and anatomical and phytochemical aspects. 2011. 89 f. - Dissertation (Master in Agronomy) - Graduate Program in Agronomy, Federal Technological University of Paraná. Pato Branco, 2011.

The present study was to characterize anatomically some vegetative and reproductive structures of *Physalis pubescens* L. (Solanaceae). Leaves, stems and flowers were sectioned and cross paradermal fixed in FAA 70%, stored in 70% ethanol and subsequently analyzed by scanning electron microscopy. The same materials (leaves, stems and flowers) were also analyzed by optical microscopy, which underwent paradermal and cross sections, and cleared with sodium hypochlorite as needed. The samples were stained with aqueous methylene blue of 1% and acetic solution orcein of 1%, mounted on a slide and coverslip. *P. pubescens* leaf presents hypostomatic their stomata are located slightly below the epidermis, mesophyll composed of the palisade and spongy parenchyma, the presence of drusen, the main vein, and the petiole biconvex contour display, with the presence of vascular bundles inside and collenchyma adjacent to the epidermis. In addition, the petiole displays idioblasts crystalline sand randomly dispersed. The stem has a hexagonal shape with the presence of four lateral ribs filled with parenchyma cells and vascular bundles. Throughout the leaf blade, stem and petiole eglandular and glandular trichomes occur, the latter are also presente in some regions of the petals, which are covered with numerous papillae. It is concluded that *P. pubescens* shows the main anatomical features of the Solanaceae, and the absence of stomata in the adaxial region of leaf blade of a distinctive character compared with other species.

**Key - words:** leaf anatomy; drusen; physalis; hypostomatic glandular; papillae.

## 9 INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta uma das mais ricas floras do planeta, isto por abrigar uma porcentagem considerável das mais de 250.000 espécies de plantas, dentre as quais briófitas, pteridófitas, gimnospermas e angiospermas (CORDEIRO, 2006). Mesmo com toda esta diversidade, as informações sobre a flora ainda são bastante escassas e fragmentadas, porém, este quadro vem sendo revertido ao longo das últimas décadas, visto o interesse de pesquisadores, de diferentes áreas do conhecimento, na identificação e preservação de espécies de importância ecológica e econômica (fibras, aromas, óleos, fármacos) (POTIGUARA, 2010).

Ao se avaliar, de forma generalizada, a família Solanaceae se constata que o maior número de trabalhos sobre os caracteres anatômicos de espécies ocorre para os gêneros *Solanum* e *Nicotiana* (NURIT-SILVA et al., 2007; PEDROSO; ALVES, 2008; COUTINHO, 2009; NURIT-SILVA; AGRA, 2009; ARAÚJO et al., 2010)

Em relação ao gênero *Physalis* os estudos anatômicos são recentes e quase que inexistentes, destacando-se somente o realizado por Nurit-Silva e Agra (2005) ao realizarem o estudo farmacobotânico comparativo entre *Nicandra physalodes* e *Physalis angulata* (Solanaceae). Segundo estes autores, as duas espécies compartilham vários caracteres anatômicos, como a morfologia das células epidérmicas, os tipos de estômatos, o mesófilo dorsiventral, presença de tricomas glandulares e eglandulares, tanto nas folhas como nos pecíolos e o número de feixes vasculares na nervura principal e pecíolo. Entretanto, a presença de drusas no mesófilo de *P. angulata* é um caráter diferencial para esta espécie.

Sobre *Physalis pubescens*, em específico, os trabalhos anatômicos são inexistentes, porém, seus aspectos morfológicos já foram avaliados por Carvalho e Bovini (2006), os quais consideraram a planta como uma erva ou subarbusto, a qual apresenta ramos hialinos, tricomas simples e glandulares por toda a superfície vegetativa, folhas e flores inteiras e isoladas, e frutos globosos, recobertos pelo cálice ampliado.

Com base nos aspectos citados, o presente trabalho teve como objetivo realizar a descrição da anatomia foliar, caulinar e floral mediante observação, em microscópio ótico e de varredura, dos cortes histológicos de *P. pubescens* L. visando, assim iniciar os estudos anatômicos da espécie.

## 10 MATERIAL E MÉTODOS

### 10.1 Coleta, identificação e preparo de material botânico

Amostras vegetais do caule, folhas (lâmina e pecíolo) e flores (pétalas e grãos de pólen) foram coletadas de plantas de *Physalis pubescens* L. cultivadas em casa de vegetação na Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus de Pato Branco. Parte do material foi herborizado e encaminhado ao Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná (UFPR), o qual foi identificado pelo Prof. Ms. Olavo Araujo Guimarães, sendo então depositado no Herbário do Departamento de Botânica da UFPR, sobre o número UPCB 70085.

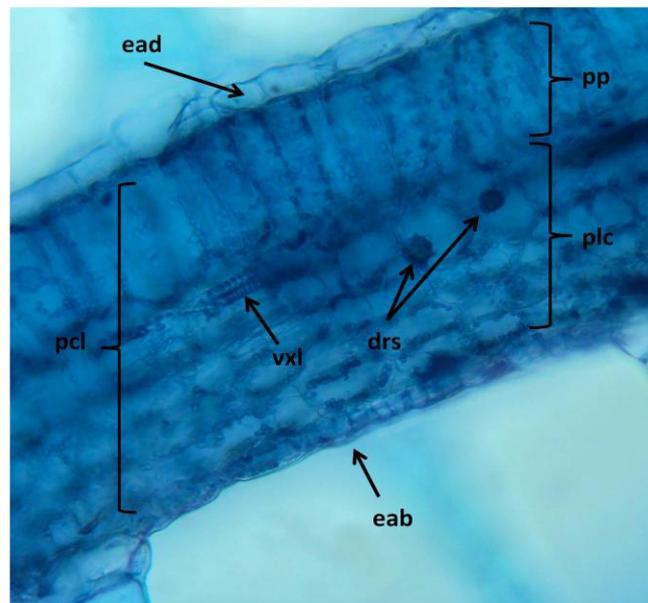
O material vegetal foi fixado em FAA a 70% (Formaldeído + ácido acético + álcool etílico) por 72 horas e, posteriormente, armazenado em etanol a 70%. O estudo anatômico baseou-se na observação em microscópio ótico e de varredura (procedimento este realizado no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR) das secções transversais, obtidas a mão livre, do caule, porção mediana do pecíolo, lâmina foliar na região mediana da nervura principal e pétalas. As eletromicrografias de varredura foram realizadas em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV): JEOL JSM 6360 LV - Scanning Electron Microscope Ponto Crítico: BAL-TEC CPD030 Critical Point Dryer Metalizador: SCD030 Balzers Union FL9496 Balzers.

Para as observações realizadas no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Vegetal da UTFPR, Campus de Pato Branco, os cortes das estruturas vegetativas foram clarificados, devido à alta concentração de clorofila, em solução de hipoclorito de sódio a 20% do produto comercial, por um período de uma hora, sendo, em seguida, lavados com água destilada. Fragmentos epidérmicos, de ambas as faces foliares, foram obtidos após dissociação, por imersão em solução de hipoclorito de sódio a 20%, por 72 horas. As amostras foram coradas com azul de metileno (solução aquosa) a 1%, orceína (solução acética) a 1%, montadas sobre lâmina e lamínula e observadas em microscópio ótico Physis, com câmera acoplada Micrometrics®.

A classificação das estruturas anatômicas baseou-se em artigos e na obra de Appezzato-da-Glória e Carmello-Guerreiro (2004).

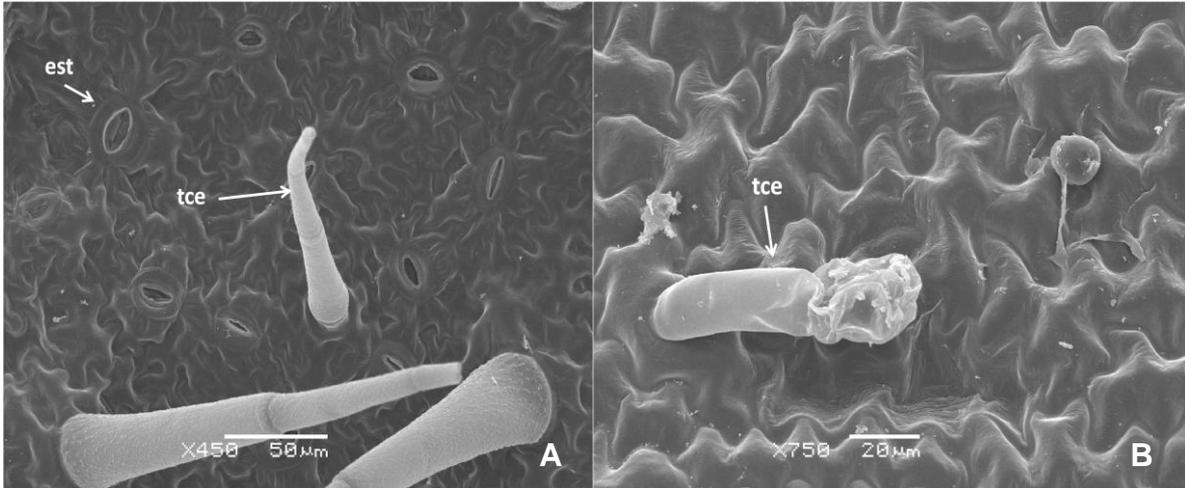
## 11 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Por possuir estômatos somente na face abaxial, a lâmina foliar de *P. pubescens* é hipoestomática, diferentemente de *P. angulata* a qual apresenta estas estruturas nas duas faces da folha (NURIT-SILVA; AGRA, 2005). O mesófilo é heterogêneo e dorsiventral (Fotografia 04), formado por células do parênquima paliçádico, as quais se apresentam como uma camada uniestratificada e seriada, e pelo parênquima lacunoso, o qual é constituído por quatro ou mais camadas de células irregulares, justapostas, com a presença de um grande número de drusas em seu interior.



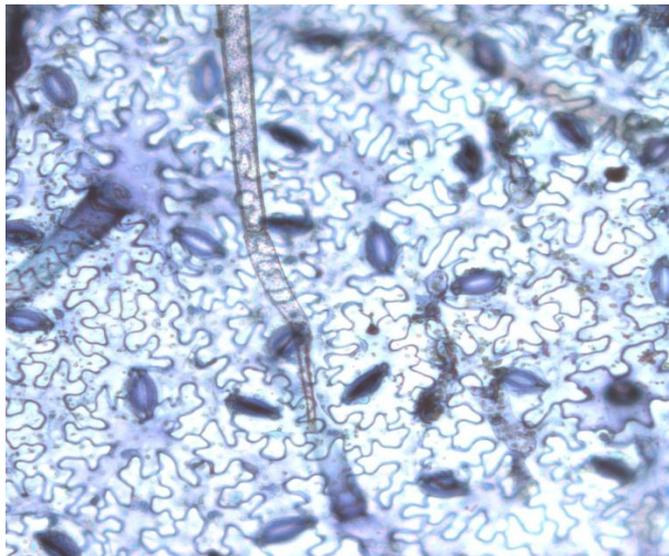
**Fotografia 04** - Seção transversal da lâmina foliar. Legenda: ead: epiderme adaxial; pp: parênquima paliçádico; plc: parênquima lacunoso; pcl: parênquima clorofiliano; drs: drusas; vxl: vaso xilemático; eab: epiderme abaxial. UTFPR, Campus pato Branco, 2011. Fonte: Douglas Alvarez Alaminio.

Em vista frontal, as células epidérmicas da superfície abaxial e adaxial, apresentam paredes sinuosas, de formato irregular, com paredes relativamente mais delgadas para a face inferior da folha (Fotografias 05A e 05B). Em corte transversal estas mesmas regiões apresentam paredes periclinais convexas revestidas por uma cutícula lisa e delgada, e células de menor diâmetro, respectivamente (dados não mostrados).



**Fotografia 05** – Fotomicrografia de varredura das secções paradérmicas de folhas de *Physalis pubescens* L., evidenciando o aspecto anatômico das células da face abaxial (A) e adaxial (B). Legenda: est: estômato; tce: tricoma glandular. UTFPR, Campus Pato Branco, 2011. Fonte: Douglas Alvarez Alamino e Marisa de Cacia Oliveira.

