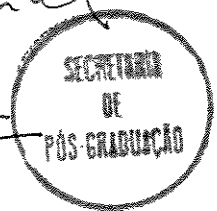


Este exemplar corresponde à edição final da
tese defendida pela candidata Maria
Luiza D. Villar e aprovada pela Comissão



Julg. Rec.
10/9/91
[Handwritten signature]

MARIA LUIZA DOMINGUES VILLAR

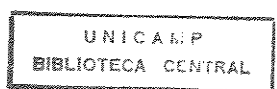
CONTEÚDO ENDÓGENO
DE ROTENONA E PACHYRHIZINA EM
Pachyrhizus tuberosus (Lam.) Spreng.

Tese apresentada ao Ins-
tituto de Biologia da
Universidade Estadual de
Campinas para a obten-
ção do título de Doutor
em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. IVANY FERRAZ MARQUES VALIO†

CAMPINAS

1991



Aos meus pais e irmãs, pela de-
voção, compreensão e carinho
nos momentos mais difíceis.

À Raquel, minha alegria

À minha Madrinha e sua família,
pela energia

DEDICO

AGRADECIMENTOS.

Ao Professor Dr. Ivany Ferraz Marques Válio, pela orientação, pelos ensinamentos transmitidos, assim como pela sua compreensão, paciência e amizade durante a realização deste trabalho.

A Professora Dra. Eva G. Magalhães e sua aluna Beatriz Helena L. N. Sales, do Instituto de Química da UNICAMP, pelo interesse e auxílio prestados, pelas sugestões valiosas, e incentivo dado durante o transcorrer deste trabalho.

Ao Professor Dr. Anibal E. Vercesi e principalmente ao seu aluno Prof. Marco Aurélio Pedron e Silva do Departamento de Bioquímica, pelo auxílio e orientação para avaliar a atividade respiratória de mitocôndrias vegetais.

A Profa. Dra. Ana Maria Monteiro, Prof. Dr. Paulo Mazzafera e Prof. Dr. Alan Crozier pelo auxílio prestados e sugestões durante a análise cromatográfica.

Aos professores Drs. Maria de Fátima A. Pereira e Luiz G. Santoro, pelas sugestões dadas neste trabalho.

Ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, à Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico, (CNPq) e a Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro que permitiu a elaboração desta pesquisa.

Aos professores, funcionários e colegas do Departamento de Fisiologia Vegetal da Universidade Estadual de Campinas, pelo apoio, estímulo e amizade. Em especial, a Dalila Figueiredo, Luísa Angélica Pereira Vasconcelos e Edna Scola Klein.

A todos os amigos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

SUMÁRIO.

	página
I. Introdução.....	01
II. Material e Métodos.....	11
1. Material biológico.....	11
2. Métodos.....	11
2.1. Germinação de sementes.....	11
2.2. Caracterização do crescimento de <i>P. tuberosus</i>	13
2.2.1. Peso de matéria fresca.....	14
2.2.2. Peso de matéria seca.....	14
2.2.3. Medidas de comprimento.....	14
2.3. Efeito de rotenona, pachyrhizina, e do exsudato das sementes na germinação e durante o crescimento inicial dos eixos embrionários isolados de <i>P. tuberosus</i>	15
2.4. Efeito de rotenona e pachyrhizina na atividade respi- tória de mitocôndrias isoladas de <i>P. tuberosus</i>	16
2.4.1. Tratamento das sementes.....	16
2.4.2. Isolamento de mitocôndrias.....	16
2.4.3. Meios de reação.....	17

2.4.4.Determinação de proteína.....	17
2.5.Extração e dosagem de rotenona e pachyrhizina.....	18
2.5.1.Preparação de extratos a partir dos eixos em- brionários e cotilédones isolados de <i>P.</i> <u>tuberosus</u>	20
2.5.2.Preparação de extratos a partir de folhas pri- márias de <i>P.</i> <u>tuberosus</u>	21
2.5.3.Preparação de extratos a partir do exsudato da seiva do caule e do pedúnculo da inflores- cência de <i>P.</i> <u>tuberosus</u>	21
2.5.4.Preparação de extratos a partir dos frutos das plantas de <i>P.</i> <u>tuberosus</u>	22
2.5.5.Preparação de extratos a partir de raízes das plantas de <i>P.</i> <u>tuberosus</u>	22
2.5.6.Dosagem de rotenona e pachyrhizina das plantas de <i>P.</i> <u>tuberosus</u>	22
2.6.Análise Estatística.....	23
III. Resultados e Discussão.....	25
3.1.Estabelecimento do método de dosagem para rotenona e pachyrhizina em <i>P.</i> <u>tuberosus</u>	25
3.2.Extração e dosagem de rotenona e pachyrhizina em <i>P.</i> <u>tuberosus</u>	31
3.2.1.Eixo embrionário e cotilédone isolado.....	33
3.2.2.Folhas primárias de <i>P.</i> <u>tuberosus</u>	46
3.2.3.Exsudato do caule de <i>P.</i> <u>tuberosus</u>	50

3.2.4. Frutos de <u>P. tuberosus</u>	50
3.2.5. Raiz tuberosa das plantas de <u>P. tuberosus</u>	51
3.3. Efeito de rotenona e pachyrhizina, bem como do exsudato das sementes na germinação de <u>P. tuberosus</u>	53
3.4. Efeito de rotenona e pachyrhizina na atividade respiratória de mitocôndrias isoladas de <u>P. tuberosus</u>	65
IV. Conclusões.....	77
V. Resumo.....	80
VI. Referências bibliográficas.....	84

I. INTRODUÇÃO.

Pachyrhizus tuberosus (Lam.) Spreng., também conhecida como feijão Macuco ou Jacatupé é uma das cinco espécies do gênero Pachyrhizus da família Leguminosae. De acordo com os estudos biosistemáticos feitos por SORENSEN (1988 e 1990) é caracterizada como uma das espécies cultivada deste gênero. Parece ser nativa da região Amazônica e é largamente cultivada nesta região. SORENSEN (1990), discute a dificuldade na determinação da distribuição natural do P. tuberosus, pois é uma espécie cultivada há muito tempo, e tem sido introduzida em várias áreas.

As plantas de P. tuberosus são herbáceas atingindo aproximadamente 10m de comprimento, possuem folhas bem desenvolvidas e inflorescências com tamanho de 7 a 29cm de comprimento, e com 7 a 23 flores roxas por eixo floral. Suas vagens chegam até 23cm de comprimento, com sementes reniformes. Uma das vantagens desta espécie em relação às outras quatro, é que P. tuberosus, em geral, tolera alto nível de precipitação de água (SOSENSEN, 1990). De acordo com ALVARENGA & VALIO (1989), a floração e tuberização nesta espécie são controladas provavelmente por outros fatores ambientais, além dos regimes foto e termoperiódicos. É possível que a resposta, através de mecanismos intrínsecos, ocorra somente

quando esta espécie alcança altas latitudes, pela sua dispersão natural.

Atualmente, *P. tuberosus* é uma das principais espécies utilizada na alimentação de habitantes da região Amazônica (NODA *et al.*, 1984). Seu potencial nutritivo está nas raízes tuberosas que contém cerca de 6.5% a 8.9% de proteínas e 20% de amido (ALVARENGA, 1987). NODA *et al.* (1984), evidenciaram que o Jacatupé é uma espécie bem adaptada às condições úmidas, solos pobres e ácidos, com um bom rendimento de raízes com cerca de 15 a 20t/ha e média de 2 a 3kg por planta. Embora as sementes produzidas por esta planta sejam ricas em proteínas e lipídeos, estas apresentam um alto nível de isoflavonóides (rotenona e pachyrhizina), substâncias tóxicas ao consumo humano (MAGALHÃES *et al.* 1987; MAGALHÃES *et al.* 1988; ALVARENGA & VÁLIO, 1989).

Os metabólitos secundários foram, durante muito tempo, considerados produtos finais de processos metabólicos que eram acumulados em vacúolos ou outras partes da planta. Atualmente, acredita-se que estas substâncias estejam de algum modo, diretamente relacionadas com os processos fisiológicos dos vegetais, desempenhando muitas vezes, uma função definida na sobrevivência destes (SCHOONHOVEN, 1972).

Os flavonóides, uma das inúmeras classes de metabólitos secundários, apresentam as mais diversas funções no organismo vegetal. Constituem o grupo mais importante de corante em plantas, sendo responsáveis pela maioria das cores apresentadas pelas flores e frutos. Acredita-se que a função principal dos flavonóides

é a de atrair insetos e pássaros, com a finalidade de polinização e dispersão de sementes. Estes pigmentos compreendem as antocianinas, chalconas, auronas, certos flavonóis e flavonas (HARBORNE, 1967). Alguns flavonóides participam dos processos que atuam no crescimento vegetal. Em Pisum, por exemplo, o kaempferol é um cofator da enzima indolacético-oxidase, inibindo o crescimento, enquanto que a quercitina inibe esta enzima, estimulando o crescimento desta espécie (HARBORNE, 1967 e McCLURE, 1975).

Dentre os flavonóides, o grupo dos isoflavonóides destaca-se por possuir substâncias farmacologicamente ativas, como o equol presente no trevo Trifolium subterraneum. O equol é o principal produto de metabolização da formononetina no organismo animal, interferindo no ciclo estral de ovelhas que se alimentam desta espécie (WONG, 1975). Cumestrol, considerado um isoflavonóide muito ativo, isolado em 1957 de Medicago sativa e de Trifolium repens, possui propriedades estrogênicas (McCLURE, 1975). A rotenona, presente nas raízes de Derris, possui atividade inseticida e, juntamente com outros rotenóides, ictiotóxica (WONG, 1975 e McCLURE, 1975).

Os rotenóides, ao contrário dos flavonóides, possuem distribuição restrita a algumas famílias como Leguminosae, Rosaceae e Moraceae (HARBORNE, 1971). Cerca de quinze rotenóides são atualmente conhecidos, como por exemplo rotenona, pachyrhizona, dolineona, erosona, deguilina, elliptona e outros (WONG, 1975). Os compostos relacionados ao grupo dos rotenóides tem sido bastante estudados. A rotenona foi a primeira substância a ser iso-

lada e parece que tem maior distribuição nos vegetais superiores. É um inseticida natural encontrado em algumas espécies de Leguminosae como Derris, Lonchocarpus, Tephrosia e Pachyrhizus (NORTON, 1943; HANSBERRY *et al.* 1947; KRISHNAMURTI *et al.* 1970; HARBORNE, 1971; MENECHINI *et al.* 1982; BUSHWAY, 1984; BUSHWAY *et al.* 1985; BIRCH *et al.* 1985; MAGALHAES *et al.* 1987; MAGALHAES *et al.* 1988).

As primeiras investigações sobre a estrutura e componentes das substâncias conhecidas como rotenóides foram feitas a partir de 1912. Nesta época Nagai isolou e identificou, a partir de Derris chinensis, uma substância que denominou de rotenona, e ao redor de 1916, Ishikawa isolou, de Derris elliptica, uma substância que denominou de tuboxina. Posteriormente, Kariyone e Kondo, em 1923, verificaram que rotenona e tuboxina eram idênticas. Em 1929, Takei e Koide propuseram a correta estrutura molecular da rotenona e em 1932 ficou estabelecida simultaneamente a estrutura molecular desta substância em quatro laboratórios independentes (FUKAMI & NAKAJIMA, 1971).

Este inseticida, rotenona, é bastante usado em jardins, casas de vegetação e principalmente no controle de população de peixes (BUSWAY *et al.* 1985). Em Derris, as substâncias tóxicas são encontradas principalmente em suas raízes. Entretanto, o emprego dessas raízes para a extração de substâncias tóxicas utilizadas na agricultura está sendo cada vez mais reduzido desde a descoberta do DDT e outros inseticidas sintéticos, resultando em sérios problemas em relação aos seus resíduos, sem contar que um

grande número de insetos tem desenvolvido resistência a eles (FUKAMI & NAKAJIMA, 1971).

Parece que os rotenóides possuem toxicidade inferior nos mamíferos, sendo a dose letal de 50% por 3gkg^{-1} nos coelhos, mas é extremamente potente para os insetos e peixes com cerca de $1\mu\text{gkg}^{-1}$ (FUKAMI *et al.* 1967). De acordo com os resultados sugeridos por esses autores parece que rotenona possui fácil degradação em diferentes espécies, indicando haver um processo metabólico seletivo à toxidez. Entretanto, são necessários estudos bioquímicos adicionais, para um melhor esclarecimento deste processo seletivo.

Rotenona tem um valor especial como inseticida no controle de pragas que atacam principalmente as folhas das plantas. Promovem uma ação inibitória no sistema de transferência de elétrons nas mitocôndrias dos animais e vegetais (LINDAHL & OBERG, 1961; OBERG, 1961; FUKAMI & NAKAJIMA, 1971; MARX & BRINKNANN, 1978; JOHNSON-FLANAGAN & SPENCER, 1981; RAVANEL *et al.* 1984). Acredita-se que alguns inibidores, tais como rotenona, inibem a oxidação do NADH endógeno em mitocôndrias de animais. Porém, causam somente parcial e algumas vezes uma leve inibição no sistema da cadeia respiratória dos vegetais (IKUMA & BONNER, 1967 e PALMER, 1976). JOHNSON-FLANEGAN & SPENCER (1981), demonstraram que, em cotilédones de *Pisum sativum*, rotenona à $20\mu\text{molesl}^{-1}$ inibiu totalmente o consumo de oxigênio. Este efeito inibitório foi observado também em couve-flor e batata doce por WISKISH & DAY (1982), os quais verificaram que a rotenona inibiu todos os subs-

tratos ligados ao NAD, causando uma redução em cerca de 30% na taxa de consumo de oxigênio. RAVANEL *et al.* (1984), demonstraram o efeito de vários rotenóides em plântulas estioladas de Phaseolus aureus e tubérculos de Solanum tuberosum. De acordo com os autores, pode haver uma inibição seletiva dos vários rotenóides como deguelina, elliptona, rotenona e 12-hidroxirotenona, caracterizada no complexo I da cadeia transportadora de elétrons.

O efeito da rotenona é observado na cadeia transportadora de elétrons (IKUMA & BONNER, 1967; DOUCE *et al.* 1972; DOUCE, 1985; DOUCE & NEUBURGER, 1989). O fluxo de elétrons foi reduzido em 29% na presença de rotenona em mitocôndrias de batata (ARRON & EDWARDS, 1980). Segundo JOHNSON-FLANEGAN & SPENCER, (1981) e RAVANEL *et al.* (1984), esta substância atua em dois sítios, na NADH-desidrogenase associada a malato-desidrogenase e na enzima málica. A inibição do primeiro sítio pelo acúmulo de NADH reduz o consumo de oxigênio. Na cadeia transportadora de elétrons, o mecanismo e o significado fisiológico das enzimas resistentes a rotenona que oxidam o NADH, permanecem ainda incertos (DOUCE, 1985; DOUCE & NEUBURGER, 1989).