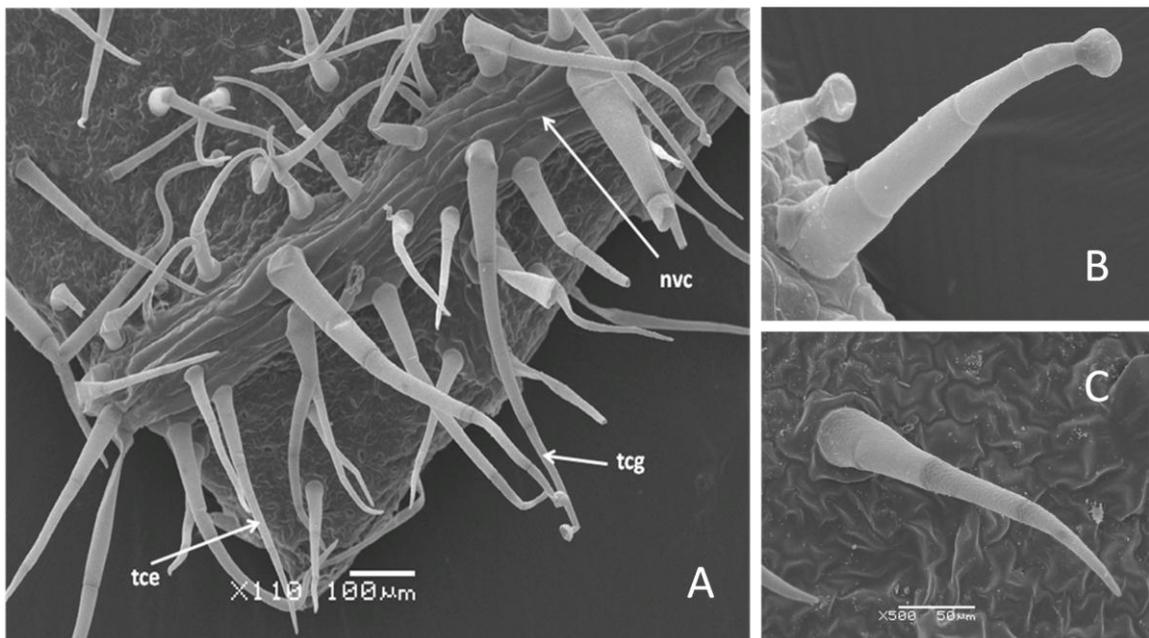
Os estômatos (Fotografia 06), presentes em grande quantidade na face abaxial das folhas, estão localizados um pouco abaixo do nível da epiderme e são divididos em anisocíticos e anomocíticos (referente à disposição e número de células ao entorno dos estômatos); sendo o primeiro tipo também encontrado em *Physalis viscosa* (MAITI et al., 2002); além disso, estas estruturas possuem alta afinidade por corantes orgânicos.



**Fotografia 06** – Secção paradérmica de folhas de *Physalis pubescens* L., evidenciando o grande número de estômatos dispersos face abaxial. UTFPR, Campus Pato Branco, 2011. Fonte: Douglas Alvarez Alamino.

Por toda a extensão da lâmina foliar, em ambas as faces e ao longo de toda a nervura principal, ocorrem tricomas eglândulares, multicelulares, unisseriado, e tricomas glandulares estipitados, subsésseis, com a cabeça unicelular (Fotografias 07A, 07B e 07C).

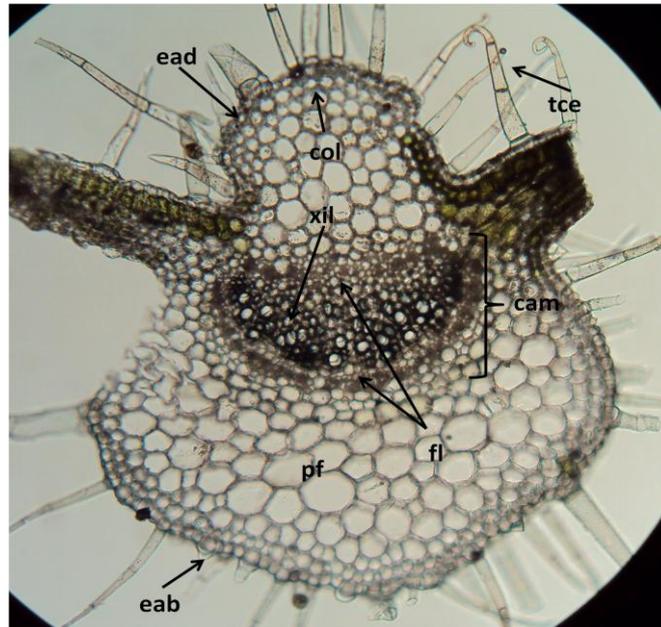
Diferentemente do que ocorre para *P. pubescens* L., em plantas de *P. viscosa* os tricomas são ramificados (MAITI et al., 2002). Segundo Karabourniotis e Bornman (1999) a presença de tricomas em diferentes superfícies de um vegetal ajuda a atenuar a radiação incidente, principalmente nas faixas do azul, UV-A e UV-B, protegendo os tecidos foliares de plantas xerófitas. Esta atenuação provocada pelos tricomas ocorre devido às propriedades de refletância e dispersão, principalmente em relação às faixas espectrais da radiação fotossintética (400-700 nm) (SKALTSIA et al., 1994)



**Fotografia 07** – Fotomicrografia de varredura da face abaxial das folhas de *Physalis pubescens* L., A) nervura central (nvc) e os tricomas glandulares (tcg) e eglândulares (tce) presentes sobre a epiderme B) detalhe dos tricomas glandular estipitado e C) eglândulares. UTFPR, Campus Pato Branco, 2011. Fonte: Douglas Alvarez Alamino e Marisa de Cacia Oliveira.

A nervura principal (Fotografia 08) exhibe contorno biconvexo, com maior proeminência na face abaxial. Adjacente à epiderme, o colênquima, que é do tipo angular, distribui-se ao longo de toda a região periférica de ambas as faces, perfazendo de dois a três extratos celulares, sendo esta característica também encontrada por Pedroso e Alves (2008) ao avaliarem a anatomia foliar de *Nicotiana*

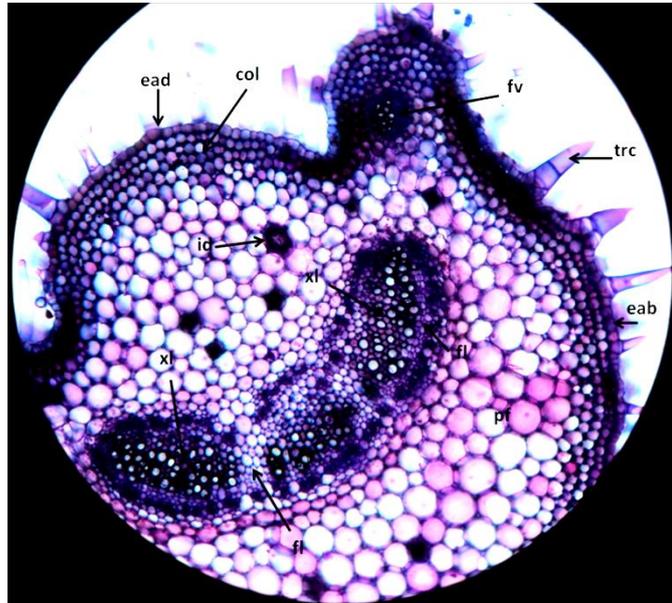
*tabacum* L., outro representante da família Solanaceae. O parênquima fundamental é constituído por células esféricas e hexagonais de diferentes diâmetros. Junto a ele encontra-se o sistema vascular, formado por um único feixe biclateral semicircular, com inúmeros elementos de vaso dispostos radialmente. As células floemáticas encontram-se organizadas em cordões de cinco a sete estratos celulares.



**Fotografia 08** - Secção transversal nervura principal. Legenda: ead: epiderme adaxial; col: colênquima; tce: tricoma eglandular; xil: xilema; fl: floema; cam: câmbio; pf: parênquima fundamental; eab: epiderme abaxial. UTFPR, Campus Pato Branco, 2011. Fonte: Douglas Alvarez Alamino.

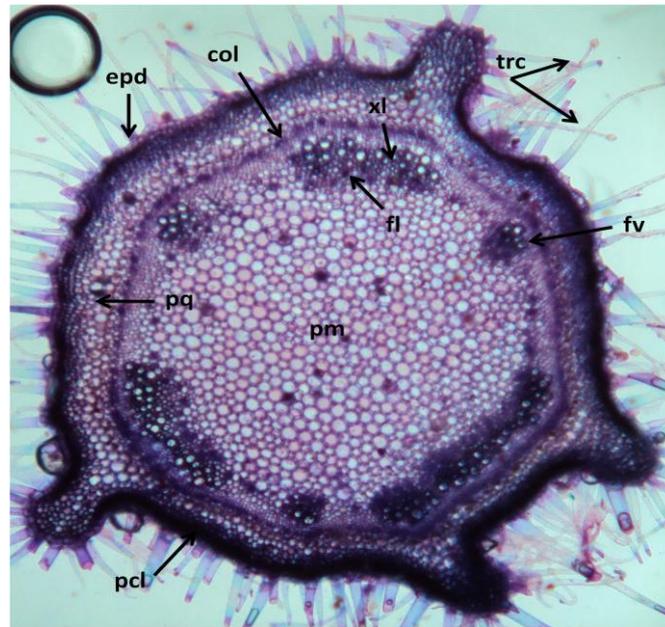
O pecíolo (Fotografia 09) exibe contorno biconvexo, com duas costelas laterais. A epiderme é uniestratificada, revestida por uma cutícula lisa e delgada. Tricomas eglandulares e do tipo glandular-estipitado, similares aos da lâmina foliar, estão presentes ao longo de todo o pecíolo. A região cortical é composta pelo colênquima subepidérmico, do tipo angular, formado por duas a três camadas de células, e pelo parênquima fundamental, composto por células de contorno arredondado e idioblastos de areia cristalina dispersos aleatoriamente, sendo estas últimas estruturas também encontradas por Nurit-Silva et al. (2007) para *Nicotiana glauca*. Junto ao parênquima ocorre o sistema vascular. A transição entre estas duas regiões de células é marcada por uma redução gradual no espessamento das paredes celulares. Assim como em algumas espécies do subgênero *Solanum* (ARAÚJO et al., 2010) o sistema vascular de *P. pubescens* é constituído por feixes biclaterais, dois a três grandes e centrais, em forma de arco, e dois pequenos,

laterais, arredondados, dispostos na região das costelas, estruturas estas consideradas como pequenas protuberâncias celulares, formadas por células epidérmicas e parenquimáticas, as quais geralmente possuem feixes de vascularização na parte central (Fotografia 09).



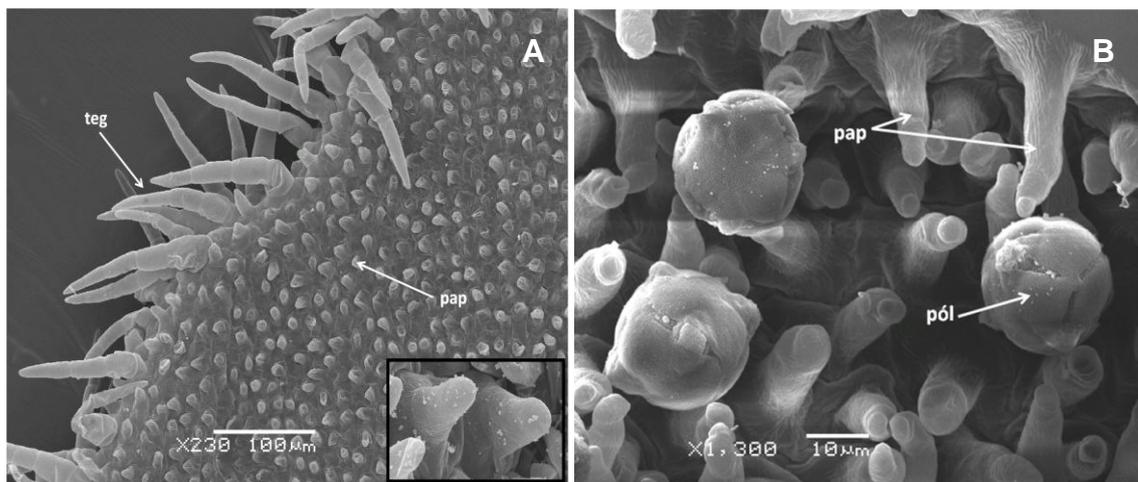
**Fotografia 09** - Secção transversal do pecíolo, região mediana. Legenda: ead: epiderme adaxial; col: colênquima; fv: feixe vascular; trc: tricoma; id: idioblasto; xl: xilema; fl: floema; pf: parênquima fundamental; eab: epiderme abaxial. UTFPR, Campus Pato Branco, 2011. Fonte: Douglas Alvarez Alamino.

O caule (Fotografia 10) possui formato hexagonal, com a presença de quatro costelas laterais, dispostas radialmente. A epiderme é unisseriada, composta pelas células do parênquima clorofiliano, seguida por um cordão de células colenquimáticas, o qual faz a transição entre este parênquima e o parênquima medular, sendo este composto por células arredondadas com tamanhos variados. O sistema vascular é composto por seis feixes dispostos radialmente e com maior proporção nas regiões próximas às costelas. Assim como nas demais estruturas da planta, os tricomas eglandulares e glandulares estão presentes e distribuídos em grande número, por toda a superfície do caule. Estas características são distintas das encontradas por Nurit-Silva e Agra (2009) ao estudarem a morfoanatomia de órgãos vegetativos de *Solanum caavurana* Vell.



**Fotografia 10** - Secção transversal do caule, região mediana. Legenda: epd: epiderme; col: colênquima; trc: tricomas; xl: xilema; fl: floema; fv: feixe vascular; pq: parênquima; pm: parênquima medular; pcl: parênquima clorofiliano. UTFPR, Campus Pato Branco, 2011. Fonte: Douglas Alvarez Alamino.

A superfície adaxial das pétalas (Fotografias 11A e 11B) é composta por pequenas projeções denominadas de papilas, as quais se encontram dispostas de forma arranjada, sendo comum a presença de grãos de pólen sobre as mesmas, decorrente da ação dos agentes polinizadores. A face abaxial é composta por uma mescla de papilas e tricomas do tipo eglândular (Fotografia 11A).



**Fotografia 11** – Fotomicrografias de varredura da face adaxial das pétalas de *Physalis pubescens* L., evidenciando (A) a presença de papilas (pap), tricomas eglândulares (teg); e (B) detalhes das papilas e grãos de pólen (pól). UTFPR, Campus Pato Branco, 2011. Fonte: Douglas Alvarez Alamino e Marisa de Cacia Oliveira.

## 12 CONCLUSÕES

- A lâmina foliar de *P. pubescens* L. é hipoestomática;
- Há a presença de um grande número de drusas no interior do parênquima lacunoso;
- Seus estômatos são divididos em anisocíticos e anomocíticos;
- Há um grande número de tricomas glandulares e eglandulares dispersos por toda a epiderme da planta.

### 13 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao se avaliarem os aspectos anatômicos de *P. pubescens* L. pode-se concluir que esta exhibe estruturas características da família Solanaceae, como por exemplo, a presença de tricomas na lâmina foliar e idioblastos de areia cristalina dispersos pelo parênquima.

A detecção da presença de estruturas secretoras, como é o caso dos tricomas, quando o material vegetal é seccionado transversalmente ou através da observação direta da forma e conteúdo destes, pode ser um grande indicativo da presença de metabólitos secundários na planta, como óleo essencial. Além disso, a grande afinidade tintorial observada nos tecidos indica a possibilidade do emprego de reagentes específicos que podem ajudar a identificar e elucidar a presença de determinados grupos de substâncias químicas dentro das diferentes estruturas da planta.

A ausência de estômatos na face adaxial das folhas de *P. pubescens* também foi uma característica de grande relevância já que esta informação, futuramente, poderá ser útil no esclarecimento e estabelecimento de possíveis diferenças entre as espécies do gênero. Porém, são necessários estudos mais detalhados, já que os ensaios realizados serviram apenas como ponto de partida para a descrição detalhada da espécie.

## CAPITULO 03. PERFIL FITOQUÍMICO DE PLANTAS DE *Physalis pubescens* L.

### RESUMO

ALAMINO, Douglas Alvarez. Características agronômicas de fisalis (*Physalis pubescens* L.) produzidas por diferentes métodos e substratos e aspectos anatômicos e fitoquímicos. 2011. 89 f. - Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2011.

Devido ao pouco número de trabalhos sobre os constituintes químicos presentes em *Physalis pubescens* L., o presente estudo avaliou, por diferentes técnicas cromatográficas, o extrato bruto das folhas da planta. Para tanto folhas de *P. pubescens* oriundas de plantas cultivadas em vasos mantidos em casa de vegetação, foram secas, moídas e extraídas com hexano e etanol. O extrato bruto obtido pela extração foi aplicado em coluna cromatográfica, tendo como solventes para a partição diclorometano, acetato de etila, metanol e água destilada. As frações foram, então, submetidas à cromatografia em camada delgada (TLC), com a aplicação de diferentes sistemas de eluição e revelação; e ressonância magnética de prótons (RMN <sup>1</sup>H). Foram encontrados, através de cromatografia em camada delgada, sinais da presença de alcalóides, cumarinas, fisalinas, óleo essencial, saponinas, triterpenóides e taninos. Em virtude do alto teor de ácidos graxos nas frações obtidas do extrato bruto, não foi possível identificar isoladamente nenhum composto por RMN <sup>1</sup>H, sendo realizada somente a identificação de possíveis grupos de compostos, entre os quais, triterpenos em mistura nas frações acetato de etila e metanol e compostos aromáticos de baixa intensidade na fração hidroalcolica. Em função desses resultados optou-se por realizar cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) do extrato bruto das folhas. As folhas frescas foram submetidas à extração exaustiva com metanol:clorofórmio (7:3 v/v), em banho maria a 50°C, seguido de banho ultrassônico, sendo as amostras filtradas em filtro Millipore 0,45 µm e injetadas no cromatógrafo. Foram encontrados sinais de um possível alcalóide identificado como epistefamiersina (86% de probabilidade), sendo este o primeiro registro deste composto para a referida espécie. Em virtude destes resultados preliminares conclui-se que, *P. pubescens* sintetiza inúmeras categorias de compostos secundários, entre as quais, as fisalinas e, possivelmente o raro alcalóide epistefamiersina, porém são necessário estudos mais detalhados para a concretização desta hipótese

**Palavras – chave:** *Physalis pubescens* L.; epistefamiersina; fisalis; fisalinas; metabólitos secundários.

## ABSTRACT

ALAMINO, Douglas Alvarez. Agronomic characteristics of physalis (*Physalis pubescens* L.) produced by different methods and substrates and anatomical and phytochemical aspects. 2011. 89 f. - Dissertation (Master in Agronomy) - Graduate Program in Agronomy, Federal Technological University of Paraná. Pato Branco, 2011.

Due to the limited number of studies on the chemical constituents present in *Physalis pubescens* L. The present study evaluated using different chromatographic techniques, the crude extract of the leaves. For both leaves of *P. pubescens* from plants grown in pots in greenhouse were dried and extracted with hexane. The crude extract obtained by extraction was applied in chromatographic column and as solvents for the partition dichloromethane, ethyl acetate, methanol and distilled water. The fractions were then subjected to thin layer chromatography (TLC), with the application of different systems of elution and revelation, and proton magnetic resonance ( $^1\text{H}$  NMR). Were also found, by thin layer chromatography, signals the presence of alkaloids, coumarins, physalins, essential oil, saponins, triterpenoids and tannins. Due to the high content of fatty acids in the fractions obtained from crude extract, we could not identify any compound isolated by  $^1\text{H}$  NMR, being performed only to identify possible groups of compounds, among which are triterpene mixture into fractions of ethyl acetate and methanol and aromatic fraction of low intensity in hydroalcoholic. Due to these results we chose to perform the gas chromatography-mass spectrometry (GC / MS) of crude extract of the leaves. Fresh leaves were extracted exhaustively with methanol: chloroform (7:3 v / v) in water bath at 50° C, followed by ultrasonic bath, and the samples were filtered through Millipore filter 0.45  $\mu\text{M}$  and injected into the chromatograph. From the analysis in GC / MS of the crude extract was found possible signs of an alkali unit as identified by epistephamsine (86% probability), this being the first record of this compound for that species. . Given the preliminary results, we conclude that, *P. pubescens* synthesizes several classes of secondary metabolites, including the physalins, and possibly the rare alkaloid epistephamsine, but more detailed studies are necessary to the achievement of this hypothesis.

**Key - words:** epistephamsine; physalins; secondary metabolites.

## 14. INTRODUÇÃO

Desde os primórdios da civilização, as plantas têm sido utilizadas pelo homem como fonte de alimento, no tratamento de doenças, entre outros usos (FRANÇA, 2001). Em função da necessidade, o homem acabou descobrindo espécies de plantas com ação tóxica ou medicinal, construindo, assim, um conhecimento empírico das suas ações medicinais. Um exemplo de utilização prática deste conhecimento é o curare, um veneno utilizado nas flechas por certas tribos indígenas da floresta amazônica que deu origem à descoberta de poderosos relaxantes musculares utilizados nos dias atuais como auxiliares indispensáveis em determinadas intervenções cirúrgicas (HOSTETTMANN et al., 2003).

Assim, pode-se dizer que as plantas, em um contexto geral, constituem um reservatório de princípios ativos que podem ser usados como medicamento para uma infinidade de patologias. Esta busca por plantas úteis para a saúde humana, baseada nos conhecimentos populares, é de grande importância para a ciência, uma vez que essas informações acabam indicando, muitas vezes, qual o tipo de planta e a forma de ação desta sobre determinadas doenças (MENDES, 2007).

A riqueza da biodiversidade da flora brasileira, assim como de outras regiões do mundo, associada aos levantamentos etnobotânicos, etnofarmacológicos, farmacognósticos e fitoquímicos, têm permitido aos pesquisadores isolar compostos biologicamente ativos de diferentes espécies vegetais, os quais têm servido, muitas vezes, de modelo para modificações estruturais e otimização das propriedades farmacológicas e bioquímicas de muitas moléculas, além de fornecerem informações valiosas para a construção de moléculas pelas indústrias farmacêutica, agrícola e florestal (GUERRA; NODARI, 2001; BRAZ FILHO, 2010).

Esses estudos, além de garantirem grandes avanços no campo de bioprospecção de moléculas e minimização dos efeitos colaterais e de altos custos do tratamento medicamentoso convencional, têm fornecido resultados valiosos e importantes para o desenvolvimento, conscientização e sistematização da assistência e do ensino da saúde, já que grande parte da população mundial se utiliza da medicina popular para seus cuidados primários em relação à saúde e se presume que a maior parte dessa terapia tradicional envolva o uso de extratos de plantas ou seus princípios ativos (KAUR et al., 2005; GONÇALVES et al., 2006).

Segundo Wink (2010), o número de compostos do metabolismo secundário extraído de plantas passa dos 100.000, os quais têm diversos usos, que envolvem além de fármacos, corantes, estimulantes e alucinógenos, produtos de perfumaria, temperos e venenos.

Dentre as centenas de milhares de compostos de interesse sintetizados pelas plantas estão os metabólitos produzidos pelos representantes do gênero *Physalis*, como os pubesenólídeos e as fisalinas em *P. pubescens*, os quais têm sido alvos de estudos sobre possíveis atividades anti-neoplásicas. Porém no mesmo ritmo em que estas substâncias são testadas muito pouco se sabe sobre os outros grupos de compostos presentes em suas estruturas (SAHAI, 1985; TOMASSINI et al., 2000).

Além desses aspectos, muitos cientistas e indústrias farmacêuticas têm se deparado com algumas dificuldades quanto à extração, isolamento e identificação de moléculas. Isto se deve, em parte, à biossíntese destes compostos nas plantas que normalmente é baixa (menos de 1% da matéria seca), estando, assim, relacionada diretamente à condição fisiológica e ao estágio de desenvolvimento da planta (OKSMAN-CALDENTEY; INZÉ, 2004), gerando grande variabilidade de espécie para espécie. Em alguns casos a síntese é tão baixa que acaba exigindo das indústrias farmacêuticas ou de beneficiamento processos de extração mais complexos do que os habitualmente utilizados.

Com base nestes dados, e devido à escassez de estudos químicos sobre a referida espécie os estudos fitoquímicos desenvolvidos no presente trabalho tiveram como objetivo detectar a presença de compostos de interesse do metabolismo secundário em plantas de *Physalis pubescens* L. com o emprego de diferentes técnicas cromatográficas (TLC, CG/EM) e RMN <sup>1</sup>H.

## 15 MATERIAL E MÉTODOS

### 15.1 Separação dos compostos de *P. pubescens* por cromatografia em coluna

#### 15.1.1 Material vegetal

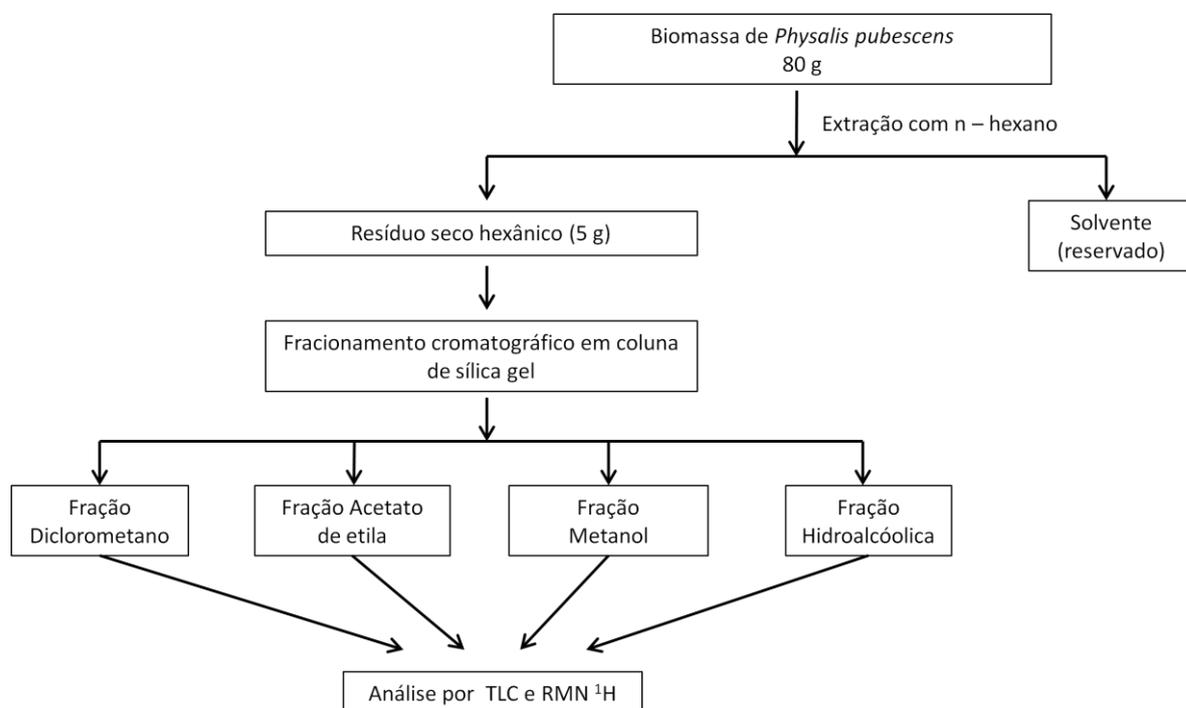
Para a separação de frações contendo possíveis compostos de interesse do metabolismo secundário, foram utilizadas folhas de *Physalis pubescens* (Solanaceae) com aproximadamente 100 dias de idade, provenientes de ensaio de produção de mudas por diferentes métodos e substratos (Capítulo 1). As plantas propagadas através de estacas e sementes foram mantidas em casa de vegetação, sob condições controladas de temperatura ( $26\pm 2^\circ\text{C}$ ). Optou-se por utilizar folhas coletadas da parte mediana das plantas, visto que as basais eram mais velhas e já apresentavam sinais de senescência, e as da porção superior eram muito novas. Foram retiradas 5 folhas por planta, de todas as repetições para todos os tratamentos, as quais foram selecionadas de acordo à turgescência e ausência de injúrias. Todas as folhas coletadas foram, então, reunidas, sem levar em consideração o tipo de tratamento, visando formar uma amostra única.