Nada se conhece em relação ao efeito da pachyrhizina nas atividades respiratórias. Este isoflavonóide não pertence ao grupo dos rotenóides, mas se apresenta em grande quantidade nas sementes de Pachyrhizus erosus e Pachyrhizus tuberosus (MEIJER, 1936; NORTON, 1943; HANSBERRY *et al.* 1947; SCHROEDER, 1968; KRISHNAMURTI *et al.* 1970; BORTOLATO *et al.* 1985; MAGALHAES *et al.* 1987 e MAGALHAES *et al.* 1988).

Pachyrhizus erosus é praticamente a única espécie com a qual se tem trabalhos com os compostos que possuem propriedades inseticidas e fungicidas (SORENSEN, 1990). KRISHNAMURTI *et al.* (1970), verificaram que a toxicidade das sementes de Pachyrhizus erosus é comparável aos rotenóides extraídos das raízes de Deris. A partir dessas sementes, cultivadas na Índia, isolaram quatro rotenóides (rotenona, dolineona, erosona e pachyrhizona) e duas furano-3-fenilcumarinas como a pachyrhizina e erosona.

A parte aérea de Pachyrhizus erosus contém de 0.12% a 0.43% de rotenona em relação a matéria seca, e as sementes maduras são ricas em proteínas e lipídios, com cerca de 26.2% e 27.2% respectivamente. Entretanto, estas sementes são impróprias ao consumo humano (HANSBERRY *et al.* 1947). As sementes imaturas cozidas, com aproximadamente duas semanas de idade são consumidas por coelhos e humanos na América Central e Filipinas (SCHROEDER, 1968). A rotenona não está presente no tubérculo desta espécie, que contém glicose, frutose e amido, podendo ser consumido cru ou cozido (ZINSOU, *et al.* 1987a). Portanto, há um interesse econômico em relação aos tubérculos e sementes imaturas desta espécie. A parte verde pode ser utilizada como forrageira, melhorando as propriedades químicas e físicas nos solos tropicais, via formação da matéria orgânica. ZINSOU *et al.* (1987b), observaram que a aplicação de substâncias de crescimento como o ácido gibbérelico no decorrer do crescimento de P. erosus favoreceu o desenvolvimento do tubérculo, aumentando o rendimento em açúcares solúveis totais. Mas de acordo com estes autores, os resultados

mostram também que a composição de substâncias do tubérculo varia em função das condições climáticas e práticas de cultura. Nota-se, portanto, que *P. erosus* tem sido utilizada nos trabalhos para determinação, não só dos compostos químicos com propriedades inseticidas, como também na análise de crescimento dos tubérculos para melhor aproveitamento econômico desta espécie (ZINSOU *et al.* 1987 ab).

SORENSEN (1990), enfatiza a necessidade de maiores estudos nas outras espécies de *Pachyrhizus*. BORTOLATO *et al.* (1985), MAGALHAES *et al.* (1987) e MAGALHAES *et al.* (1988), isolaram e identificaram, a partir das sementes de *Pachyrhizus tuberosus*, vários rotenóides como rotenona, 12-hidroxi-dolineona, dolineona, erosona, uma isoflavonona, neotenona, e duas 3-fenil cumarinas, uma pachyrhizina e a outra, 6-(2,4,5-trimetoxifenil)-7H[3.2g][1]benzopiran-7-ona, substância inédita.

Os métodos para dosagens quantitativas dos rotenóides tem sido baseados na determinação colorimétrica aproximada de MEIJER (1936) e por cromatografia líquida de fase reversa (BUSHWAY, 1983 ab; ABIDI, 1984; BUSHWAY, 1984 e BUSHWAY *et al.* 1985). Devido às características próprias das moléculas do grupo rotenóides, como por exemplo a não volatilidade, BUSHWAY (1984) observou que o melhor método para análises quantitativas de rotenona e seus derivados é por cromatografia líquida de fase reversa. Após vários trabalhos em que se desenvolveu um método de análise para rotenóides, verificou-se que o método mais preciso e mais rápido na determinação quantitativa destas substâncias é o de cromato-

grafia líquida de fase reversa. Este método de análise tem sido usado tanto na determinação do nível dessas substâncias em resíduos na água como também, em tecidos de animais (BUSHWAY, 1985).

A extração e quantificação dos componentes inseticidas (rotenona, pachyrhizina e erosona), podem fornecer informações complementares para os estudos biossistemáticos do gênero Pachyrhizus (SORENSEN, 1988 e 1990). Com o crescimento atual da demanda para produtos naturais em todos os campos de consumo de produtos químicos ligados a alimentos e saúde, reaparece o mercado para inseticidas naturais. Seria interessante aproveitar o restabelecimento do comércio dos inseticidas naturais clássicos, tais como rotenona, e desenvolver estudos com plantas que apresentem novos inseticidas (B. GILBERT, comunicação pessoal).

ALVARENGA (1987) e ALVARENGA & VÁLIO (1989), estudaram os efeitos térmicos e fotoperiódicos no desenvolvimento do Pachyrhizus tuberosus. Os autores verificaram que o plantio durante a primavera proporcionava melhor rendimento das vagens, sementes e raízes tuberosas. Em relação à floração, esta espécie foi mais precoce em temperaturas mais baixas (20/15 e 25/20°C), mas apresentou maior número de inflorescências e maior porcentagem de plantas floridas a 25 e 30°C. É uma planta de dias intermediários, apresentando floração entre fotoperíodos de 10 e 18 horas, com uma exigência de no mínimo 8 ciclos fotoindutivos. Para iniciação das raízes tuberosas, esta espécie é uma planta de dia curto, com fotoperíodo crítico entre 14 e 16 horas. De acordo com ALVARENGA (1987), as sementes de Pachyrhizus tuberosus possuem

maior nível proteico quando o plantio é feito na primavera. Acredita-se que os rotenóides estão localizados principalmente nas sementes do gênero Pachyrhizus. Em P. tuberosus, as quantidades maiores de rotenona e pachyrhizina estão nos cotilédones e não nos eixos embrionários, e esta quantidade diminui durante o desenvolvimento da planta (SCHROEDER, 1968).

Pachyrhizus tuberosus, tem um potencial nutricional, em relação a suas raízes tuberosas. Por isso, tem-se incentivado a sua introdução nos hábitos alimentares (NODA *et al.* 1984; GRUM, 1990). De acordo com ALVARENGA (1987), suas sementes são ricas em óleo, podendo ser utilizadas no preparo de ração para o gado. Entretanto, com exceção das sementes, nenhum trabalho foi desenvolvido para determinar e verificar a presença dos componentes inseticidas nos vários órgãos desta planta.

O objetivo deste trabalho foi, através de extrações e dosagens, determinar a quantidade de isoflavonóides nos vários órgãos de Pachyrhizus tuberosus, principalmente durante a sua fase de crescimento inicial, bem como o efeito dessas substâncias na atividade respiratória, em mitocôndrias isoladas de P. tuberosus, verificando o seu papel fisiológico na germinação das sementes desta espécie.

II. MATERIAL E MÉTODOS.

1. Material biológico.

A espécie utilizada para o presente trabalho foi Pachyrhizus tuberosus (Lam.) Spreng, também conhecida como feijão Macuco ou Jacatupé. O material botânico utilizado para os experimentos foi obtido através de sementes coletadas em junho de 1987, de plantas cultivadas em canteiro no Departamento de Fisiologia Vegetal da Universidade Estadual de Campinas (Figura 2.1).

2. Métodos.

2.1. Germinação de sementes.

Sementes de P. tuberosus foram selecionadas de acordo com o seu tamanho e esterilizadas com uma solução de hipoclorito de sódio 1% por 5 minutos. Posteriormente, as sementes foram lavadas em água destilada e colocadas para germinar em placas de Petri de 15cm de diâmetro com duas folhas de papel de filtro umedecido com 10ml de água destilada. Foram colocadas 20 sementes de P. tuberosus por placa de Petri e estas mantidas em câmaras de crescimento Forma Scientific mod. 24, a 25°C. Os experimentos de germinação



Figura 2.1. Vista geral da planta Pachyrhizus tuberosus

foram realizados mantendo-se as placas de Petri sob luz branca ou escuro contínuos. A contagem do número de sementes germinadas nas placas mantidas no escuro, foi sempre feita sob luz verde de segurança. As sementes eram consideradas germinadas logo após a protrusão da radícula.

2.2. Caracterização do crescimento de *P. tuberosus*.

Para a verificação de como ocorre o desenvolvimento inicial do eixo embrionário de *P. tuberosus* isolado dos cotilédones, foi determinado seu peso de matéria fresca e seca nos períodos de 0, 24, 48, 72, 96, 120 horas após o início da embebição a 25°C em luz e escuro contínuos.

O crescimento de folhas primárias desta espécie foi estudado em plântulas crescidas em vasos, contendo uma mistura de areia e terra adubada. Os vasos foram mantidos em casa de vegetação com luz e temperatura ambientes. As medidas iniciais foram feitas em microscópio estereoscópico com amostras de 20 primórdios foliares de plântulas provenientes de sementes que foram colocadas para germinar em placas de Petri a 25°C e luz constante. Até o décimo dia de crescimento, as folhas primárias ainda se encontravam cobertas pelos cotilédones e as plântulas foram eliminadas após as medidas. A partir do décimo-segundo dia, as medidas foram feitas sempre nas mesmas plântulas até o trigésimo sexto dia após o início da embebição das sementes.

Foi analisado também o crescimento dos frutos em diferentes estádios do desenvolvimento, utilizando-se plantas cultivadas em canteiro, com aproximadamente 08 meses de idade.

2.2.1. Peso de matéria fresca.

A análise do peso de matéria fresca foi feita imediatamente após a coleta do material vegetal, com auxílio de uma balança analítica com sensibilidade de 0.1mg.

2.2.2. Peso de matéria seca.

Após a determinação do peso de matéria fresca, todo o material foi mantido a -12°C por um período mínimo de 24 horas e a seguir, liofilizado durante 16 horas. Após o tratamento no liofilizador, o material foi imediatamente colocado no dessecador. O peso de matéria seca foi então determinado através de uma balança analítica com sensibilidade de 0.1mg.

2.2.3. Medidas de Comprimento.

As medidas de comprimento foram feitas com uma régua transparente graduada em milímetros. Nos eixos embrionários de *P. tuberosus*, os valores foram determinados a partir da extremidade da radícula até o ápice da folha primária. Nas folhas primárias, as medidas foram feitas através do comprimento da nervura princi-

pal do limbo foliar. Para os frutos foram feitas medidas de comprimento do ápice até a base das vagens.

2.3. Efeito de rotenona, pachyrhizina, e do exsudato das sementes na germinação e durante o crescimento inicial dos eixos embrionários isolados de P. tuberosus.

Foi verificado o efeito da rotenona (Sigma) e pachyrhizina (extraída das sementes de P. tuberosus), na germinação de sementes de P. tuberosus colocadas em luz e escuro, e também na fase inicial do crescimento dos eixos embrionários isolados dessas sementes. Foram utilizadas rotenona e pachyrhizina nas concentrações de $10^{-2}M$, $10^{-3}M$ e $10^{-4}M$. Após 48 horas de embebição em luz ou escuro a $25^{\circ}C$, os eixos embrionários foram excisados dos cotilédones e colocados em placas de Petri de 9cm com 2 folhas de papel de filtro umedecidas com água destilada, com soluções de rotenona e/ou pachyrhizina e com o exsudato proveniente das sementes em germinação. Em alguns experimentos a rotenona foi dissolvida em diclorometano e as sementes permaneceram por 15 minutos nessa solução. Foram utilizadas 20 sementes por placa de Petri com 5 repetições, e 10 eixos embrionários por placa, com 2 repetições por tratamento. As placas foram colocadas em câmaras de crescimento Forma Scientific mod. 24, a $25^{\circ}C$ em luz e escuro contínuos.

2.4. Efeito de rotenona e pachyrhizina na atividade respiratória de mitocôndrias isoladas de *P. tuberosus*.

2.4.1. Tratamento das sementes

As sementes de *P. tuberosus* foram esterilizadas com solução de hipoclorito de sódio 1% por 15 minutos, lavadas com água destilada por várias vezes e colocadas para germinar no escuro a 25°C. Após 48 horas os tegumentos das sementes foram removidos. O papel de filtro foi trocado a cada três dias, sob luz verde de segurança, para evitar contaminação das sementes em desenvolvimento. Para o isolamento de mitocôndrias foram utilizados epicótilos de plântulas de *P. tuberosus* com 15 dias de idade.

2.4.2. Isolamento de mitocôndrias.

O isolamento de mitocôndrias de *P. tuberosus* foi feito de acordo com MARTINS & VERCESI (1985). Os tecidos vegetais foram cortados finamente com uma tesoura e suspensos em meio de extração contendo soluções de manitol 400mM, 2% de albumina bovina, HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etano-sulfônico) 10mM, EGTA (ácido etileno glicol-bis-(β -a-aminoetiléter)-N-N'-tetra acético) 1mM e cisteína 3mM em pH 7.6 (na proporção de 1g de tecido por 5ml de meio de extração). Esse material foi submetido a rompimento em homogeneizador Polytron (PT 10/35 numero 5), durante 6 segundos e depois filtrado em 8 camadas de gaze, sendo o

pH ajustado a 7.2 com solução de KOH 2N. Em seguida, a suspensão foi centrifugada duas vezes a 1000g durante 10 minutos. O sobrenadante foi centrifugado a 10000g por 10 minutos. As mitocôndrias sedimentadas foram lavadas superficialmente com meio de isolamento (com soluções de manitol 300mM, 0.2% de albumina bovina, EGTA 0.1mM e HEPES 10mM em pH 7.2) e ressuspensas cuidadosamente com auxílio de pincel fino. Todo o processo foi realizado entre 0 e 4°C.

2.4.3. Meios de reação.

Os meios de reação continham basicamente soluções de: sacarose 0.3M, KCl 20mM, HEPES 2mM, 0.1% de BSA (albumina soro bovino) e fosfato inorgânico 1mM em pH 7.2. Os experimentos foram realizados a 25-28°C. Todas as adições feitas aos meios de reação estão especificadas nas legendas de cada figura. Essas adições foram alíquotas de: ADP (adenosina difosfato) 100µM, succinato 2mM, malato 1mM junto com glutamato 20mM, FCCP (ciano carbonil p-trifluormetoxi-fenilhidrazona) 1µM, rotenona 5µM e pachyrhizina 5µM. As dosagens do consumo de oxigênio foram feitas através de um eletrodo tipo Clark.