#### 15.1.2 Processo de extração e separação dos compostos

As folhas (80 g) foram secas à temperatura ambiente, trituradas em liquidificador e submetidas à extração a frio por percolação com *n*-hexano (600 mL) por 7 dias, seguida por completa evaporação do solvente, o qual foi reservado. O resíduo seco hexânico (cerca de 5 g) oriundo da extração exaustiva, foi ressuspenso em 5 mL de hexano e após completa homogeneização com o solvente, foi submetido a fracionamento cromatográfico. A coluna com dimensões de 2,7 cm de diâmetro e 20 cm de altura foi preenchida com sílica gel 60, Merck® na proporção de 1:10 (g de amostra/g de sílica), o que resultou em uma fase estacionária de 12,5 cm. A amostra foi eluída com diclorometano, seguida de acetato de etila, metanol e por fim água destilada (todos na concentração de 100%). Foram utilizados 30 mL de cada solvente.

Após eluição com cada um dos solventes, as respectivas frações foram recolhidas em frascos de 50 mL e deixadas em capela, à temperatura ambiente, até

a completa evaporação dos solventes. A Figura 03 apresenta de forma detalhada os procedimentos mencionados.



**Figura 03** – Etapas de preparo do extrato bruto das folhas de *Physalis pubescens* L e fracionamento cromatográfico do resíduo seco hexânico. UTFPR, Campus Pato Branco, 2011. Fonte: Douglas Alvarez Alamino

### 15.1.3 Detecção dos compostos por cromatografia em camada delgada (TLC)

As frações obtidas pela cromatografia em coluna foram submetidas a uma avaliação fitoquímica preliminar por cromatografia em camada delgada (TLC), visando detectar a presença dos seguintes grupos de metabólitos secundários: alcalóides, cumarinas, fisalinas, naftoquinonas, óleos voláteis, saponinas, triterpenóides e taninos. Os procedimentos analíticos foram baseados em Wagner e Blandt (1986), Ovando (2007), Bertolini (2007) e Waksmundzka-Hajnos et al. (2008), os quais se encontram descritos a seguir:

### 15.1.3.1 Alcalóides

A cada uma das amostras retiradas das frações obtidas pela cromatografia em coluna, foi adicionado 1 mL de solução de hidróxido de amônio a 10%, seguido pela extração com metanol a 80% (10 mL). A solução resultante foi mantida em banho maria a 60 °C, por 5 minutos, filtrada em papel (filtro) qualitativo e concentrada a partir da evaporação do solvente em capela. Ao resíduo foram adicionadas 3 gotas de HCl a 1%. Com o auxílio de um capilar, as amostras foram aplicadas em cromatoplasmas de sílica gel 60 (Merck).

Fase móvel: tolueno : acetato de etila: metanol (7:2:1 v/v/v)

Revelador: reagente de Dragendorff

Deteccção: presença de zonas escuras ou laranja, em luz visível.

### 15.1.3.2 Cumarinas e fisalinas

As frações foram ressuspensas em 1 mL de metanol a 80%. Uma pequena alíquota foi aplicada nas cromatoplasmas de sílica gel 60 com o auxílio de um capilar.

Para cumarinas:

Fase móvel: tolueno : acetato de etila (9,3:0,7 v/v)

Revelador: solução etanólica de hidróxido de potássio a 5%, seguido de acondicionamento das placas, por 5 minutos, em estufa a 100°C. Exposição a luz ultravioleta a 365 nm

Deteccção: Fluorescência azul a verde

Para fisalinas (modificado)

Fase móvel: hexano: acetato de etila (3:7 v/v)

Revelador: em substituição à solução de vanilina sulfúrica foi utilizado fenol a 5% + ácido sulfúrico a 10%, seguido de acondicionamento das placas, por 5 minutos, em estufa a 100 °C.

Deteccção: Zonas rosadas a vermelho em luz visível.

### 15.1.3.3 Óleos essenciais (modificado)

Cada fração foi ressuspensa em 1 mL de tolueno. Uma pequena alíquota foi aplicada nas cromatoplasmas de sílica gel 60 com o auxílio de um capilar.

Fase móvel: tolueno: acetato de etila (93:7 v/v)

Revelador: solução fenol sulfúrica seguida de acondicionamento das placas, por 10 minutos, em estufa a 100 °C.

Deteção: Presença de zonas azuis, verdes, vermelhas, palha e marrons na luz visível, que desaparecem em pouco tempo.

### 15.1.3.4 Saponinas e triterpenóides.

As frações foram ressuspensas em 1 mL de etanol a 70%, e aplicadas nas cromatoplasmas de sílica gel 60 com o auxílio de um capilar.

Fase móvel: butanol: ácido acético: H<sub>2</sub>O (5:1:4 v/v/v)

Revelador: Solução de Liebermann - Burchard seguido de acondicionamento das placas, por 5 minutos, em estufa a 100 °C, visualizadas em luz ultravioleta (365nm)

Deteção: Zonas azuis e verdes indicam saponinas esteroidais; zonas vermelhas e violetas indicam a presença de triterpenóides.

### 15.1.3.5 Taninos

Cada fração foi ressuspensa em 1 mL de metanol a 80%. Uma pequena alíquota foi aplicada nas cromatoplasmas de sílica gel 60 com o auxílio de um capilar.

Fase móvel: acetato de etila: metanol: H<sub>2</sub>O (7,7 :1,5: 0,8 v/v/v)

Revelador: Solução de Liebermann - Burchard seguido de acondicionamento das placas, por 5 minutos, em estufa a 100 °C.

Deteção: Aparecimento de zonas marrom escuro a preto a luz visível.

## **15.2 Identificação de compostos produzidos por *P. pubescens* através de ressonância magnética nuclear de prótons (RMN <sup>1</sup>H)**

As análises de ressonância magnética nuclear protônica das frações de *P. pubescens* foram realizadas no Centro de Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal do Paraná, pelo grupo do professor Dr. Andersson Barisson, o qual também realizou a interpretação dos espectros.

O padrão de referência interna foi o tetra metil silano (TMS) e o solvente utilizado foi clorofórmio deuterado (CDCl<sub>3</sub>). As quantidades aproximadas de amostras enviadas para análise foram: fração diclorometano (0,70 g), fração acetato de etila (1,05 g), fração metanol (1,71 g) e fração hidroalcoólica (1,21 g)

## **15.3 Identificação de compostos produzidos por *P. pubescens* através de cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas**

### **15.3.1 Material vegetal**

Para a identificação dos compostos produzidos por *P. pubescens* optou-se por realizar outro método de extração, diferente do utilizado no ensaio de separação dos compostos por fracionamento cromatográfico em coluna. A coleta do material vegetal foi realizada segundo os mesmos princípios e utilizando as mesmas plantas do ensaio citado anteriormente, porém, aqui foram empregados 100 g de material fresco.

### **15.3.2. Processo de extração**

O material vegetal fresco foi fragmentado com o auxílio de uma tesoura e acondicionado em erlenmeyer, onde se adicionam 250 mL de solução metanol:clorofórmio (7:3 v/v). O material foi colocado em banho maria a 50 °C, para extração, por uma hora. Após este período o extrato foi submetido à banho de ultrassom, por um período de 10 minutos. O material foi, então, filtrado em funil de vidro contendo algodão hidrófilo. O filtrado, denominado de extrato bruto, foi

colocado em rotaevaporador para redução próxima a um quarto do seu volume inicial. Posteriormente, o frasco contendo o extrato reduzido foi deixado em capela até a completa evaporação do solvente.

O resíduo obtido foi ressuspenso em 10 mL de metanol grau HPLC, e filtrado em lã de vidro e sulfato de sódio anidro. Com o objetivo de eliminar possíveis resíduos, o material resultante foi centrifugado a 12.000 x *g* por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi recolhido, transferido para frasco de vidro âmbar (10 mL) e armazenado sob refrigeração até o momento das análises.

### 15.3.3 Preparo das amostras para injeção no CG/EM

Antes de serem injetadas no cromatógrafo a gás, a amostra foi filtrada em filtro de seringa Millipore (poros de 0,45  $\mu\text{m}$ ), e em seguida acondicionada em frasco “vial” (2 mL) para injeção automática no aparelho (Cromatógrafo a gás Varian 431-GC acoplado a espectro de massas Varian 210-MS).

Devido às poucas ou inexistentes informações a respeito de análises de materiais provenientes de espécies do gênero *Physalis* através de CG/EM, as condições de análise foram estabelecidas como uma tentativa de indicar o maior número possível de compostos (“varredura geral”).

Quantidade injetada: 3  $\mu\text{L}$

Coluna: VA-S/ 5% Phenyl-methyl Polysiloxane 30 x 0,25 x 0,25m;

Temperatura do injetor: 250 °C;

Rampa de Aquecimento: 60 °C – 3°C min<sup>-1</sup> – 240 °C,

Gás de arraste: Hélio;

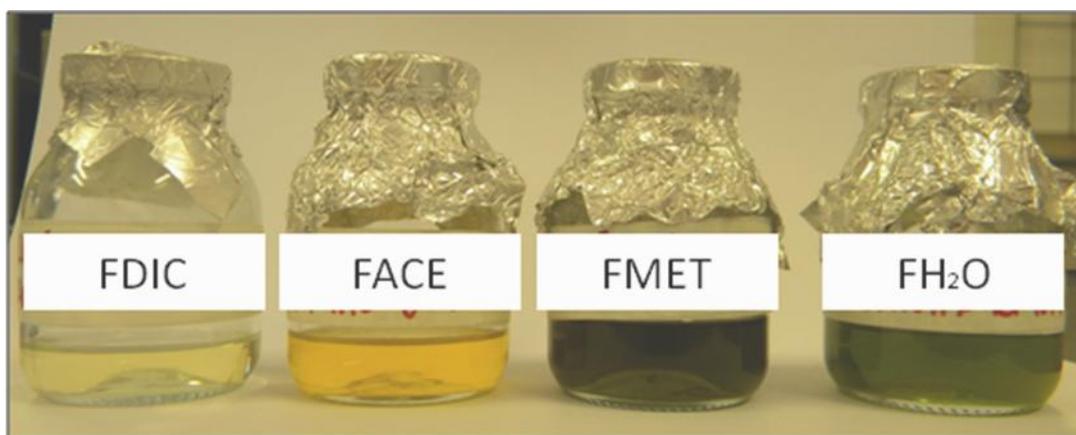
Fluxo: 1  $\mu\text{L min}^{-1}$ ;

Tempo de corrida: 60 minutos.

## 16 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 16.1 Avaliação da presença de compostos do metabolismo secundário de *P. pubescens* por cromatografia em camada delgada (TLC)

Após fracionamento cromatográfico e evaporação dos solventes o rendimento e características das frações foram os seguintes: 1) fração diclorometano (rendimento de 14%), caracterizado pela formação de 0,70 g de um precipitado com tonalidade variando do branco ao amarelo; 2) fração acetato de etila resultou em 21% de rendimento, ou seja, cerca de 1,05 g de um precipitado amarelo ouro; 3) fração metanol gerou um total de 34,2% ou 1,71 g de um precipitado verde escuro, 4) fração hidroalcolica, que teve um rendimento de 24,2%, cerca de 1,21 g de precipitado da mesma coloração. Na Fotografia 12 são apresentadas as respectivas frações antes da secagem completa.



**Fotografia 12** – Aspecto geral das frações obtidas por fracionamento cromatográfico em coluna antes da evaporação dos solventes. Legenda: FDIC (Fração diclorometano); FACE (Fração acetato de etila) FMET (Fração metanol) e FH<sub>2</sub>O (Fração hidroalcolica). UTFPR, Campus Pato Branco, 2011. Fonte: Douglas Alvarez Alamino.

Os resultados apresentados na Tabela 06 se referem à presença ou não de alguns metabólitos secundários em plantas de *P. pubescens*, detectados por análise qualitativa, realizada através de cromatografia em camada delgada (TLC).

**Tabela 06** – Resultados da cromatografia em camada delgada quanto à presença ou ausência de metabólitos secundários no extrato das folhas de *P. pubescens*

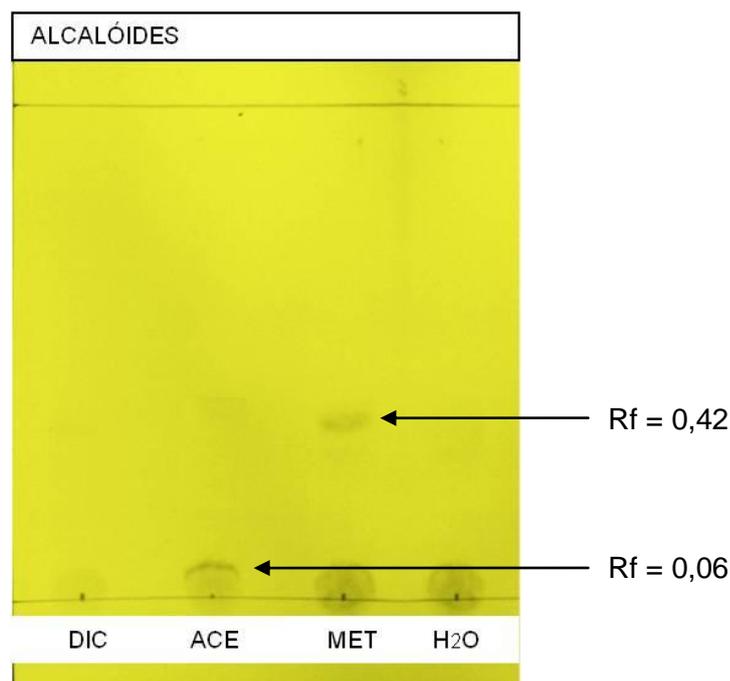
Metabólito secundário	FRAÇÕES			
	FDIC	FACE	FMET	FH <sub>2</sub> O
Alcalóides	-	+	+	-
Cumarinas	+	+	-	+
Fisalinas	-	-	+	-
Óleo essencial	+	+	+	+
Saponinas	-	-	-	+
Triterpenóides	-	-	+	+
Taninos	+	+	+	+

Legenda: FDIC: Fração Diclorometano; FACE: Fração Acetato de Etila; FMET: Fração Metanol; FH<sub>2</sub>O: Fração hidroalcolica. – (ausente), + (presente)

Os alcalóides, quando em contato com o reativo de Dragendorff, apresentaram-se como manchas marrom-acinzentadas, tanto na fração acetato de etila como na metílica, sendo seus valores de Rf 0,06 e 0,42, respectivamente (Fotografia 13).

A presença deste composto em espécies da família Solanaceae foi evidenciada por Lôbo et al. (2010) ao realizarem a prospecção fitoquímica de *Solanum paniculatum* Lam., por Cornelius et al. (2004), os quais isolaram a solasonina de *Solanum crinitum* Lam., e por Griffin et al. (2000) ao avaliarem a presença de alcalóides tropânicos nas famílias Solanaceae, Erythroxylaceae, Proteaceae, Convolvulaceae, entre outras.

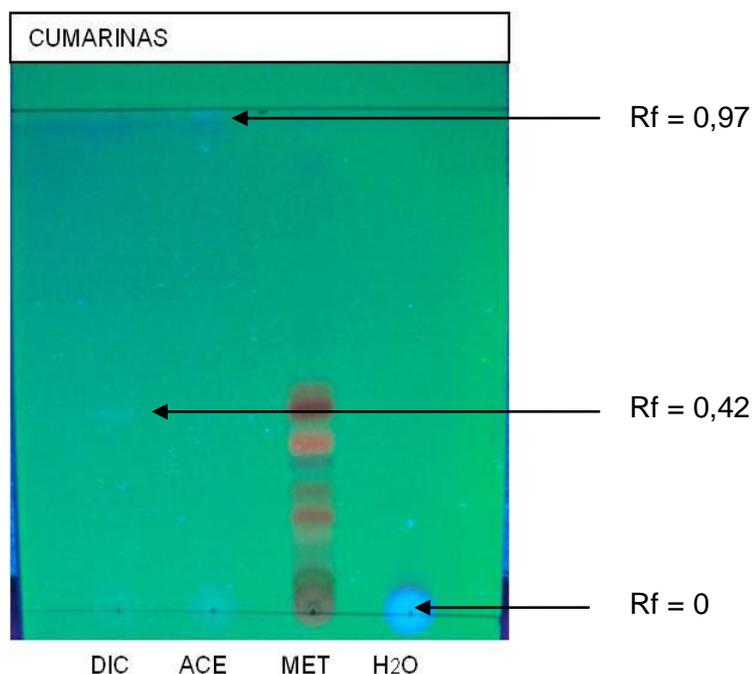
Em espécies do gênero *Physalis* a presença de alcalóides de diferentes grupos foram encontrados por Edeoga et al. (2005) para *Physalis angulata*, os quais constataram também a presença de saponinas, esteróides, glicosídeos, taninos e flavonóides, e por Drost-Karbowska et al. (1993), em *Physalis ixocarpa*, que encontraram, além de alcalóides, os vitanólidos, saponinas, e flavonóides.



**Fotografia 13** – Perfil cromatográfico das frações do extrato bruto de *P. pubescens* para alcalóides. Sistema de solventes para o desenvolvimento e revelação, respectivamente: tolueno:acetato de etila:metanol (7:2:1 v/v/v) e reagente de Dragendorff. Legendas: DIC (fração diclorometano), ACE (fração acetato de etila), ME (fração metanol) e H<sub>2</sub>O (fração hidroalcolólica). UTFPR, Campus Pato Branco, 2011. Fonte: Douglas Alvarez Alamino.

Compostos nitrogenados de sabor amargo e caráter básico, os alcalóides estão entre os compostos ativos mais importantes do ponto de vista farmacológico, característica esta decorrente do seu efeito fisiológico e/ou psíquico sobre o corpo humano (RAVEN et al., 2001). Nos vegetais sua função específica ainda é uma incógnita a ser decifrada; segundo especulações estes compostos poderiam estar relacionados à excreção de substâncias que armazenassem nitrogênio, porém, poucas são as evidências que sustentem esta afirmação (TAIZ; ZEIGER, 2004).

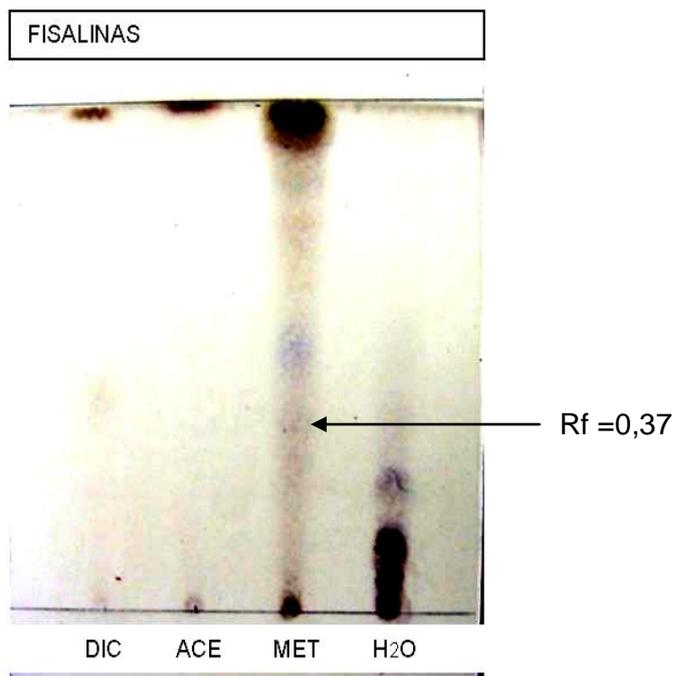
Em relação às cumarinas, a análise fitoquímica revelou a presença destes compostos nas frações diclorometano, acetato de etila e hidroalcolólica, com Rfs de 0,42, 0,97, e 0, respectivamente (Fotografia 14), caracterizados pela fluorescência sob luz UV. A presença destes compostos em Solanaceae também foi constatada por Muñoz-Cendales et al. (2005) os quais isolaram a esculetina e isoescopoletina de *Solanum validinervium*. Rockenbach et al. (2008), que ao avaliarem a composição de ácidos fenólicos e atividade antioxidante em frutos de *P. peruviana* isolaram o ácido *p*-cumárico e *o*-cumárico, compostos estes precursores das cumarinas.



**Fotografia 14** – Perfil cromatográfico das frações do extrato bruto de *P. pubescens* para cumarinas. Sistema de solventes para o desenvolvimento e revelação, respectivamente: tolueno:acetato de etila (9,3:0,7 v/v) e KOH etanólico a 5% + UV (365nm). Legendas: DIC (fração diclorometano), ACE (fração acetato de etila), ME (fração metanol) e H<sub>2</sub>O (fração hidroalcoólica). UTFPR, Campus Pato Branco, 2011. Fonte Douglas Alvarez Alamino.

Segundo Taiz e Zeiger (2004) as cumarinas são lactonas de fenilpropanóides (ésteres cíclicos), originadas da oxidação do ácido *trans* cinâmico, as quais agem na defesa da planta contra insetos herbívoros e fungos. Segundo estes autores, certas cumarinas podem ser altamente fitotóxicas, como é o caso das furanocumarinas, as quais, ao serem fotoativadas se inserem no DNA, bloqueando a transcrição e o reparo do mesmo, o que leva à morte celular.

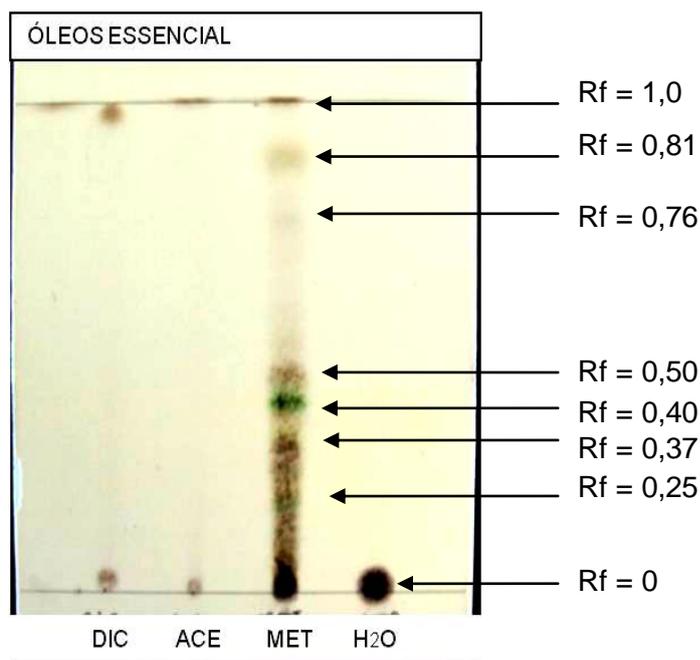
No caso das fisalinas, principal composto de interesse farmacológico do gênero *Physalis*, o aparecimento de uma mancha corada sutilmente de rosa, na fração metanol, com Rf igual a 0,37 (Fotografia 15) indica a presença da mesma no extrato da planta, mesmo que em baixas concentrações, já que em grandes quantidades tende a aparecer como manchas avermelhadas



**Fotografia 15** – Perfil cromatográfico das frações do extrato bruto de *P. pubescens* para fusalinas. Sistema de solventes para o desenvolvimento e revelação, respectivamente: hexano:acetato de etila (3:7 v/v) e reagente fenol sulfúrico. Legendas: DIC (fração diclorometano), ACE (fração acetato de etila), ME (fração metanol) e H<sub>2</sub>O (fração hidroalcoólica). UTFPR, Campus Pato Branco, 2011. Fonte: Douglas Alvarez Alamino.

Segundo Tomassini et al. (2000) as fusalinas são derivados esteroidais do tipo 13,14-seco-16,24 ciclo ergostano, carbonilados em C-15 as quais além da lactona característica apresentam uma outra lactona fundida ao anel D da molécula, sendo por este fato considerado como um composto estruturalmente complexo. Dentre as espécies das quais já foram isoladas fusalinas estão *P. alkekengi*, *P. alkekengi* var *franchetii*, *P. angulata*, *P. Ixocarpa*, *P. lanifoli*, *P. mínima*, *P. peruviana*, *P. phyladelphia*, *P. pubescens* e *P. viscosa*.

Em relação às análises para óleos essenciais, os resultados demonstraram a presença destes compostos complexos após a revelação das placas com o reativo fenol-sulfúrico. O aparecimento de manchas com coloração verde, palha, castanho claro, e marrom intenso, principalmente na fração metanol (Fotografia 16), indica que pode ser grande a variedade de substâncias presentes. A indicação da presença destas substâncias nas frações do extrato das folhas de *P. pubescens* pode estar associada ao grande número de tricomas glandulares distribuídos por toda a lâmina foliar conforme descrito no Capítulo 02.

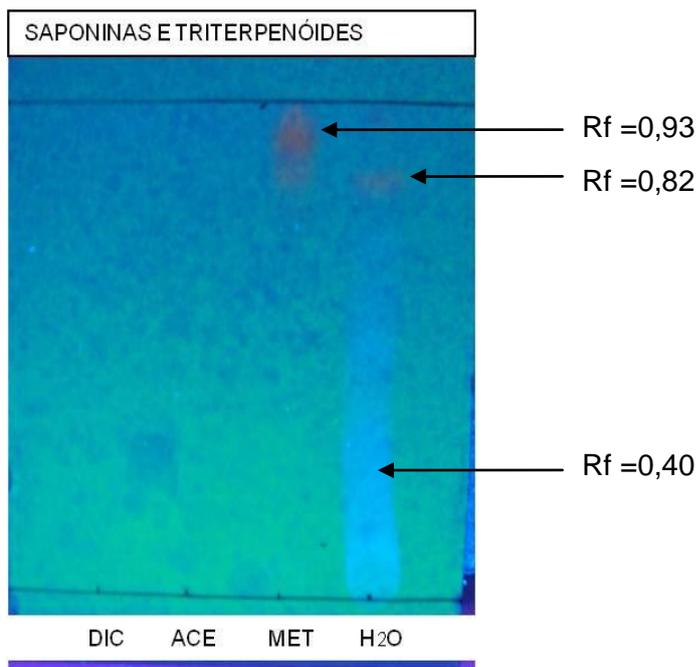


**Fotografia 16** – Perfil cromatográfico das frações do extrato bruto de *P. pubescens* para óleo essencial. tolueno:acetato de etila (93:7 v/v) e reagente fenol sulfúrico. Legendas: DIC (fração diclorometano), ACE (fração acetato de etila), ME (fração metanol) e H<sub>2</sub>O (fração hidroalcolólica). UTFPR, Campus Pato Branco, 2011. Fonte: Douglas Alvarez Alaminio.