2.4.4. Determinação de proteína.

As determinações de proteína foram feitas pelo método de BRADFORD (1976). A dosagem foi feita com 2µl das frações, adicio-

nadas a 2.5ml da solução de Coomassie brilliant blue. Esta foi preparada com 100mg de pó de Coomassie G-250, dissolvidos em 50ml de etanol 90%, acrescidos de 100ml de ácido ortofosfórico 85% e completada para um litro em água destilada. As leituras foram feitas em espectrofotômetro, a 595nm, e os resultados foram obtidos pela curva padrão feita com concentrações conhecidas de BSA. A suspensão mitocondrial utilizada continha 69mg de proteína. ml⁻¹.

2.5. Extração e dosagem de rotenona e pachyrhizina.

Para a extração da rotenona e pachyrhizina em *P. tuberosus*, foi utilizado o fracionamento de acordo com a Figura 2.2. Após a secagem do material no liofilizador, este foi macerado ou moído em um moinho de bola. Para a extração, normalmente foram utilizados 50mg ou 200mg de material em 15ml de éter de petróleo, com agitação contínua por 24 horas no escuro a temperatura ambiente. O extrato etéreo foi centrifugado duas vezes e o precipitado ressuspenso em 10ml de clorofórmio, com agitação contínua por 24 horas no escuro. Este extrato foi filtrado duas vezes e evaporado à temperatura ambiente, obtendo-se uma fração que contém rotenóides e pachyrhizina. Esta fração era utilizada imediatamente para a dosagem ou armazenada em frasco escuro num período máximo de 4 dias à 4°C.

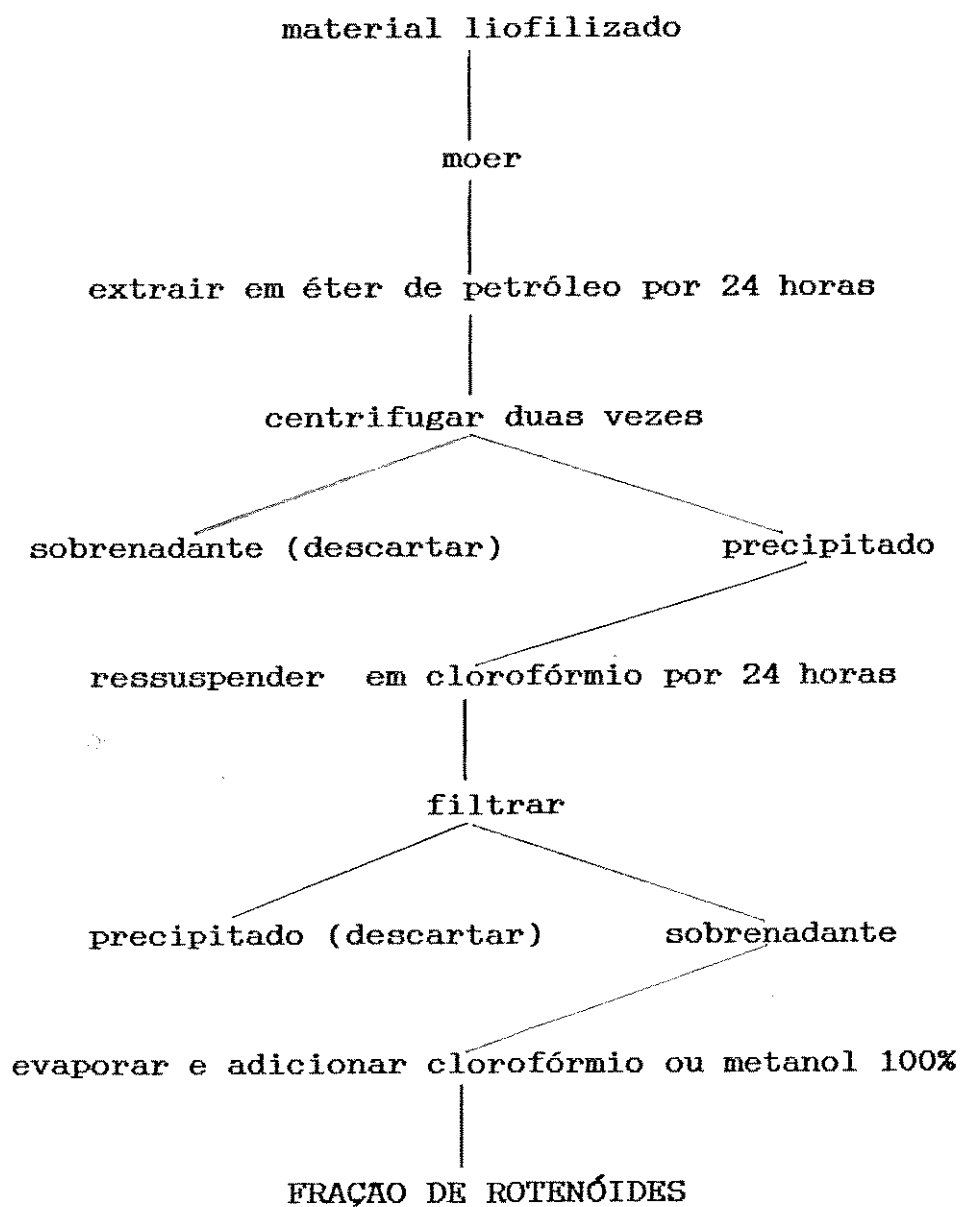


Figura 2.2. Esquema do processo de fracionamento para obtenção de substâncias do tipo rotenóides em *P. tuberosus*.

2.5.1. Preparação de extratos a partir dos eixos embrionários e cotilédones isolados de P. tuberosus.

Para a verificação da presença e quantificação de rotenona e pachyrhizina em P. tuberosus, foram feitas extrações dos eixos embrionários isolados dos cotilédones, após 0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas do início da embebição em luz e escuro a 25°C. A extração foi feita também nos eixos embrionários isolados dos cotilédones mantidos em meio de cultura contendo solução de Hoagland diluída cinco vezes (HOAGLAND e ARNON, 1938) mais 2% de sacarose e 0.5% de agar, por 0, 24, 48, e 72 horas. Todo material utilizado para este experimento foi autoclavado (125°C, durante 60 minutos aproximadamente). As sementes foram esterilizadas em álcool etílico por 10 minutos e depois colocadas em água destilada por trinta minutos sendo manuseadas em uma Câmara de Fluxo Laminar, em condições assépticas. Foram utilizadas duas repetições com 10 embriões ou 10 cotilédones.

Foi feita também, a extração de sementes cozidas em panela de pressão (ao redor de 97°C por 3 horas) para verificar se a rotenona e pachyrhizina, perdiam sua atividade quando submetidas a altas temperaturas. Tanto as sementes cozidas quanto a água de fervura foram analisadas.

2.5.2. Preparação de extratos a partir das folhas primárias de *P. tuberosus*.

Foi analisado o conteúdo de rotenona e pachyrhizina, em folhas primárias com 10, 20 e 30 dias de idade. Realizou-se a extração de acordo com o esquema da Figura 2.2.

2.5.3. Preparação de extratos a partir do exsudato da seiva do caule e do pedúnculo da inflorescência de *P. tuberosus*.

Realizou-se a coleta do exsudato da seiva do caule e do pedúnculo da inflorescência de plantas com 180 dias após a semeadura. Os caules das plantas de cada tratamento foram seccionados com uma lâmina logo abaixo do ponto de inserção dos cotilédones, ou 1cm acima da inserção do pedúnculo. O local cortado foi lavado com água destilada e seco com papel de filtro. A seguir, o exsudato do xilema foi coletado através de tubos capilares com capacidade de 10 μ l, de acordo com SAWAZAKI (1986), no período entre 11:00 e 13:00 horas. O material coletado do caule e do pedúnculo foi transferido para frascos de vidro escuro e colocados à -12°C por 24 horas para serem a seguir liofilizados, realizando-se a extração de acordo com a Figura 2.2. Foi feita, também, a extração do ramo da inflorescência que foi seccionada para a coleta do exsudato.

2.5.4. Preparação de extratos a partir dos frutos das plantas de *P. tuberosus*.

Efetuuou-se a extração e quantificação da rotenona e pachyrhizina, nos frutos de *P. tuberosus* com e sem sementes. A extração foi feita utilizando-se vagens em 08 estádios de desenvolvimento.

2.5.5. Preparação de extratos a partir das raízes das plantas de *P. tuberosus*.

Verificou-se a quantidade de rotenona e pachyrhizina na raiz de plântulas com 28 dias de idade crescidas em bandejas no escuro contínuo. Para análise nas raízes tuberosas foram utilizadas plantas crescidas em canteiro, com aproximadamente 10 meses de idade. Foi feita a extração de diferentes partes da raiz: região do colo sem casca, região superficial do córtex com e sem casca, região interna do córtex e raiz inteira.

2.5.6. Dosagem de rotenona e pachyrhizina das plantas de *P. tuberosus*.

A dosagem de rotenona e pachyrhizina foi feita por Cromatografia Líquida de Fase Reversa (HPLC). A metodologia utilizada foi a de BUSHWAY *et al.* (1985), com algumas modificações. Os padrões e os extratos foram analisados por HPLC, LKB-modelo 2150, utilizando uma Coluna Cromatográfica ODS-Hypersil (250x4.6mm), um

detector LKB.VWM 2141 e um Registrador/Integrador LKB-modelo 222. As condições de operação foram: a) volume injetado 5 μ l ou 10 μ l; b) fluxo de 1ml.minuto⁻¹; c) absorvância 240nm; d) velocidade do papel do registrador 0.5cm.minuto⁻¹. O solvente para a fase móvel foi isocrático utilizando-se metanol 70% e ácido acético 0.5%. A quantidade de rotenona e pachyrhizina presente nos extratos foi calculada em comparação com soluções padrões e os dados apresentados em ng por miligrama de matéria seca. Anteriormente à análise por HPLC, as amostras foram dissolvidas em 0.5ml de metanol 100% com agitação por um período mínimo de 1 hora. Para cada amostra foram feitas três injeções neste aparelho de Cromatografia Líquida. ◊

Tanto a fração contendo principalmente rotenóides quanto as substâncias isoladas e purificadas, foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Eva Magalhães do Instituto de Química da UNICAMP. Com exceção da rotenona (Sigma), todos os padrões utilizados neste trabalho foram provenientes das sementes do P. tuberosus.

2.6. Análise estatística.

As análises estatísticas foram realizadas usando-se coeficiente de variação e análise de variância (SNEDECOR & COCHRAN, 1967). Os dados de germinação foram transformados em arco seno da raiz quadrada da proporção, anteriormente a análise de variância ($\text{arc sen} \sqrt{p}$, onde p é dado em porcentagem). Nos casos em que o teste "F" foi significativo ao nível de 5%, determinou-se a Di-

ferença Mínima Significativa (DMS) pelo teste de Tukey. Os dados acompanhados de letras diferentes indicam diferenças significativas. Os resultados onde são indicados com letras "ns" o teste "F" não foi significativo ao nível de 5%.

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO.

3.1. Estabelecimento do método de dosagem para rotenona e pachyrhizina em Pachyrhizus tuberosus.

Rotenona e outras substâncias do tipo rotenóides podem ser identificadas e dosadas, com precisão, em cromatografia líquida de fase reversa (BUSHWAY, 1983 ab; ABIDI, 1984; BUSHWAY, 1984; BUSHWAY et al. 1985 e ABIDI, 1987). Após várias tentativas e algumas adaptações ao método utilizado neste trabalho, estabeleceu-se a caracterização cromatográfica de uma amostra de rotenona comercial. A Figura 3.1. mostra o cromatograma da rotenona obtida por cromatografia líquida de fase reversa que a partir de 5µg injetados numa velocidade de 1ml por minuto, eluiu em aproximadamente 13 minutos. A fase móvel isocrática foi de ácido acético 0.5% e metanol 70%, e a leitura dessa substância foi feita a 240nm, com uma sensibilidade de 0.5 e com integrador em uma atenuação de 512.

BUSWAY (1983 ab), demonstrou que utilizando outro sistema de solventes (acetonitrila, metanol e tetrahidrofurano), a rotenona eluiu em apenas 7 minutos. Em 1985, BUSWAY et al. usando acetonitrila e água na fase móvel, determinaram a rotenona tam-

Figura 3.1. Cromatografia líquida de 5µg de rotenona comercial, utilizando um detector de UV a 240nm e sensibilidade 0.5, um integrador com velocidade do papel de 0.5cm.minuto⁻¹ e atenuação de 512, com área mínima de 1000000.

(R)-rotenona

Figura 3.2. Cromatografia líquida de 3µg de rotenóides extraídos das sementes de Pachyrhizus tuberosus. Detector de UV a 240nm e sensibilidade de 0.5, um integrador com velocidade do papel de 0.5cm.minuto⁻¹ e atenuação de 512, com área mínima de 1000000.

(P)-pachyrhizina

(R)-rotenona

Figura 3.3. Cromatografia líquida de extratos purificados das sementes de Pachyrhizus tuberosus. Dectetor de UV a 240 nm e com sensibilidade 0.5, um integrador com velocidade do papel de 0.5cm.minuto⁻¹ e atenuação de 1024 e 2048, com area mínima de 1000000.