Segundo Raven et al (2001) e Taiz e Zeiger (2004) os óleos essenciais são formados pela mistura de mono e sesquiterpenos voláteis. Estes compostos conferem o aroma característico de cada espécie, o que ecologicamente pode funcionar como uma advertência à toxicidade da planta para insetos herbívoros, atração de insetos polinizadores e proteção contra fungos e bactérias.

Saponinas e triterpenóides (Fotografia 17) foram evidenciados pela revelação de manchas azuis e vermelhas, respectivamente, quando as placas foram borrifadas com o reativo de Liebermann – Burchard e na seqüência expostas à luz ultravioleta. Os valores de Rf encontrados para estes metabólitos foram de 0,40 para saponinas, e 0,82 e 0,93 para triterpenóides.

A presença de saponinas em membros da família Solanaceae também foi descritas por Lôbo et al. (2010) ao avaliarem a atividade antibacteriana e prospecção fitoquímica de *Solanum paniculatum* Lam. e *Operculina hamiltonii* (G. Don) D. F. Austin & Staples, do semiárido paraibano e por Araujo et al. (2010) ao realizarem o estudo fitoquímico preliminar e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. do extrato obtido de frutos de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hill (*Solanaceae*).

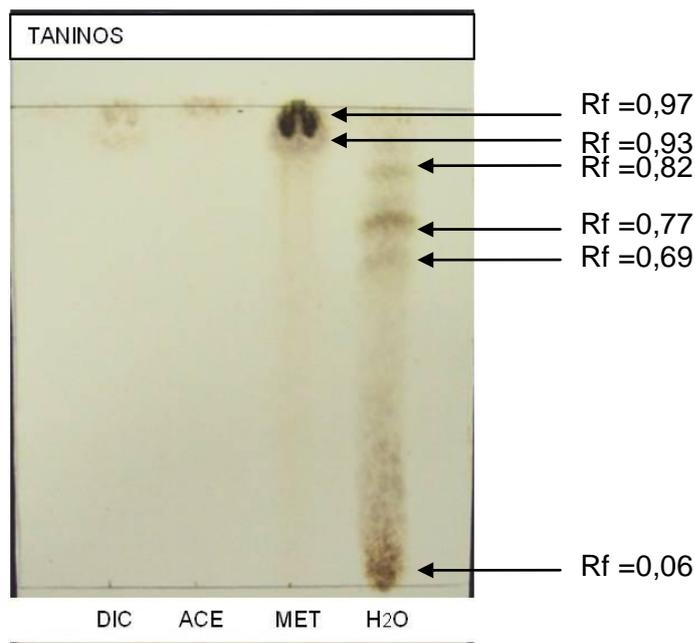


**Fotografia 17** – Perfil cromatográfico das frações do extrato bruto de *P. pubescens* para saponinas e triterpenóides. Sistemas de solventes para o desenvolvimento e revelação, respectivamente: butanol:ácido acético:água (5:1:4 v/v/v) e reagente de Liebermann – Burchard + UV (365nm). Legendas: DIC (fração diclorometano), ACE (fração acetato de etila), ME (fração metanol) e H<sub>2</sub>O (fração hidroalcolica). UTFPR, Campus Pato Branco, 2011. Fonte Douglas Alvarez Alamino.

Os taninos foram os compostos mais representativos, estando presente em todas as frações. Estes apareceram como manchas de tonalidade variável (castanho claro ao preto) quando as placas foram reveladas com o reagente de Liebermann – Burchard, as quais apresentaram diferentes Rfs, sendo o menor valor encontrado 0,06 e o maior 0,97 (Fotografia 18).

Araújo et al. (2010) ao realizarem a análise fitoquímica do extrato etanólico de frutos de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hill (Solanaceae), verificaram a presença de compostos fenólicos, principalmente taninos, e também alcalóides, esteróides livres e saponinas, resultados que confirmam os encontrados no presente trabalho.

Em plantas do gênero *Physalis*, os taninos foram encontrados por Prasão et al. (2009) para *P. mínima*, os quais também detectaram a presença de alcalóides, óleos fixos, resinas, xantoproteínas e glicosídeos.



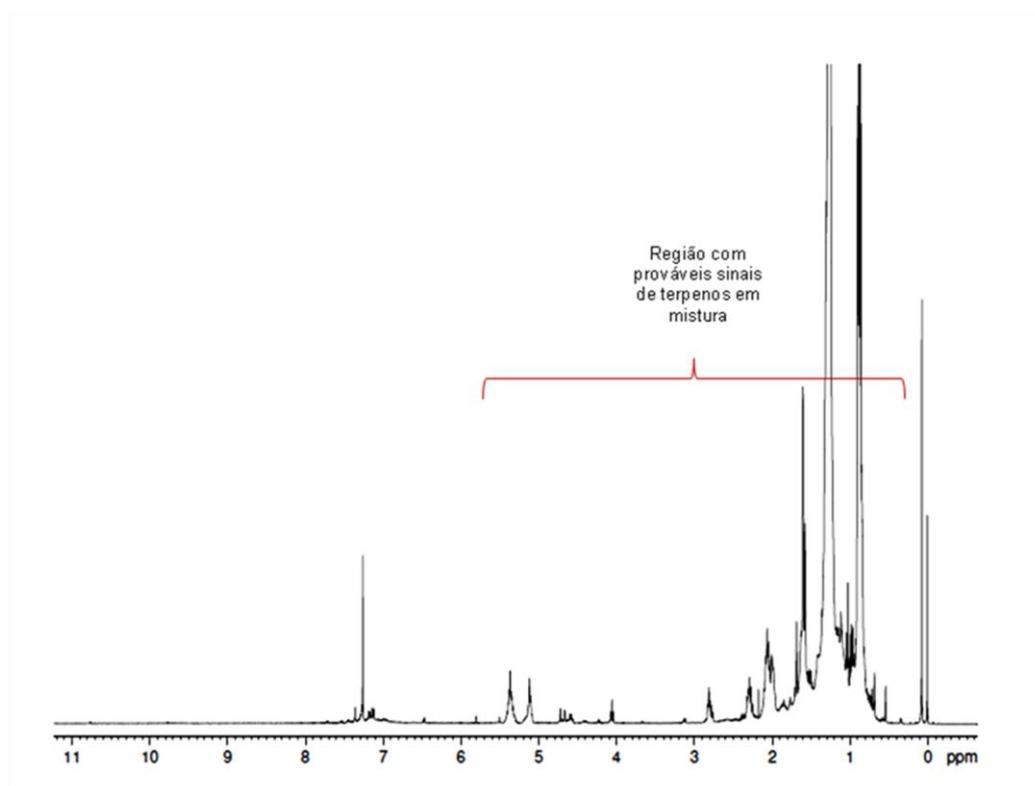
**Fotografia 18** – Perfil cromatográfico das frações do extrato bruto de *P. pubescens* para taninos. Sistemas de solventes para o desenvolvimento e revelação, respectivamente: acetato de etila:metanol:água (7,7:1,5:0,8 v/v/v) e reagente de Liebermann – Burchard. Legendas: DIC (fração diclorometano), ACE (fração acetato de etila), ME (fração metanol) e H<sub>2</sub>O (fração hidroalcoólica). UTFPR, Campus Pato Branco, 2011. Fonte Douglas Alvarez Alamino.

Segundo Mello e Santos (2001), os taninos são de grande interesse econômico e ecológico, visto que possuem a habilidade de formar complexos insolúveis em água com proteínas, gelatinas e alcalóides. Estes compostos são responsáveis pelo caráter adstringente de muitos frutos e produtos vegetais, em função da precipitação de glicoproteínas salivares, fazendo com que esta perca o seu poder lubrificante. Ecologicamente estes compostos fenólicos em vegetais, inibem a herbivoria, tornando frutos, folhas, sementes ou demais tecidos jovens impalatáveis aos fitófagos; além disso, quando combinados a certos tipos de proteínas, os taninos proporcionam aos tecidos vegetais a capacidade de resistência à putrefação (SMITH, 1976).

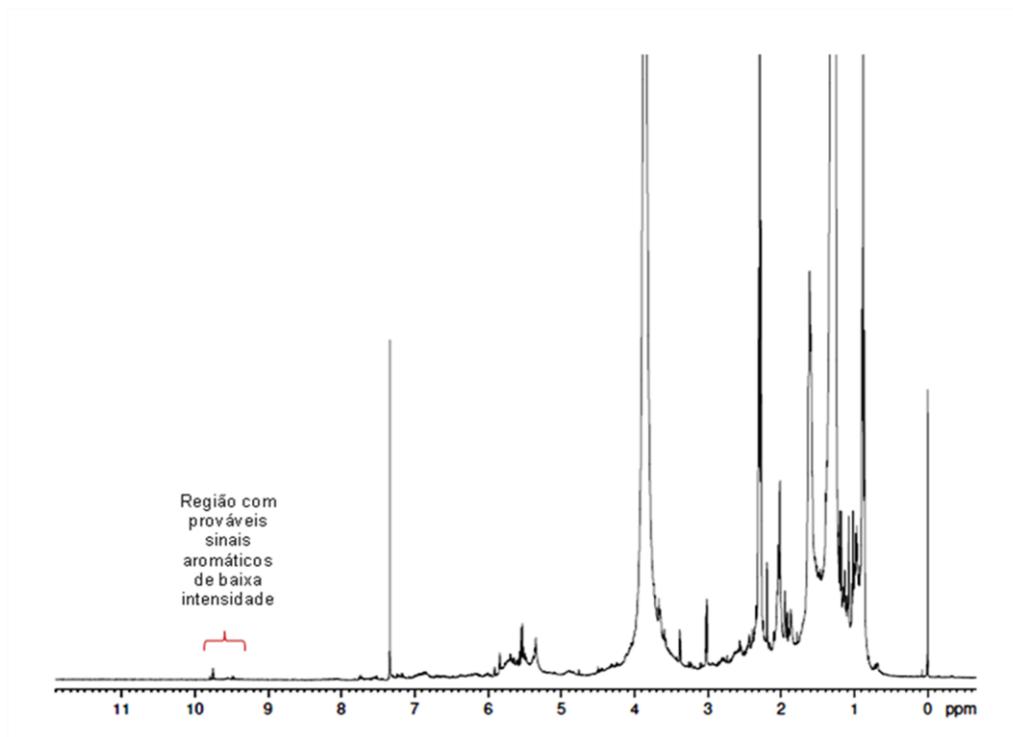
## 16.2 Identificação dos compostos produzidos por *P. pubescens* através de RMN <sup>1</sup>H

As análises de RMN <sup>1</sup>H não permitiram a identificação de compostos de interesse em *P. pubescens*, já que a presença de um alto teor de ácidos graxos nas

amostras interferiu neste processo. Diante disso, foi possível somente a indicação de grupos de compostos, sem a identificação isolada dos mesmos, tais como a presença de triterpenos em mistura nos espectros das frações acetato de etila e metanol, conforme pode ser observado na Figura 04 e compostos aromáticos de baixa intensidade na fração hidroalcolólica (Figura 05)



**Figura 04** – Espectros de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz –  $\text{CDCl}_3$ ) da fração acetato de etila (EtOAc) obtida pelo fracionamento cromatográfico do extrato bruto das folhas de *Physalis pubescens* L. UTFPR, Campus Pato Branco, 2011.



**Figura 05** – Espectros de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz –  $\text{CDCl}_3$ ) da fração hidroalcoólica, obtida pelo fracionamento cromatográfico do extrato bruto das folhas de *P. pubescens*. UTFPR, Campus Pato Branco, 2011.