A - 6µg de dolineona

B - 5µg de 12-hidroxdolineona

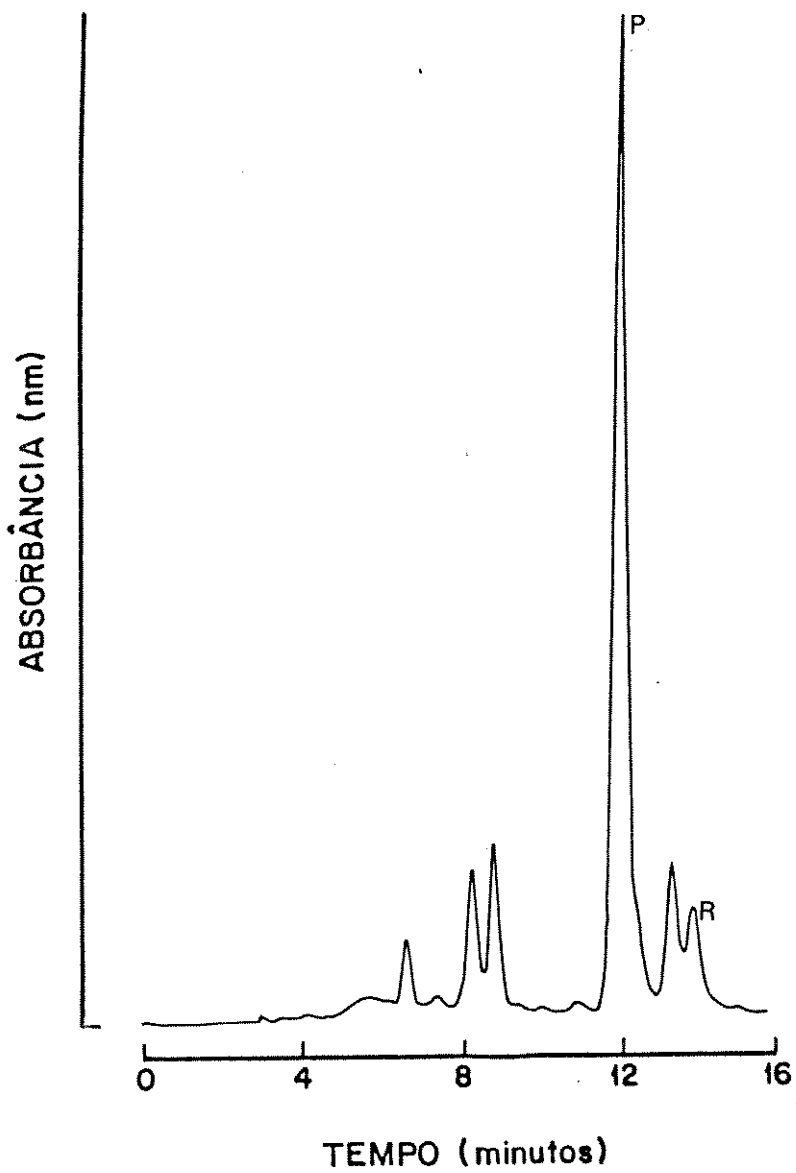
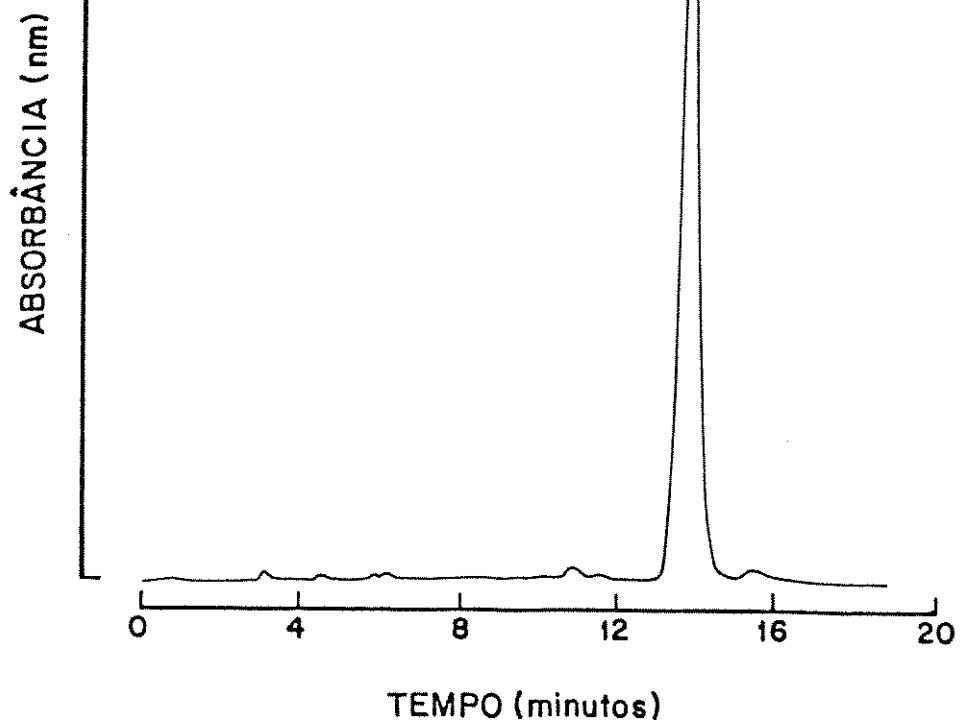
C - 5µg de 3-fenil-cumarina inédita

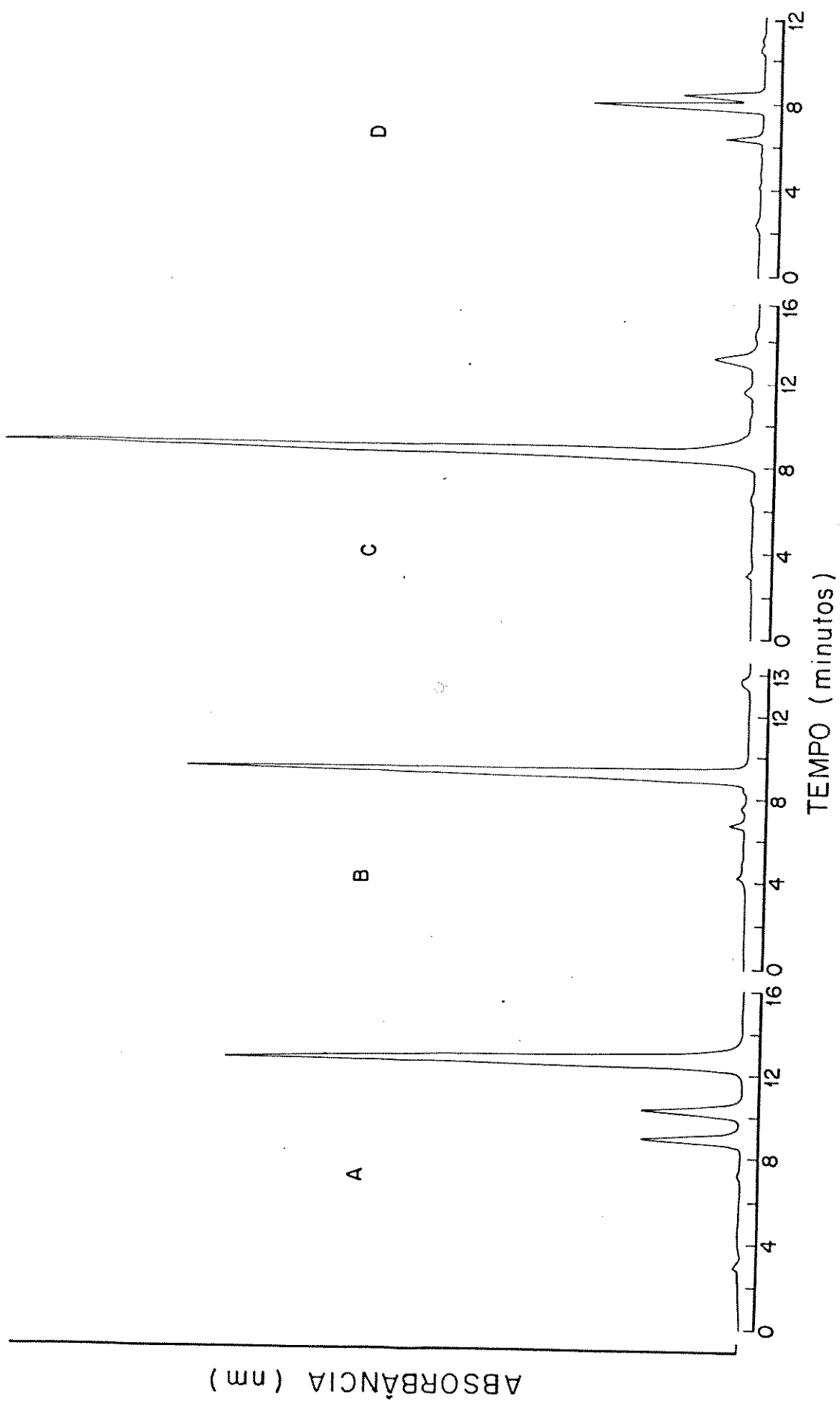
D - 3µg de erosona

bém no tempo de retenção de sete minutos. No presente trabalho, com Pachyrhizus tuberosus, foi demonstrado que a rotenona eluiu em aproximadamente 13 minutos, utilizando como sistema de solventes metanol, água e ácido acético. O coeficiente de variação foi de 4% na média de 5 amostras de 5µg de rotenona injetadas num intervalo de 2 minutos durante uma análise cromatográfica.

A Figura 3.2 mostra o cromatograma dos isoflavonóides extraídos e purificados das sementes de P. tuberosus. Observam-se, nesta figura, seis substâncias com picos de retenção diferentes. Sendo assim, passou-se a analisar as substâncias do tipo rotenóides que nos foram cedidas, injetando-as isoladamente na HPLC para obtenção dos cromatogramas individuais.

Das seis substâncias isoladas das sementes de P. tuberosus, a Figura 3.3 mostra o cromatograma de quatro, que são dolineona, 12-hidroxdolineona, uma 3-fenil cumarina inédita (6-(2,4,5-trimetoxifenil)-7H-furo[3,2g][1]benzopiran-7-ona), e a erosona. O mesmo sistema de solventes foi utilizado para todas essas substâncias. A velocidade de fluxo foi de 1ml por minuto e foram lidas a 240nm numa sensibilidade de 0.5 e atenuações de 1024 ou de 2048. A Figura 3.3A mostra o cromatograma da dolineona que a partir de 6µg de substância injetada, eluiu em aproximadamente 13 minutos. O cromatograma da 12-hidroxdolineona é observado na Figura 3.3B, que a partir de 5µg de substância injetada, eluiu em 9:30 minutos. A Figura 3.3C mostra o cromatograma da 3 fenil-cumarina inédita que eluiu em 8:54 minutos. Finalmente, na Figura 3.3D, verifica-se o resultado do cromatograma da erosona que com





a injeção de 3µg obteve-se 3 picos de retenção diferentes, sendo o maior em 8:19 minutos. Neste caso parece que a fração contendo erosona não está totalmente purificada. Os cromatogramas mostrados na Figura 3.3 apresentam picos com tempos de retenção diferentes para cada substância. Entretanto, não foi possível identificar estas 4 substâncias no cromatograma do extrato de sementes apresentados na Figura 3.2, pelo menos nas condições de operação utilizadas neste trabalho.

Na Figura 3.4 observa-se o cromatograma da pachyrhizina, substância extraída das sementes de *P. tuberosus*. Verifica-se que a partir da injeção de 3µg, a pachyrhizina eluiu em aproximadamente 11:65 minutos, no mesmo sistema de solventes da fase móvel da rotenona. O coeficiente de variação da média de 5 injeções de 3µg de pachyrhizina a cada dois minutos foi de 3.9%. Verificou-se pela recromatografia com a fração de rotenóides (Figura 3.2.) que o maior pico daquele cromatograma é o da pachyrhizina. Nota-se que este isoflavonóide encontra-se em maior quantidade nas sementes de *P. tuberosus*. Portanto, podemos concluir que é possível identificar a pachyrhizina no extrato da fração de rotenóides por cromatografia líquida de fase reversa.

O cromatograma da rotenona (3µg) e pachyrhizina (3µg) é apresentado na Figura 3.5.. Pode-se observar que a pachyrhizina eluiu em 11:56 minutos e a rotenona 13:48 minutos, repetindo as análises anteriores. Verifica-se então que, nessas condições de operação por HPLC e nesse sistema de solventes, é possível identificar e comparar os dois isoflavonóides, rotenona e pachyr-

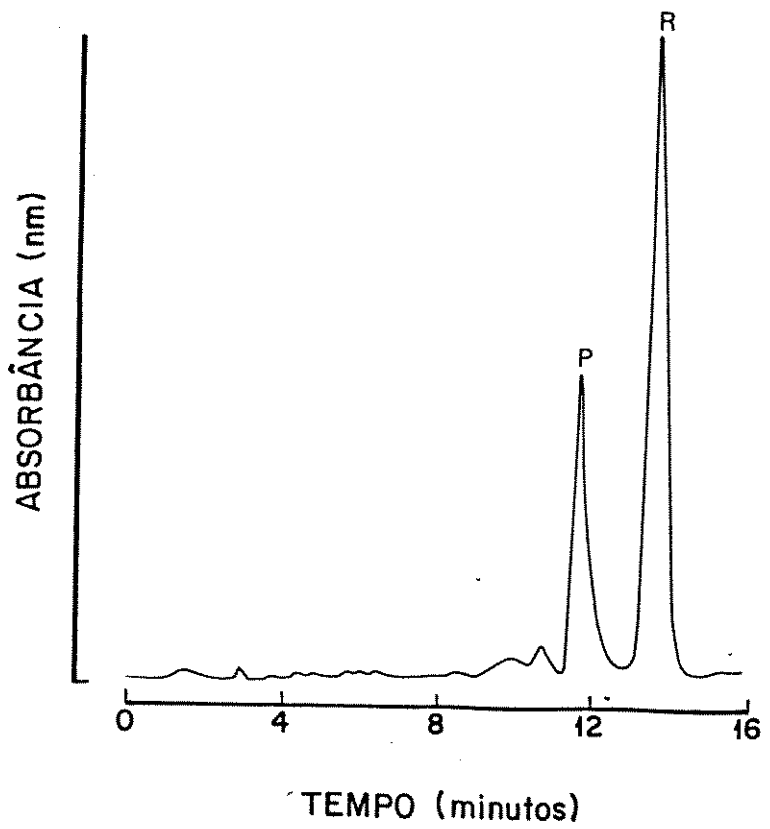
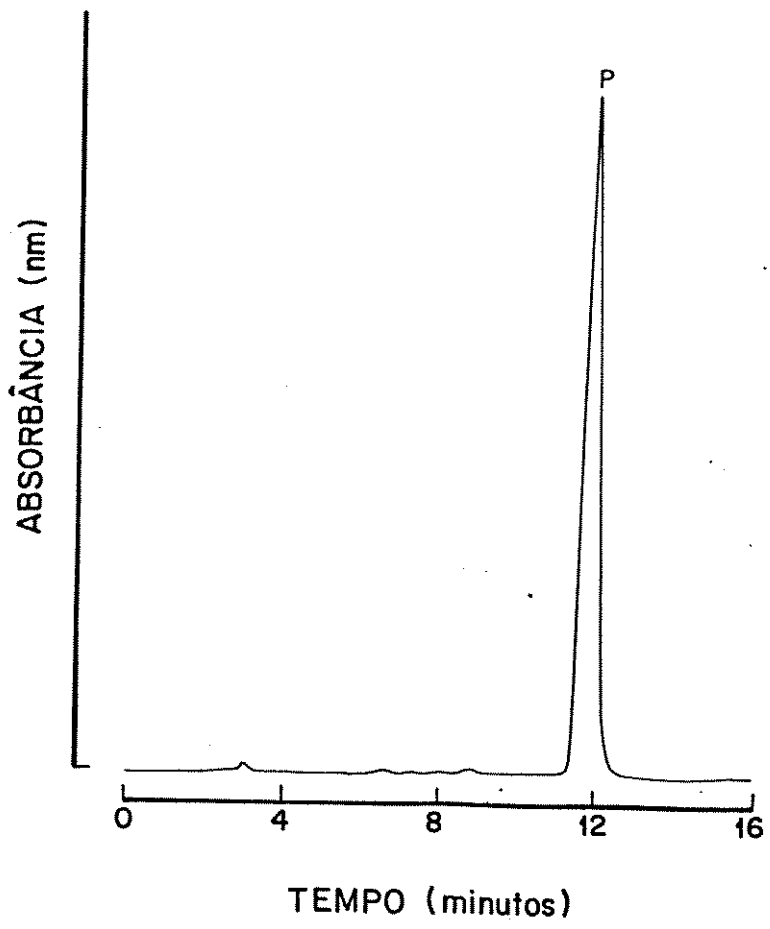
Figura 3.4. Cromatografia líquida de 5µg de pachyrhizina extraída das sementes de Pachyrhizus tuberosus. Detector de UV a 240nm e com sensibilidade 0.5, um integrador com velocidade do papel de 0.5cm.minuto⁻¹ e atenuação de 512, com área mínima de 1000000.