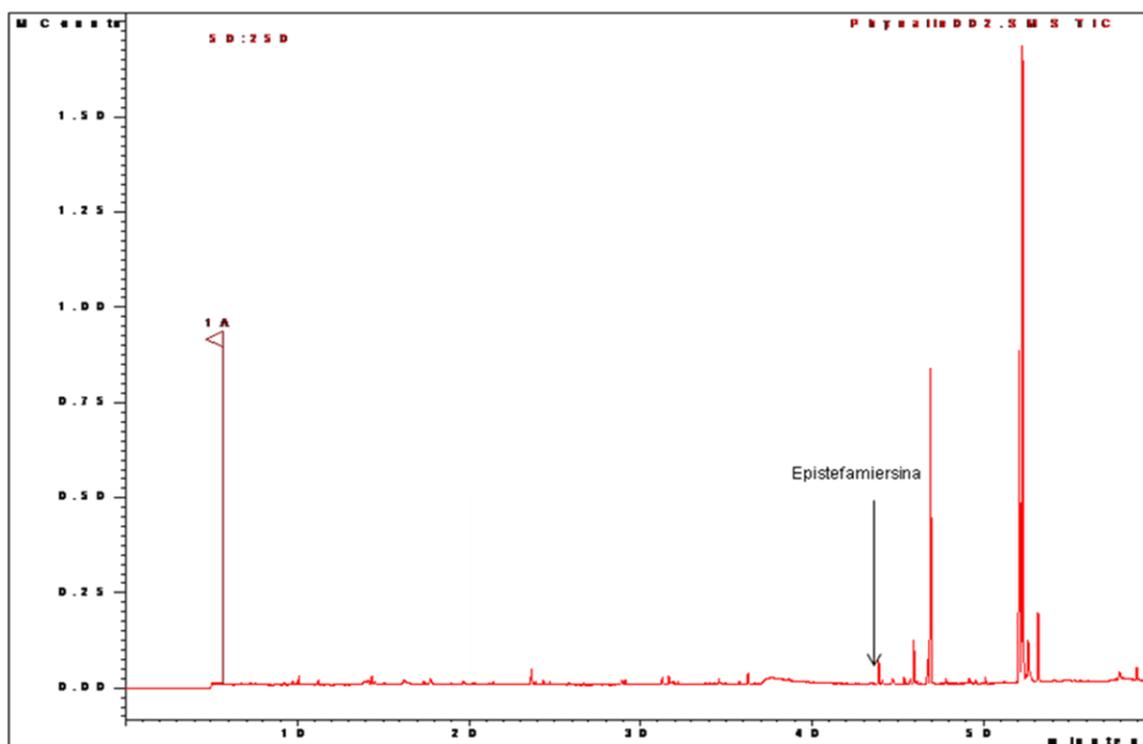
### 16.3 Identificação dos compostos produzidos por *P. pubescens* através de CG/EM

Devido aos resultados não conclusivos sobre os compostos presentes nas frações analisadas por RMN  $^1\text{H}$ , foram feitas análises em CG/EM do extrato bruto de *P. pubescens*. Para tanto, foi realizado um processo de varredura de todos os picos gerados durante as análises.

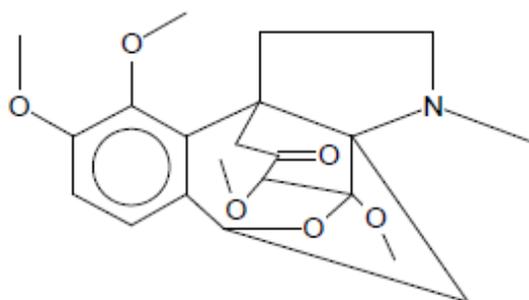
A partir da comparação dos picos (Figura 06) com os dados da biblioteca NIST, foi possível sugerir a presença de um único composto, a epistefamiersina (Figura 07), com pico de retenção aos 44 min e 86% de compatibilidade com a biblioteca. O espectro de massas deste composto é apresentado na Figura 08.

Este é o primeiro registro da presença da epistefamiersina para o gênero *Physalis*; na literatura também são escassos os dados referentes a este composto. Dentre os poucos trabalhos existentes, destacam-se os de Matsui et al. (1975) os quais isolaram a substância, um tipo de alcalóide, dos caules e raízes de *Stephania*

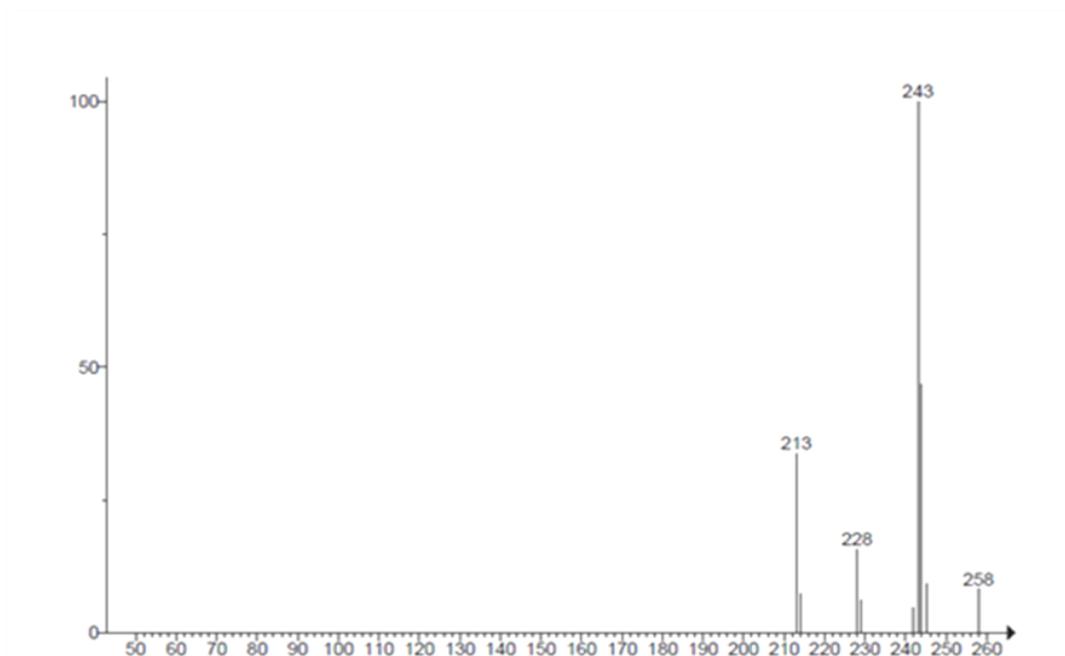
*japonica* Miers (Menispermaceae) de plantas crescendo ao sul do Japão. Em um novo estudo sobre os alcalóides presentes no extrato bruto de folhas sem pecíolos de *S. japônica*, Matsui et al. (1982), constataram que a epistefamiersina não ocorre nem nas folhas e nem em plantas que crescem ao sudoeste do Japão.



**Figura 06** – Cromatograma do extrato bruto das folhas de *Physalis pubescens* L. evidenciando o pico de retenção do composto epistefamiersina. UTFPR, Campus Pato Branco, 2011.



**Figura 07** – Estrutura molecular da epistefamiersina. UTFPR, Campus Pato Branco, 2011.



**Figuras 08** – Espectro de massa do composto epistefamiersina. Fonte: Douglas Alvarez Alamino.

## 17 CONCLUSÕES

- Foram detectadas por TLC, em diferentes frações, a possível presença de alcalóides, cumarinas, fisalinas, óleos essenciais, saponinas, triterpenóides e taninos;
- As análises de RMN  $^1\text{H}$ , não revelaram a presença de compostos isoladamente, mas apenas foram identificadas algumas classes de compostos, entre eles, triterpenos e aromáticos em mistura.
- Por CG/EM foi possível sugerir a presença do alcalóide epistefamiersina no extrato bruto de folhas de *P. pubescens*.

## 18 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A pesquisa fitoquímica preliminar realizada a partir da cromatografia em camada delgada (TLC) com o extrato bruto das folhas de *Physalis pubescens* L. evidenciou, em diferentes frações, a presença de alcalóides, cumarinas, fisalinas, óleos essenciais, saponinas, triterpenoides e taninos. Estes resultados são importantes, pois ajudarão a direcionar as futuras pesquisas, visando a separação, isolamento e identificação de substâncias de interesse.

A presença de um elevado teor de ácidos graxos nas amostras, após fracionamento cromatográfico em coluna, impossibilitou a identificação de compostos do metabolismo secundário em *P. pubescens* por RMN <sup>1</sup>H. Faz-se necessário, para futuras análises, a utilização de métodos de purificação das amostras, evitando a contaminação e/ou presença de compostos que possam interferir no processo.

A separação por cromatografia a gás e posterior identificação por métodos espectrométricos, evidenciou a possível presença de um alcalóide, identificado como epistefamiersina, ainda pouco conhecido, já que só foi encontrado e isolado em uma única espécie de planta da família Menispermaceae. Para comprovar a presença deste composto são necessárias novas análises, por diversos métodos.

## 19 REFERÊNCIAS

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B., et al. **Anatomia Vegetal**. 1. ed., Viçosa: UFV, 438 pág., 2004.

ARAÚJO, M.G.F., et al. Estudo fitoquímico preliminar e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de extrato obtido de frutos de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hill (*Solanaceae*). **Revista Ciência Farmacêutica Básica Aplicada**, v. 31, p. 205 - 209, 2010.

ARAÚJO, N.D., et al. Estudo farmacobotânico comparativo de folhas de *Solanum crinitum* Lam., *Solanum gomphodes* Dunal e *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil., *Solanaceae*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 5, p.1610 - 1619 2010.

BALBUENA, T. S. **Aspectos morfogênicos e metabólitos secundários em *Piper solmsianum* e *Piper aduncum***. 119 f. - Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo – USP, 2006.

BALKEN, J.V. **Plantas da família Solanaceae**. Disponível em: [www.hvanbalken.com/plant.html](http://www.hvanbalken.com/plant.html) Acesso em 25 de julho de 2009.

BERTOLINI, L. C. T. **Delineamento de protocolo experimental para investigação da eficácia terapêutica de ativos de *Physalis angulata* e *Eclipta alba* na prevenção e/ou controle de eimeriose aviária**. 157 f. - Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Aplicada a Saúde), Universidade de Ribeirão Preto, 2007.

BRAUN, H., et al. Produção de mudas de tomateiro por estaquia: efeito do substrato e comprimento de estacas. **IDESIA**, v.28, p. 9-15, 2010.

BRAZ-FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 229-239, 2010.

CARVALHO, L., et al. Solanaceae na Reserva Rio das Pedras, Mangaratiba, Rio de Janeiro – Brasil. **Rodriguésia**, v. 57, n. 1, p. 51-78, 2006.

CHEN, C. M., et al. Withangulatin A, a new withanolide from *Physalis angulata*. **Heterocycles**, v. 31, n. 7, p. 1371-1375, 1990.

CHIANG, H. C., et al. Inhibitory effects of physalin B and physalin F on various human leukemia cells *in vitro*. **Anticancer Research**, v. 12, n. 4, p. 1155-62, 1992.

CORDEIRO, I. Coleta e identificação de plantas para estudos de bioprospecção. In: **Os Avanços da Botânica no Início do Século XXI: Morfologia, Fisiologia, Taxonomia, Ecologia e Genética**, Conferências Plenárias e Simpósios do 57º Congresso Nacional de Botânica, Porto Alegre-RS, p. 550-553, 2006.

CORNELIUS, M. T. F., et al. Solasonina e flavonóides isolados de *Solanum crinitum* Lam. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 85, n. 2, p. 57-59, 2004.

CORREIA, D., et al. **Alternativas de substratos para a formação de porta-enxertos de gravioleira (*Annona muricata*) em tubetes**. Fortaleza: EMBRAPA Agroindústria Tropical, 2001. (Comunicado Técnico, 67).

COSTA, A.F.S., et al. Seleção de Plantas Matrizes de Goiaba, Produção de mudas e normas de condução de viveiros. In: **Tecnologias para produção de goiaba**. Incaper, p.65-88, 2003.

COSTA, L.C.B., et al. Comprimento da estaca e tipo de substrato na propagação vegetativa de atoveran. **Ciência Rural**, v.37, n.4, p. 1157- 1160, 2007.

COUTINHO, É.M.O. **Estudo fitoquímico e de atividade biológica de espécies de *Solanum* (Solanaceae)**. 172f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro - RJ, 2009.

DAMU, A .G., et al. Isolation, Structures, and Structure–Cytotoxic Activity Relationships of Withanolides and Physalins from *Physalis angulata*. **Journal of Natural Products**, v.70, n. 7, p. 1146-1152, 2007.

DROST-KARBOWSKA, K., et al. Phytochemical investigation of the tomatillo fruit (*Physalis ixocarpa* Brot. Solanaceae). **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, v. 62 (3-4), p. 155-159, 1993.

DUTRA, L., et al. Efeito do substrato e da época de coleta dos ramos no enraizamento de estacas de ameixeira (*Prunus salicina* Lindl). **Ciência Rural**, v. 26, n. 3, p. 361-366, 1996.

EDEOGA, H.O., et al. Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. **African Journal of Biotechnology**, v.4, p. 685-688, 2005.

EHLERT, P.A.D., et al. Propagação vegetativa da alfavaca-cravo utilizando diferentes tipos de estacas e substratos. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n.1, p.10-13, 2004.

EICH, E. **Solanaceae and Convolvulaceae: Secondary Metabolites Biosynthesis, Chemotaxonomy, Biological and Economic Significance** (A Handbook), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 644 p., 2008.

ENCYCLOPAÉDIA BRITÂNICA. **Solanaceae**. Disponível em: <http://www.britannica.com> Acesso em 25 de maio de 2010.

FACHINELLO, J. C., et al. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. 2. ed. Pelotas: UFPel, 178p, 1995.

FACHINELLO, J.C., et al. *In*: FACHINELLO, J.C. et al. **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília: Embrapa Informações Tecnológicas, p. 69-109, 2005.

FERNANDES, C., et al. Caracterização físico-hídrica de substratos utilizados na produção de mudas de espécies olerícolas e florestais. **Horticultura Brasileira**, v. 18, p. 469-471, 2000, Suplemento.

FERRAZ, M. V., et al. Caracterização física e química de alguns substratos comerciais. **Acta Scientia Agronomica**, v. 27, n. 2, p. 209 – 214, 2005.

FERREIRA, C. A., et al. Desenvolvimento de mudas de bromélia (*Neoregelia cruenta* (R. Graham) L. B. Smith) cultivadas em diferentes substratos e adubação foliar. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 1, p. 14 – 18, 2005.