(P)-pachyrhizina

Figura 3.5. Cromatografia líquida de 3µg de rotenona comercial e 3µg de pachyrhizina extraída de Pachyrhizus tuberosus. Detector de UV a 240nm e com sensibilidade de 0.5, um integrador com velocidade do papel de 0.5cm.minuto⁻¹ e atenuação de 1024, com área mínima de 200000.

(P)-pachyrhizina

(R)-rotenona



hizina.

Com esses resultados e após várias análises feitas por HPLC, decidiu-se estabelecer este método para determinar e identificar a rotenona e a pachyrhizina. Dentre os isoflavóides extraídos das sementes de *P. tuberosus*, optou-se pela rotenona, por ser um inseticida natural encontrado na planta, e pela pachyrhizina por se apresentar em maior quantidade (cerca de 20,7 μ g por miligrama de peso seco da semente).

3.2. Extração e dosagem de rotenona e pachyrhizina em *P. tuberosus*.

Com o método de dosagem estabelecido para rotenona e pachyrhizina, a quantidade dessas substâncias foi determinada e comparada, em diferentes fases do desenvolvimento da planta.

Após a extração, as frações contendo os rotenóides e pachyrhizina foram solubilizadas em 0.5ml de metanol, e colocados em agitação contínua por uma hora para imediata análise cromatográfica.

Na Tabela 3.1 observam-se resultados de um experimento preliminar utilizando-se duas amostragens aleatórias, I e II, para estimar com análise estatística, as diferenças que podem ocorrer na extração e na injeção das amostras por HPLC. Como pode ser verificado, para cada amostragem foram feitas três extrações e, para cada extração, três injeções na coluna cromatográfica. A análise de variância revelou que não ocorreram diferenças signi-

TABELA 3.1. Teste para determinar variações na extração, e na injeção das amostras, da análise cromatográfica em duas amostragens diferentes.

repetições	amostragem I*			amostragem II**		
	A	B	C	A	B	C
1	0.362	0.315	0.352	0.943	1.234	1.176
2	0.316	0.288	0.255	0.841	0.882	1.029
3	0.350	0.255	0.238	1.176	0.828	0.755

* coeficiente de variação - 9.5%

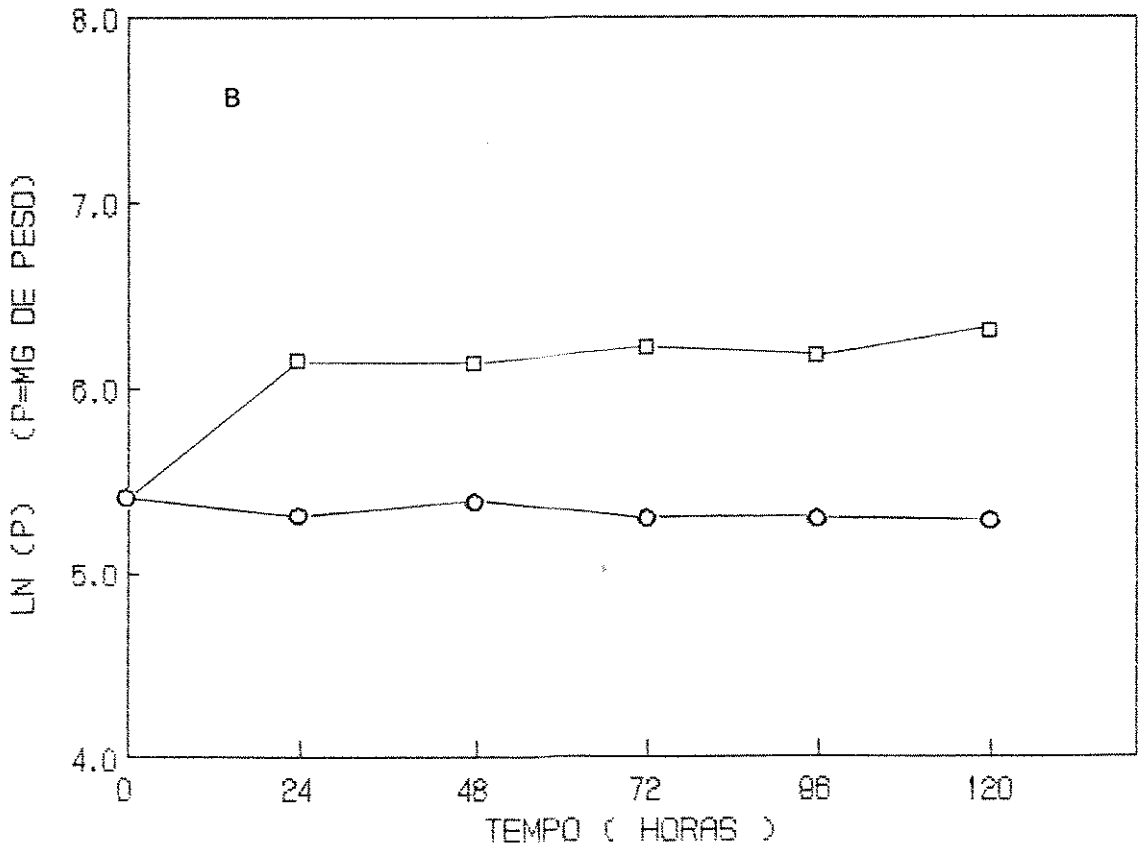
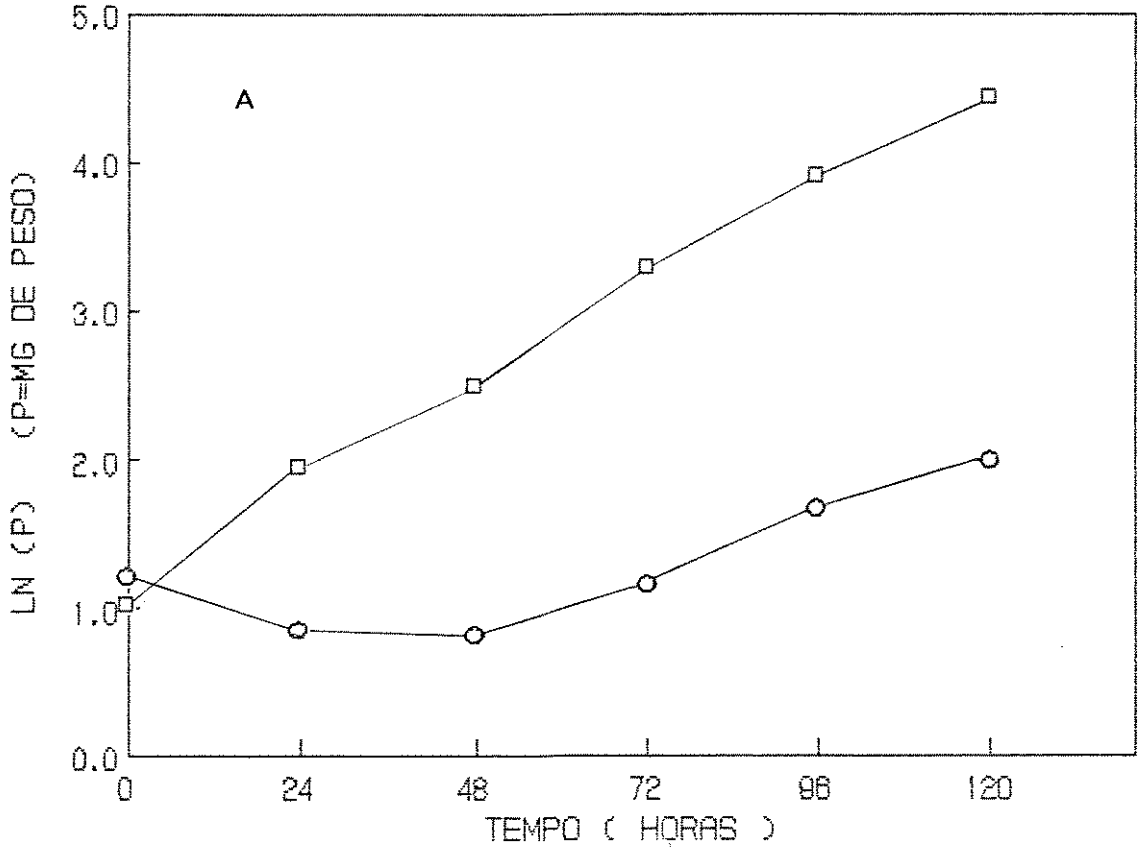
** coeficiente de variação - 13.1%

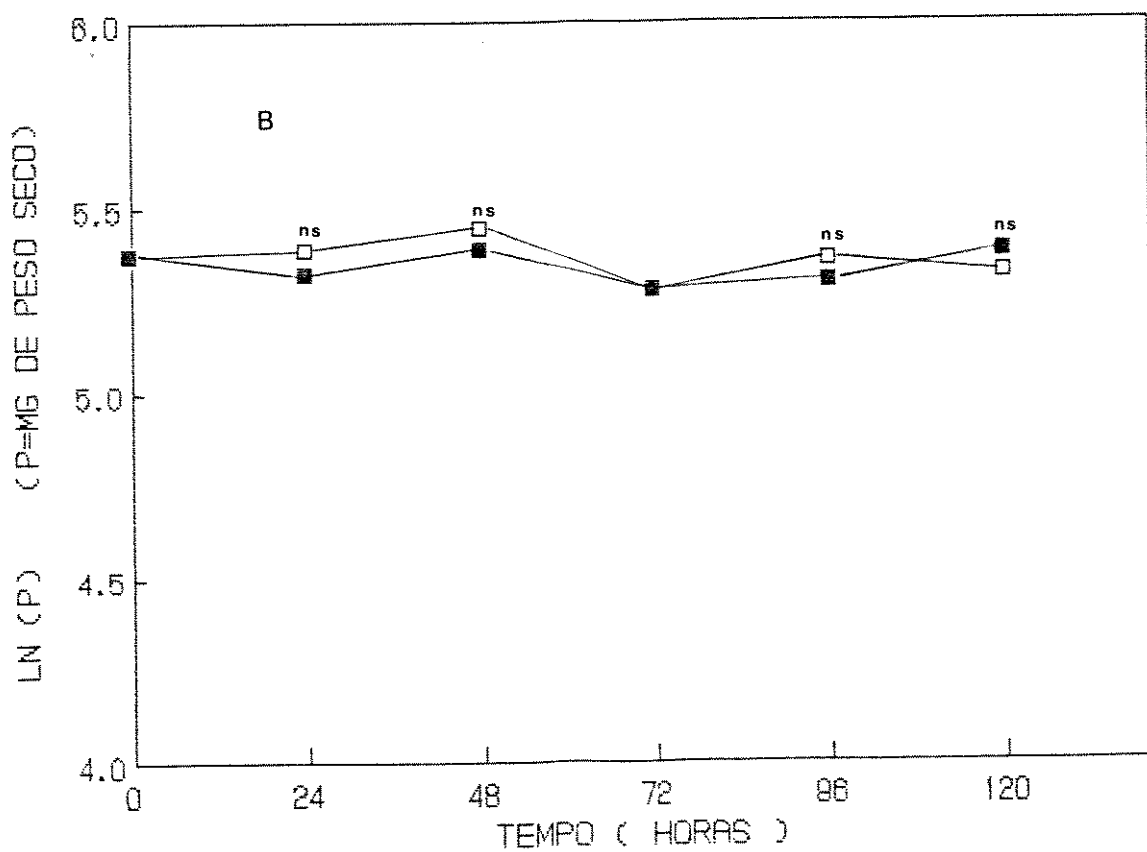
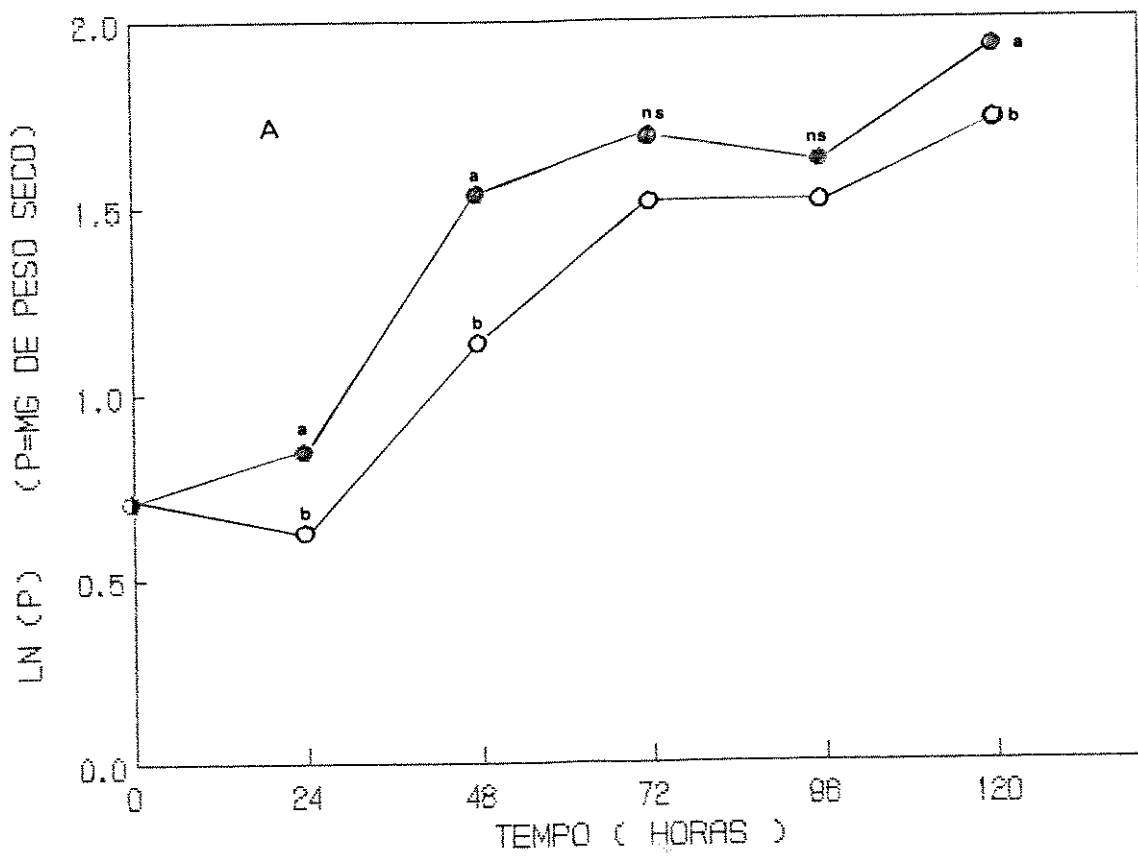
ficativas entre as três extrações e as três injeções feitas para cada amostragem. A partir desses dados, decidiu-se empregar uma extração com três injeções para cada amostra.

3.2.1. Eixo embrionário e cotilédone isolado.

A Figura 3.6 mostra o crescimento dos eixos embrionários e cotilédones. São observados o crescimento inicial dado em peso de matéria seca e fresca (mg) dos eixos embrionários (Figura 3.6A) e cotilédones (Figura 3.6.B) de *P. tuberosus*, mantidos em luz contínua. Verifica-se que o peso de matéria seca e, principalmente o de matéria fresca dos eixos embrionários aumenta constantemente durante 120 horas de embebição, ao passo que neste mesmo período analisado, o peso de matéria seca e fresca dos cotilédones permanece praticamente inalterado.

A Figura 3.7 apresenta resultados de um outro experimento mostrando o peso de matéria seca dos eixos embrionários (Figura 3.7A) e cotilédones (Figura 3.7B) isolados após diferentes períodos de embebição na luz e escuro contínuos. Verifica-se, que ocorre um aumento em matéria seca dos eixos embrionários de sementes mantidas em luz e escuro. Observa-se também que em 24, 48 e 120 horas de embebição, o peso seco dos eixos embrionários de sementes mantidas no escuro, são significativamente maiores do que o daqueles mantidos em luz. Durante o período deste experimento, os cotilédones não apresentaram alterações no seu peso seco.

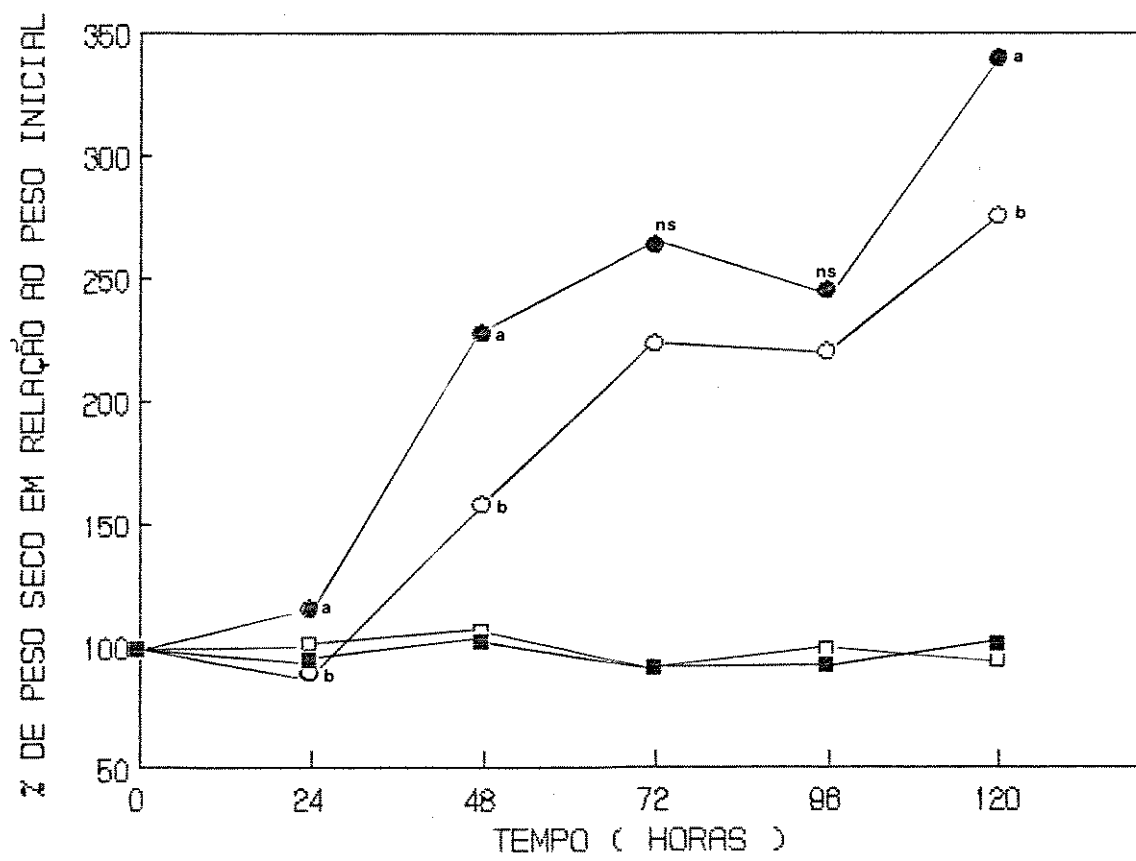




A Figura 3.8. mostra os mesmos dados, transformados em porcentagem, do peso de matéria seca em relação ao peso inicial. Estes resultados evidenciam a diferença entre, o peso seco dos eixos embrionários de sementes mantidas em luz, e escuro constante. Além disso, confirmam os dados anteriores (Figura 3.6 e Figura 3.7), indicando principalmente o crescimento do embrião em termos de peso seco a partir de 24 horas de embebição da semente.

SIMON & MEANY (1965) e PAULILO (1980), observaram que em Phaseolus, o aumento do peso de matéria seca do embrião ocorreu a partir das 20 horas de embebição da semente. Após este período o peso seco do embrião, aumentou exponencialmente. BROWN (1972) observou o mesmo comportamento de crescimento do eixo embrionário em plântulas de ervilha. Entretanto, em cereais como cevada, este fato só ocorreu após 48 horas de embebição do grão (BROWN, 1972). Sendo assim, parece que há um intervalo entre a hidratação do eixo embrionário e o início de seu crescimento em relação ao aumento de matéria seca. Existem evidências de que neste período ocorre síntese de hormônios, ou a liberação destes, no eixo embrionário, de uma forma inativa para a ativa (SIMON & MEANY, 1965 e VAN STADEN, 1973). Outra hipótese é a ativação de sistemas respiratórios pré existentes, indicando o início de muitos processos metabólicos antes do crescimento visível do eixo embrionário (CHING, 1972 e INNGLE *et al.* 1964).

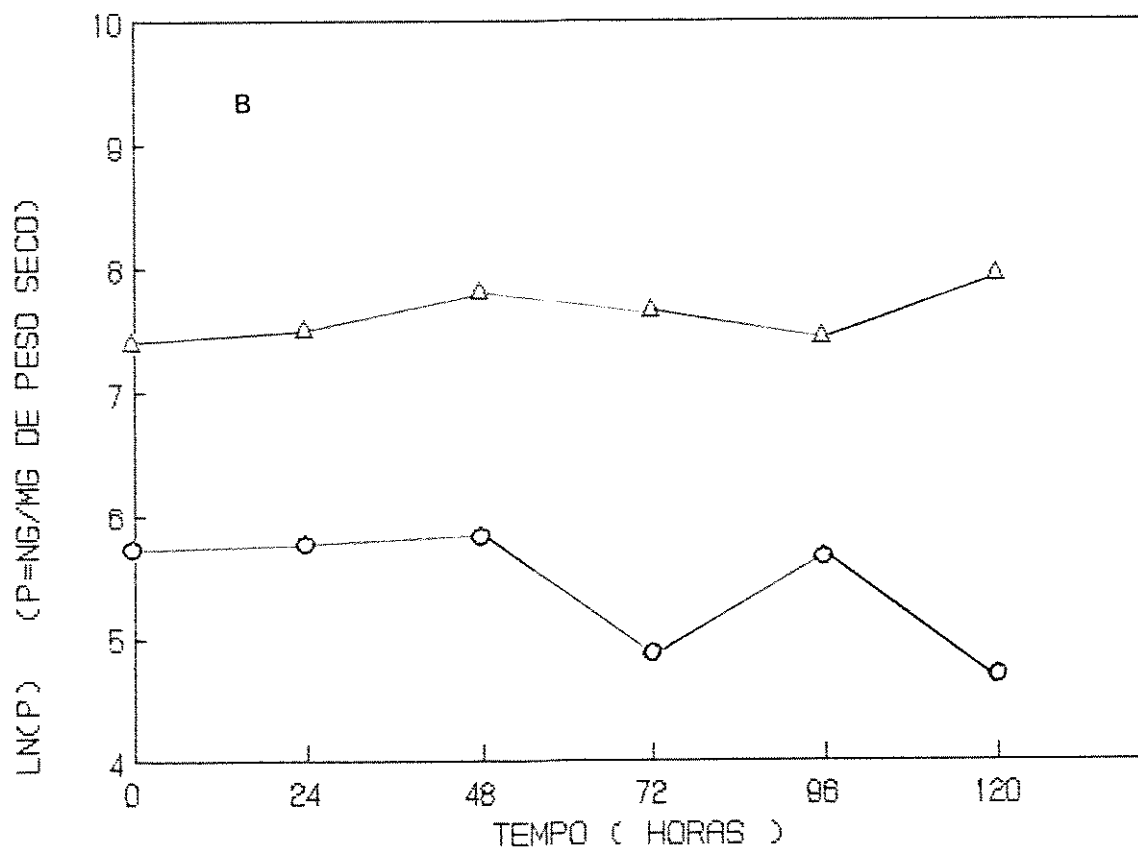
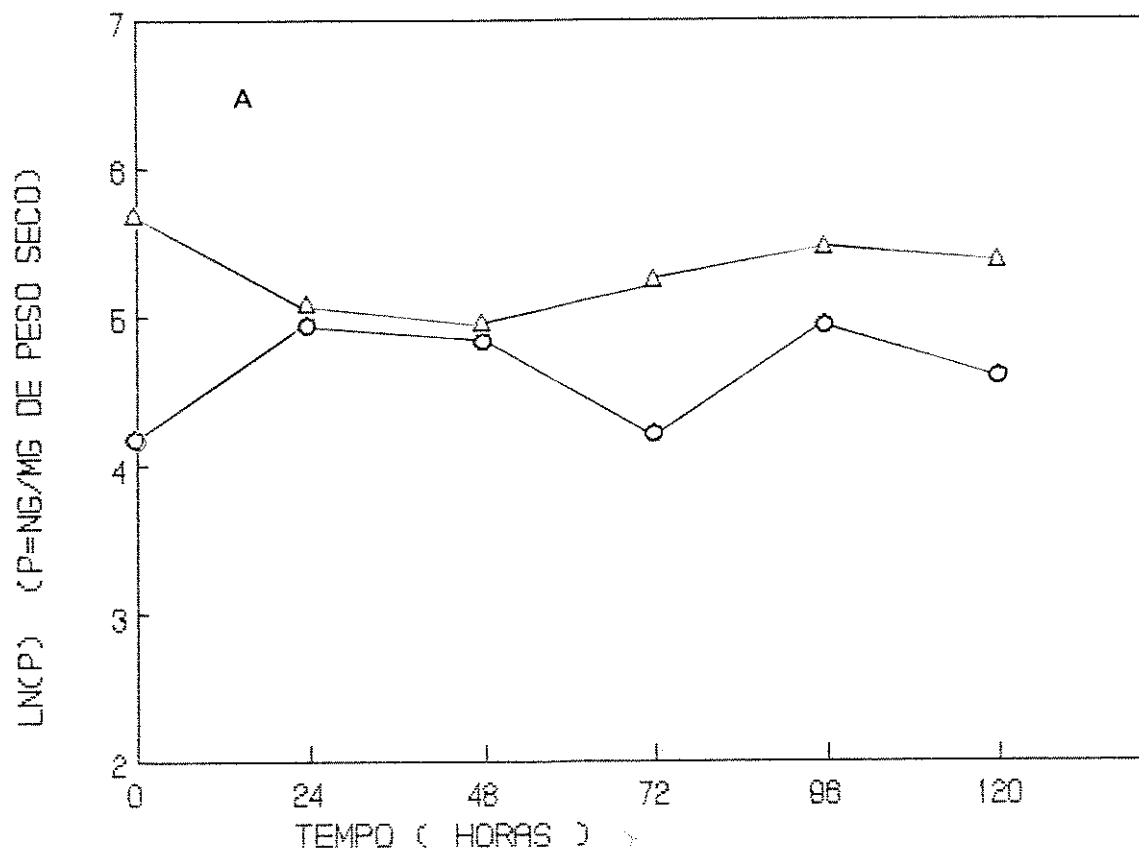
NELSON & GORHAM (1957), utilizando sacarose radioativa em plantas de soja, observaram que a translocação deste açúcar das



folhas para as raízes foi maior em plantas mantidas no escuro. De acordo com estes autores, a mobilização de açúcar nas folhas seria prejudicada pela luz. No caso de *P. tuberosus*, a diferença na quantidade de matéria seca encontrada no eixo embrionário entre sementes mantidas no escuro e na luz, poderia ser explicada por uma maior translocação de açúcar dos cotilédones para o embrião, quando estes permaneceram no escuro.

Os cotilédones das sementes de *Phaseolus vulgaris* apresentaram uma ligeira diminuição de peso seco, indicando que a hidrólise das reservas estava ainda no início (PAULILO, 1980). Em *P. tuberosus* observou-se que o peso de matéria seca dos cotilédones não é alterado até 120 horas de embebição das sementes.