FONSECA, T.G. **Produção de mudas de hortaliças em substratos de diferentes composições com adição de CO<sub>2</sub> na água de irrigação**. 2001. 72f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2001.

FRANÇA, S. C. Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas. *In*: SIMÕES, C.M.O., et al. orgs. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. Ed. Florianópolis/Porto Alegre: UFSC/UFRS, p. 499-525, 2001.

FREITAS, T. A., et al. Cultivation of *Physalis angulata* L. and *Anadenanthera colubrina* [(Vell.) Brenan] species of the Brazilian semi-arid. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.8, n. esp., p. 201-204, 2006.

FUMAGALI, E., et al. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 627 – 641, 2008.

GONÇALVES, M.C.R., et al. Berinjela (*Solanum melongena* L.) – mito ou realidade no combate as dislipidemias? **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 16, n. 2, p. 252 – 257, 2006.

GRIFFIN, W.J., et al. Chemotaxonomy and geographical distribution of tropane alkaloids. *Phytochemistry*, v.53, n. 6, p. 623 – 637, 2000.

GUERRA, M. P., et al. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. *In*: SIMÕES, C.M.O. SCHENCKEL, E. P., orgs. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. Ed. Florianópolis/Porto Alegre: p. 13-26, 2001.

HARTMANN, H. T., et al. **Plant Propagation: Principles and Practices**. 7 ed. New York: Englewood Clippis, 880 p., 2002.

HOPPE, J.M., et al. Produção de sementes e mudas florestais. Apostila do Programa de Pós Graduação em Engenharia Florestal, 125 p., 2004.

HOPKINS, G.W., et al. **Introduction to plant physiology**. New York: John Wiley e Sons, 560 p., 2004.

HOSTETTMANN, K., et al. **Princípios ativos de plantas superiores**. Ed. UFSCar, São Carlos, 152 p., 2003.

HUNZIKER, A. T. **Genera Solanacearum**. Germany: Gautner Verlag, v.136. 500 p., 2001.

KAMPF, A. **Produção de comercial de plantas ornamentais**. Guaíba: editora Agrolivros, 2. ed, 256 p., 2005.

KARABOURNIOTIS, G., et al. Penetration of UV-A, UV-B and blue light through the leaf trichome layers of two xeromorphic plants, olive and oak, measured by optical fiber microprobes. **Physiologia Plantarum**, v.105, n. 4, p. 655-661, 1999.

KAUR, S., et al. The in vitro cytotoxic and apoptotic activity of Triphala-an Indian herbal drug. **Journal Ethnopharmacologic**, v.97, n.1, p. 15-20, 2005.

KERBAUY, G.B. **Fisiologia Vegetal**. 1ª edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 452 p., 2004.

LÔBO, K.M.S., et al. Avaliação da atividade antibacteriana e prospecção fitoquímica de *Solanum paniculatum* Lam. e *Operculina hamiltonii* (G. Don) D. F. Austin & Staples, do semiárido paraibano. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 2, p. 227-233, 2010.

LORENZI, H., et al. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, São Paulo, p. 455-456, 2002.

LORENZI, H. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas (de consumo in natura)**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 650 p., 2006.

MACIEL, A. L. R., et al. Aclimatização de plantas de violeta (*Saintpaulia ionantha*. Wendl) obtidas in vitro: efeitos do substrato. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 24, n. 1, p. 9 – 12, 2000.

MAGALHÃES, H. I. F. **Atividade antitumoral (in vitro e in vivo) das fisalinas isoladas de *Physalis angulata* Lin.** 118 f. - Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará – UFC, Fortaleza, 2005.

MAIT, R.K., et al. Some aspects on pharmacognosy of then species of the family solanaceae utilized in traditional medicine. **Caldasia**, v.24, n.2, p. 317 – 321, 2002.

MALAVOLTA, E., et al. **Nutrição mineral e adubação de plantas cultivadas**. 272 p., São Paulo: Pioneira, 1974.

MARSCHNER, H. Mineral nutrition of higher plants. 2 ed, 889p. London: Academic Press, 1995. In: OLIVEIRA, A.B., et al. Absorção de nutrientes em mudas de berinjela cultivadas em substratos alternativos. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 39, n. 4, p. 583-589, 2008.

MARTINS, A.B.G. **Enraizamento de estacas enfolhadas de três variedades de lichia *Litchi chinensis* Sonn.** 100 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal-SP, 1998.

MATSUI, M., et al. Alkaloids of the leaves of *Stephania japonica*. **Journal of Natural Products**, v. 45, n. 4, p. 497-500, 1982.

MATSUI, M., et al. Tetrahedron Lett. Idem, Chem. Pharm. Bull. v.23, n. 1323, 1975. In: MATSUI, M. e WATANABE, Y. Carbon-13 NMR spectra of some hasubanan alkaloids. **Journal of Natural Products**, v. 45, n. 4, p. 497-500, 1982.

MELLO, J. P. C., et al. In: SIMÕES, C.M.O. SCHENCKEL, E. P., orgs. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. Ed. Florianópolis/Porto Alegre: UFSC/UFRS, p. 499-525, 2001.

MENDES, M. M. **Estudo da ação antiofídica e da toxicidade aguda do extrato aquoso de *Schizolobium parahyba***. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 74 p., 2007.

MONTEIRO, J.M., et al. Taninos: uma abordagem da química a ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892 – 896, 2005.

MUÑOZ-CENDALES, D. R., et al. Paislamiento y estructura de algunos metabolitos secundários de *Solanum validinervium* (Solanaceae) sección geminata. **Actual Biología**, v. 27 (Supl. 1), p. 49-52, 2005.

NEGREIROS, J.R.S., et al.. Influência de substratos na formação de porta-enxerto de gravioleira (*Annona muricata* L.) **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, n. 3, p. 530-536, 2004.

NICOLI, P. M. **Micropropagação e aspectos fitoquímicos de calos de barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) - Coville] – FABACEAE**. 103 f. - Dissertação (Mestrado Agronomia) – Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras, 2006.

NURIT-SILVA, K., et al. Estudo farmacobotânico comparativo entre *Nicandra physalodes* e *Physalis angulata* (Solanaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 344 – 351, 2005.

NURIT-SILVA, K., et al. Estudo Morfoanatômico de Órgãos Vegetativos de *Solanum caavurana* Vell. (Solanaceae) **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, n. 5, p. 675-81, 2009.

NURIT-SILVA, K., et al. Estudo Farmacobotânico de Folhas de *Nicotiana glauca* (Solanaceae) **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 4, p. 499-506, 2007.

OKSMAN-CALDENTY, K.M., et al. Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. **Trends in Plant Science**, v. 9, p. 433-440. 2004.

OKUMURA, H. H., et al. Efeito dos compostos orgânicos e minerais em substratos na germinação de sementes de gravioleira var. Lisa. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, p.17. **Anais**. Belém: SBF, 2002.

OLIVEIRA, A. F., et al. Enraizamento de estacas semilenhosas de oliveira sob efeito de diferentes épocas, substratos e concentrações de ácido indolbutírico **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 1, p. 117-125, 2003.

OLIVEIRA, A.B., et al. Absorção de nutrientes em mudas de berinjela cultivadas em substratos alternativos. **Revista Ciência Agronômica**, v. 39, n. 4, p. 583-589, 2008.

OLIVEIRA, I. V. M., et al. Temperatura na germinação de sementes de Sapota Preta. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 5, n. 2, 2005.

OVANDO, E. Y. A. **Estudio Fitoquímico Exploratorio de *Peperomia cuchumatana* Véliz y *Peperomia moralesii* Véliz (Piperaceae), Especies Endémicas de Guatemala**. 74 f. - Monografia (Graduação em Química) - Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala, 2007.

PEDROSO, A.N.V., et al. Anatomia foliar comparativa das cultivares de *Nicotiana tabacum* L. (Solanaceae) sensível e tolerante ao ozônio **Acta Botânica Brasileira**, v. 22, n. 1, p. 21-28, 2008.

PÉREZ-CASTORENA, A. L., et al. Physalins from *Physalis solanaceus*. **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 32, p.1231–1234, 2004.

POTIGUARA, R.C.V. A diversidade amazônica sob o olhar da anatomia vegetal. In: **Diversidade Vegetal Brasileira: Conhecimento, conservação e uso.** Conferências, Simpósios e Mesas redondas do 61º Congresso Nacional de Botânica, Manaus-AM, p. 281-284, 2010.

POMILIO, A.B., et al. Toxic chemical compounds of the Solanaceae. **Natural Product Communications**, v. 3, n. 4, p. 593-628, 2008.

PRATES, M.V., et al. Peptídeos antimicrobianos: uma alternativa no combate a microrganismos resistentes. **Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento**, v. 17, p. 30-36, 2000.

PRASAO, S.H.K.R., et al. Preliminary phytochemical and antimicrobial spectrum of cultured tissues of *Physalis mínima* L. **International Journal of Chemical Sciences**, v. 7, n. 4, p. 2719 - 2725, 2009.

QIU, L., et al. Steroids and flavonoids from *Physalis alkekengi* var. *franchetii* and their inhibitory effects on nitric oxide production **Journal Natural Products**. v. 71, p. 642 – 646, 2008.

RAVEN, P. H., et al. **Biologia Vegetal**. 6º ed, Rio de Janeiro: Guanabara e Koogan, 906 p., 2001.

ROCKENBACH, I. I., et al. Ácidos fenólicos e atividade antioxidante em frutos de *Physalis peruviana* L. **Alimento e Nutrição**, v. 19, n. 3, p. 271 - 276, 2008.

RODRIGUES, G.C. Aspectos fisiológicos da propagação de fruteiras. In: PINTO, A.C.Q. (Coord.). **Produção de mudas frutíferas sob condições do ecossistema de Cerrados**. Embrapa-CPAC, p. 29-33. (Documentos 62), 1996.

RUFATO, L., et al. **Aspectos técnicos da cultura da physalis**. Pelotas: UDESC, 101p., 2008.

SAHAI, M. Pubesenolide, a new withanolide from *Physalis pubescens*. **Journal of Natural Products**, v. 48, n. 3, p. 474-476, 1985.

SANTOS, J. A. A., et al. Molluscicidal activity of *Physalis angulata* L. extracts and fractions on *Biomphalaria tenagophila* (d'Orbigny, 1835) under laboratory conditions. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 3, p. 425-428, 2003.

SCHIMITZ, J. A. K., et al. Propriedades químicas e físicas de substratos de origem mineral e orgânica para o cultivo de mudas em recipientes. **Ciência Rural**, v.32, n.6, p. 937 – 944, 2002.

SCHNEIDER, E.P., et al. Ações para o desenvolvimento da produção orgânica de pequenas frutas na região dos Campos de Cima da Serra, RS, Brasil. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 2, p. 245 - 248, 2007.

SKALTSA, H., et al. UV-B protective potential and flavonoid content of leaf hairs of *Quercus ilex*. **Phytochemistry**, v. 37, n. 4, p. 987 - 990, 1994.

SMITH, P. M., et al. The Chemotaxonomy of Plants, Edward Arnold (Publishers) Limited: England. 1976. *In*: MONTEIRO, J.M; ALBUQUERQUE, U.P e ARAÚJO, E. L. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892 - 896, 2005.

SOUZA, M.M., et al. Avaliação de substratos para o cultivo de crisântemo (*Chrysanthemum morifolium* Ramat., compositae) 'white polaris' em vasos. **Revista Brasileira de Horticultura e Ornamental**, v. 1, n. 2, p. 71 - 77, 1995.

STEHMANN, J. R., et al. **Riqueza e endemismo de Solanaceae na Região Sul do Brasil**, *In*: Anais do 57 Congresso Nacional de Botânica "Os avanços da Botânica no início do século XXI: morfologia, fisiologia, taxonomia, ecologia e genética. Gramado, 2006, p. 190 – 193.

SU B. N., et al. Isolation and characterization of bioactive principles of the leaves and stems of *Physalis philadelphica*. **Tetrahedron**, v. 58, p. 3453 – 3466, 2002.

TAIZ, L., et al. **Fisiologia Vegetal**. 3º ed, São Paulo: Artmed, 719 p., 2004.

TAYLOR, L. **Mullaca**. Disponível em: <http://www.rain-tree.com/mullaca.htm> Acesso em 20 de abril de 2009.

TOMASSINI, T. C. B., et al. Gênero *Physalis* – Uma revisão sobre vitaesteróides. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 47-57, 2000.

VERAS, M. L., et al. Cytotoxic Withaphysalins from the leaves of *Acnistus arborescens*. **Journal Natural Products**, v. 67, n. 4, p. 710 - 713, 2004.

WAGNER, H., et al. **Plant drug analysis – a thin layer chromatography atlas**. 2 ed. Heidelberg: Springer-Verlag, 386 p., 1986.

WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M., et al. **Thin layer chromatography in phytochemistry**. Chromatographic Science Series, New York, v. 99, 888 p., 2008.

WINK, M. **Annual Plant Reviews: functions and biotechnology of plant secondary metabolites**. Oxford: Wiley-Blackwell, 2 ed., v. 39, p. 1 - 16, 2010.

WOODWARD, A.W., et al. Auxin: regulation, action, and interaction. **Annals of Botany**, v. 95, p. 707 – 735, 2005.

ZIETEMANN, C., et al. Produção de mudas de goiabeira (*Psidium guajava* L.) em diferentes substratos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, n. 1, p. 137 – 142, 2007.