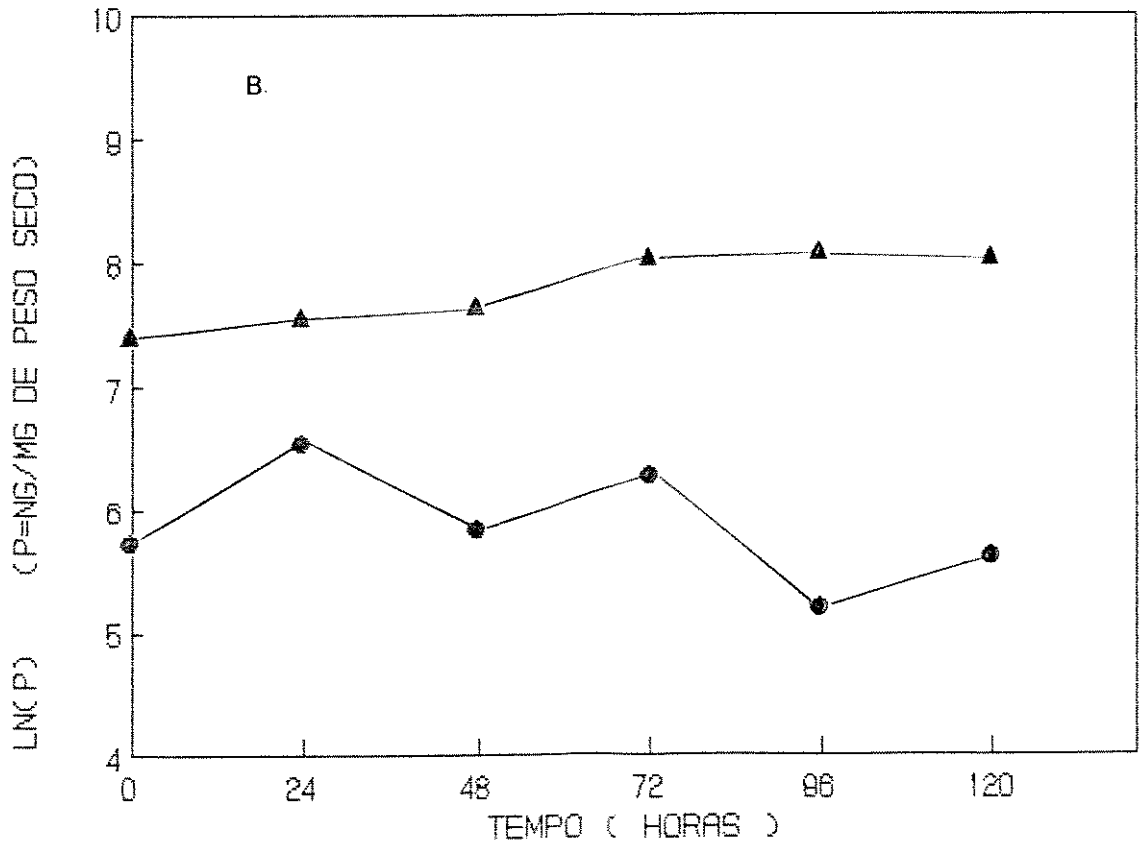
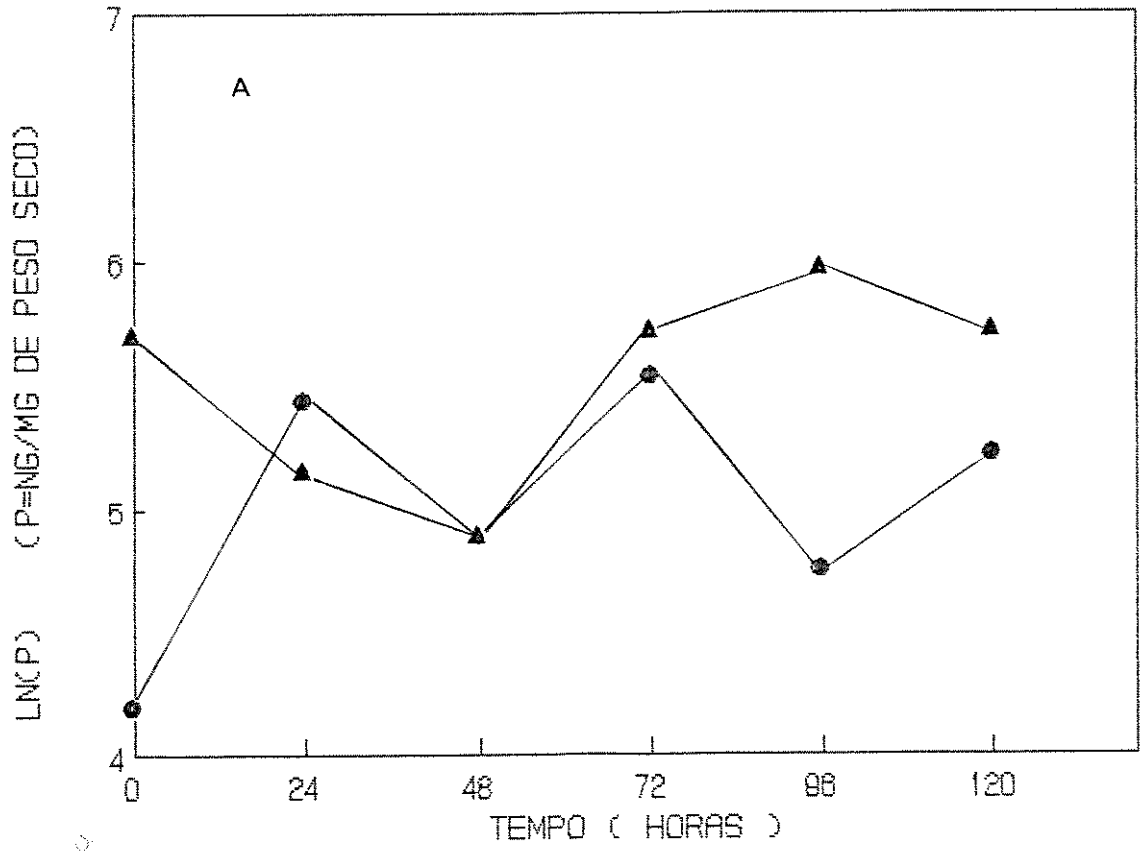
A Figura 3.9 mostra os resultados do conteúdo de rotenona e pachyrhizina, nos eixos embrionários e cotilédones mantidos em luz contínua. Pode-se observar na Figura 3.9A que a quantidade de rotenona encontrada nas sementes secas foi maior nos cotilédones do que nos eixos embrionários. Com o início da embebição, as quantidades de rotenona nesses dois órgãos não são muito diferentes entre si. Entretanto, o nível desta substância sempre foi maior nos cotilédones. Na Figura 3.9B é mostrado o conteúdo de pachyrhizina no início do desenvolvimento do eixo embrionário e cotilédone. Verifica-se que nas sementes secas, a pachyrhizina está em maior quantidade no cotilédone do que no eixo embrionário. No cotilédone, o conteúdo de pachyrhizina, praticamente não é alterado nos períodos em embebição examinados. No eixo embrionário, a quantidade de pachyrhizina provavelmente não varia nos

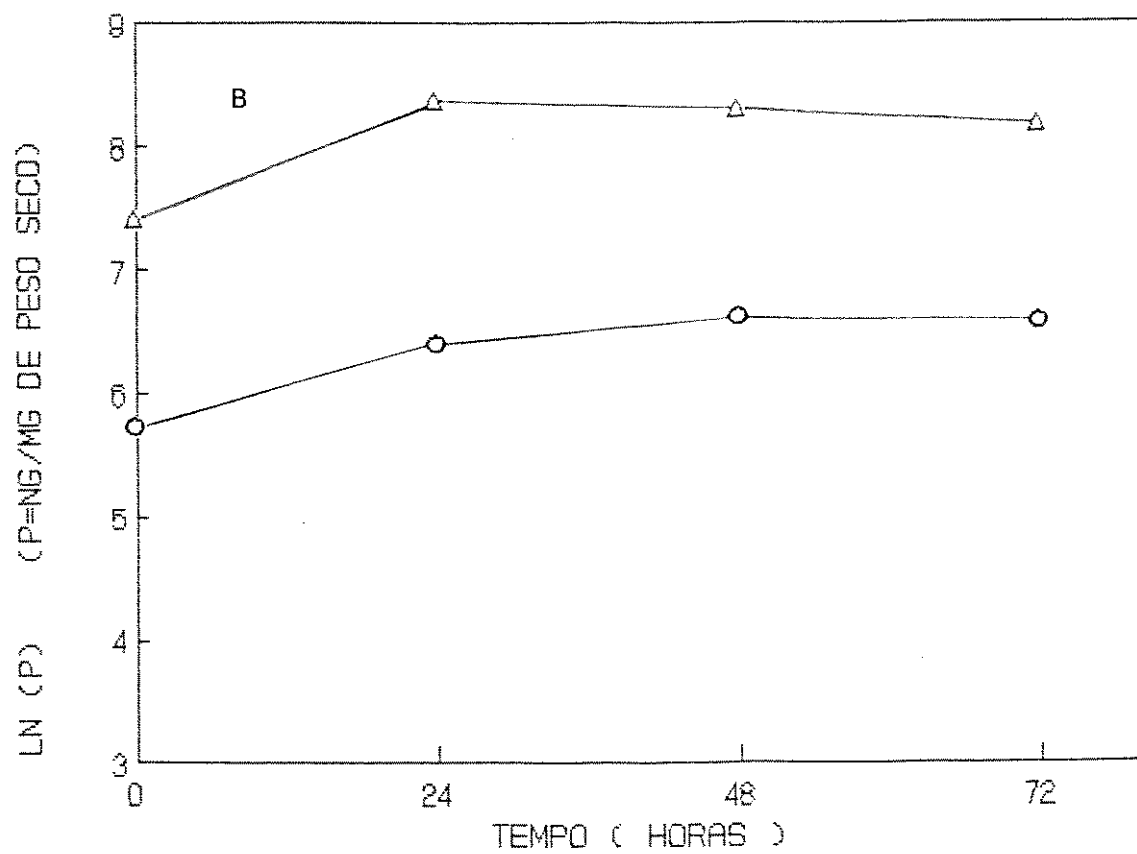
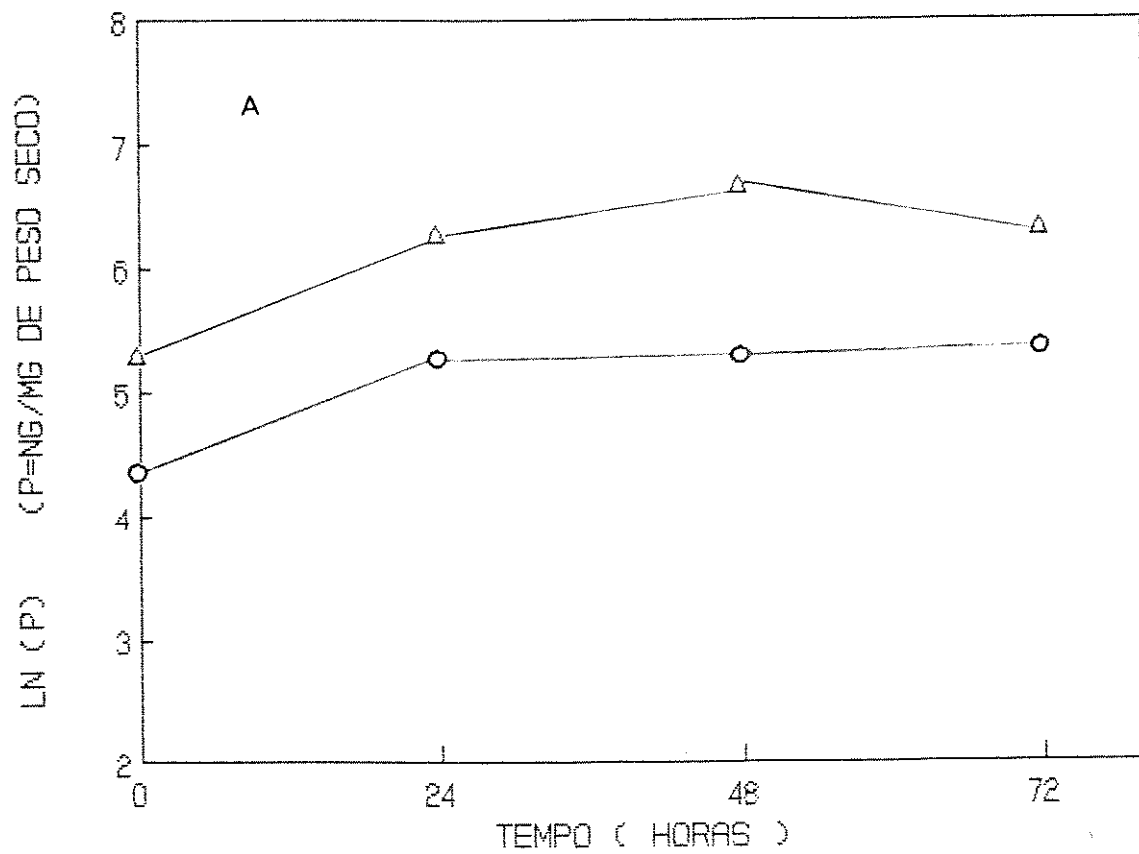


períodos de 24, 48 e 96 horas de embebição em luz, porém o conteúdo desta substância parece ser menor nos períodos de 72 e 120 horas.

Na Figura 3.10 verifica-se o conteúdo de rotenona e pachyrhizina nos eixos embrionários isolados dos cotilédones com 0, 24, 48, 96, 120 horas de embebição no escuro constante. Observa-se que a quantidade de rotenona nos eixos e cotilédones (Figura 3.10A) mantidos no escuro, foi muito variável durante todo o período analisado. Os níveis da pachyrhizina (Figura 3.10B) parecem não variar tanto quanto a rotenona.

Em relação à Figura 3.11, realizou-se um experimento em que os eixos embrionários foram separados assépticamente dos cotilédones e mantidos em meio de cultura em luz contínua. O objetivo deste experimento foi verificar o possível local de síntese da rotenona e pachyrhizina e o transporte das substâncias de um órgão ao outro durante a embebição. Verifica-se, de acordo com os resultados, que a quantidade de rotenona (Figura 3.11A) e pachyrhizina (Figura 3.11B) no eixo embrionário e cotilédone nas sementes secas é semelhante aos valores encontrados no experimento da Figura 3.9 e 3.10. Observa-se um ligeiro aumento em 24 horas de embebição nos níveis de rotenona e pachyrhizina no eixo embrionário e cotilédones analisados. Após este período, não houve praticamente mudanças na quantidade dessas substâncias, tanto no eixo embrionário quanto nos cotilédones, até 72 horas de embebição em luz. Portanto, é possível que não ocorra síntese da rotenona e pachyrhizina no eixo embrionário e cotilédones do P.

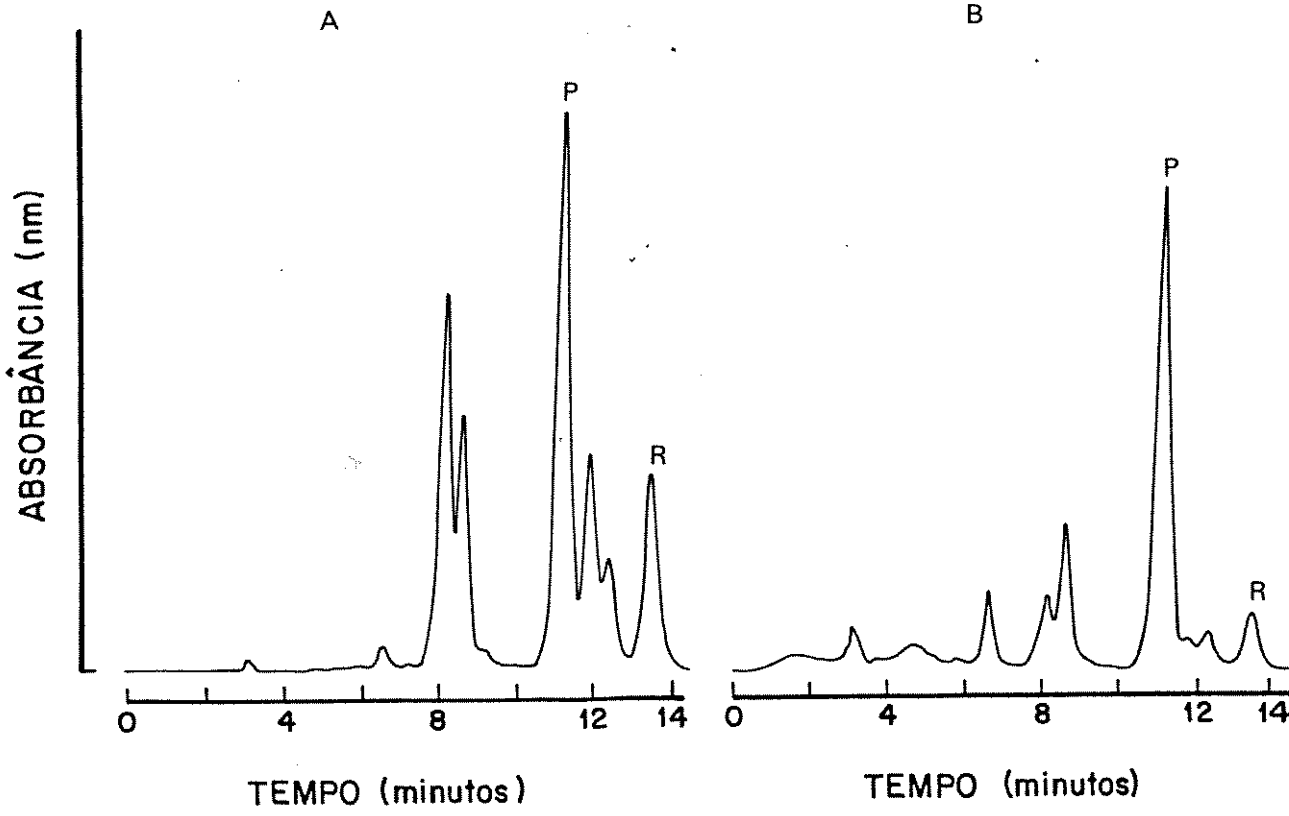




tuberosus. Comparando-se as Figuras 3.9 e 3.10 com a Figura 3.11 A e B, observa-se que estas substâncias parecem estar presentes em quantidades semelhantes nos dois órgãos (eixo embrionário e cotilédones). As variações na quantidade de rotenona e pachyrhizina, no eixo embrionário e cotilédones durante a embebição pode, talvez, ser devido à translocação dessas substâncias, de um órgão para o outro. Isto é sugerido pelo fato de que, quando os embriões e cotilédones foram cultivados separadamente, essas variações não foram observadas.

O cromatograma dos rotenóides das sementes fervidas (97°C por 3 horas), ou não de P. tuberosus, pode ser observado na Figura 3.12.. No cromatograma das sementes não fervidas (Figura 3.12A), observa-se que a maior quantidade das substâncias dosadas é a pachyrhizina, com cerca de 7.53µg/mg de matéria seca. Verifica-se, também na Figura 3.12A, que a rotenona encontra-se presente com 1.34µg/mg de matéria seca. Nas sementes fervidas, (Figura 3.12B), o cromatograma mostra que a pachyrhizina não desaparece ou desnatura, permanecendo com cerca de 7.26µg/mg de peso de matéria seca. Este experimento demonstrou que a pachyrhizina resistiu a altas temperaturas e pressão, enquanto que a rotenona foi parcialmente degradada. Foi verificado também, que nenhuma substância foi detectada no extrato da água fervida, pelo menos nas condições utilizadas para a análise cromatográfica neste trabalho.

Os isoflavonóides estão presentes em muitas leguminosas como Lonchocarpus, Derris, Tephrosia, e Pachyrhizus (NORTON, 1943;



HANSBERRY *et al.* 1947; KRISHNAMURTI *et al.* 1970; HARBONE, 1971 e BIRCH *et al.* 1985). De acordo com SORENSEN (1990), os estudos no gênero Pachyrhizus, em relação aos compostos com propriedades inseticidas, tem se concentrado principalmente em P. erosus. Alguns autores, propuseram e determinaram por processos qualitativos a rotenona, erosona e pachyrhizina nas sementes de P. erosus, P. ahipa e P. tuberosus (HANSBERRY *et al.* 1947; KRISHNAMURTI *et al.* 1970 e BORTOLATO *et al.* 1985). É possível que os rotenóides estejam localizados principalmente nas sementes no gênero Pachyrhizus (SCHROEDER, 1968). ALVARENGA (1987), utilizando o método colorimétrico para determinação dos isoflavonóides nas sementes de P. tuberosus, observou uma grande quantidade da rotenona nos cotilédones, até 48 horas de embebição em luz. Os níveis dessas substâncias nas sementes do P. tuberosus, parecem ser inferiores aos valores encontrados nas sementes de P. erosus (SCHROEDER, 1968).

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho determinou-se que os cotilédones de P. tuberosus possuem maior quantidade de pachyrhizina e de rotenona, quando comparados com o eixo embrionário, pelo menos nos períodos de embebição em luz. Além disso, os níveis de pachyrhizina são sempre maiores do que os de rotenona, tanto nos eixos embrionários quanto nos cotilédones das sementes desta planta. É possível que estes níveis não interferiram no desenvolvimento das plântulas de P. tuberosus. Não há uma relação entre os níveis da rotenona e pachyrhizina, com o aumento do peso de matéria seca, durante a embebição, principalmente

no eixo embrionário desta espécie. Esses níveis são variáveis durante a embebição das sementes até 120 horas em luz e escuro contínuos.

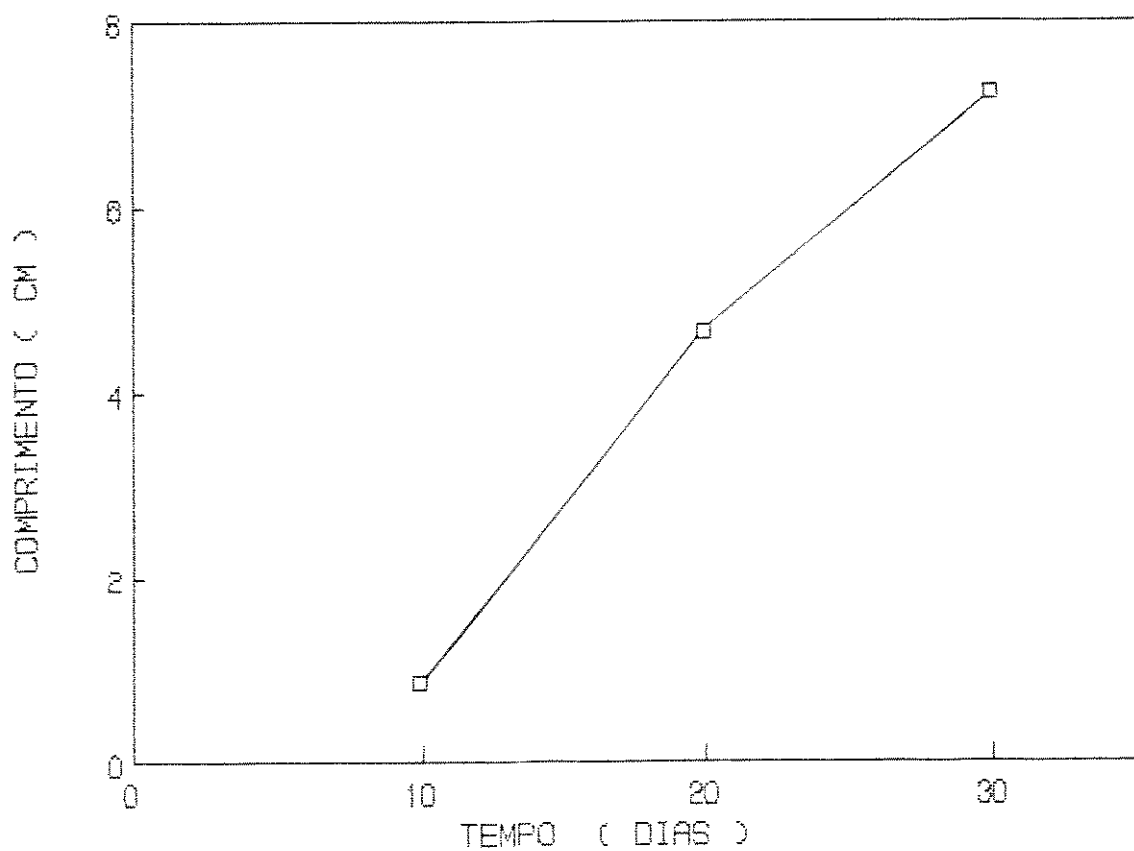
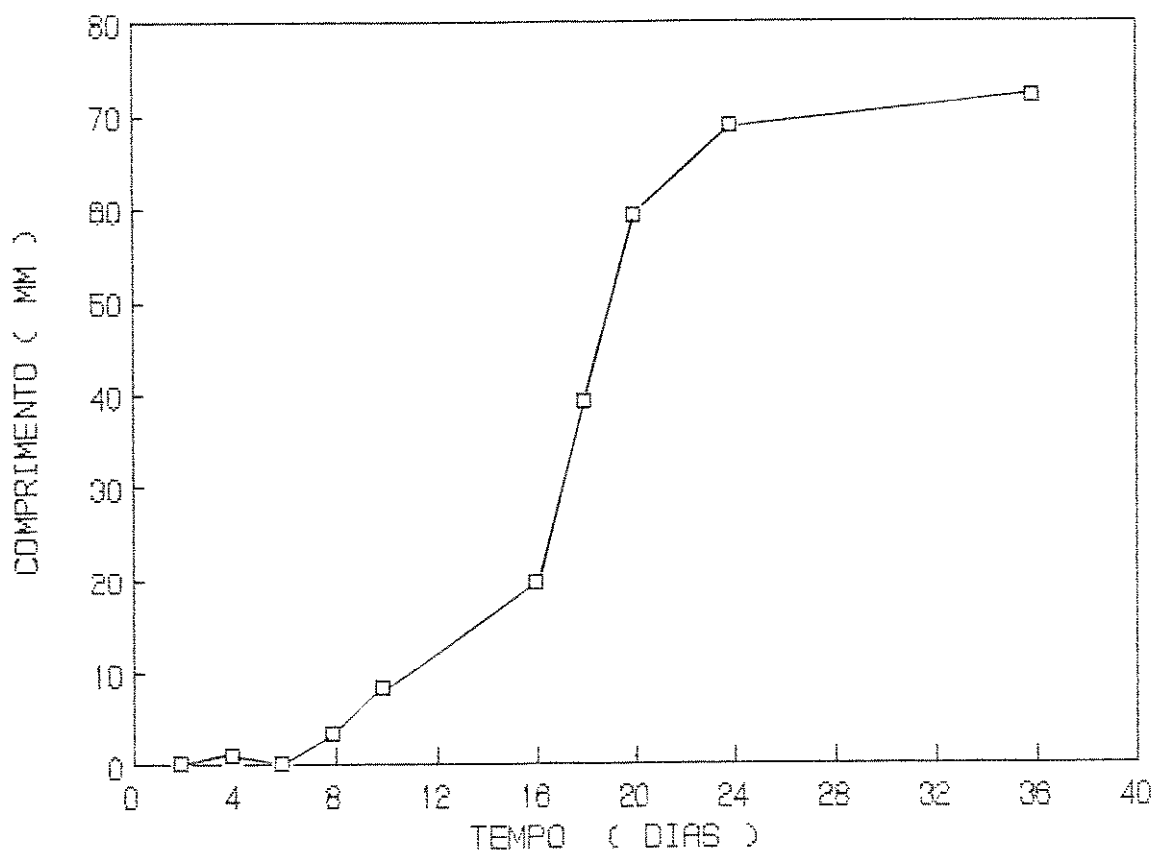
3.2.2. Folhas primárias de *P. tuberosus*.

Nesta etapa do trabalho, realizaram-se a extração e dosagem dos isoflavóides das folhas primárias de *P. tuberosus*. O objetivo dos experimentos foi verificar o nível de rotenona e pachyrhizina durante o desenvolvimento dessas folhas. Para isto foi estudado o crescimento das folhas, utilizando o comprimento da nervura principal.

Verifica-se, na Figura 3.13, que as folhas apresentam um crescimento trifásico, ou seja, um crescimento inicial lento seguido de uma fase de rápido crescimento e de uma fase posterior de estabilização.

Para verificar o nível da rotenona e pachyrhizina durante este crescimento, optou-se por analisar as folhas primárias no 10º, 20º e 30º dia de crescimento. A Figura 3.14 apresenta os resultados do comprimento destas folhas nestes tempos. Observa-se uma relação aparentemente linear entre crescimento e tempo com um coeficiente de regressão de 0.99.

Foi feita também a análise de matéria seca e fresca dessas folhas, sendo os resultados mostrados na Figura 3.15.. De acordo com os resultados, verifica-se que, nos períodos analisados, ocorreu um aumento tanto no peso de matéria seca, quanto no peso

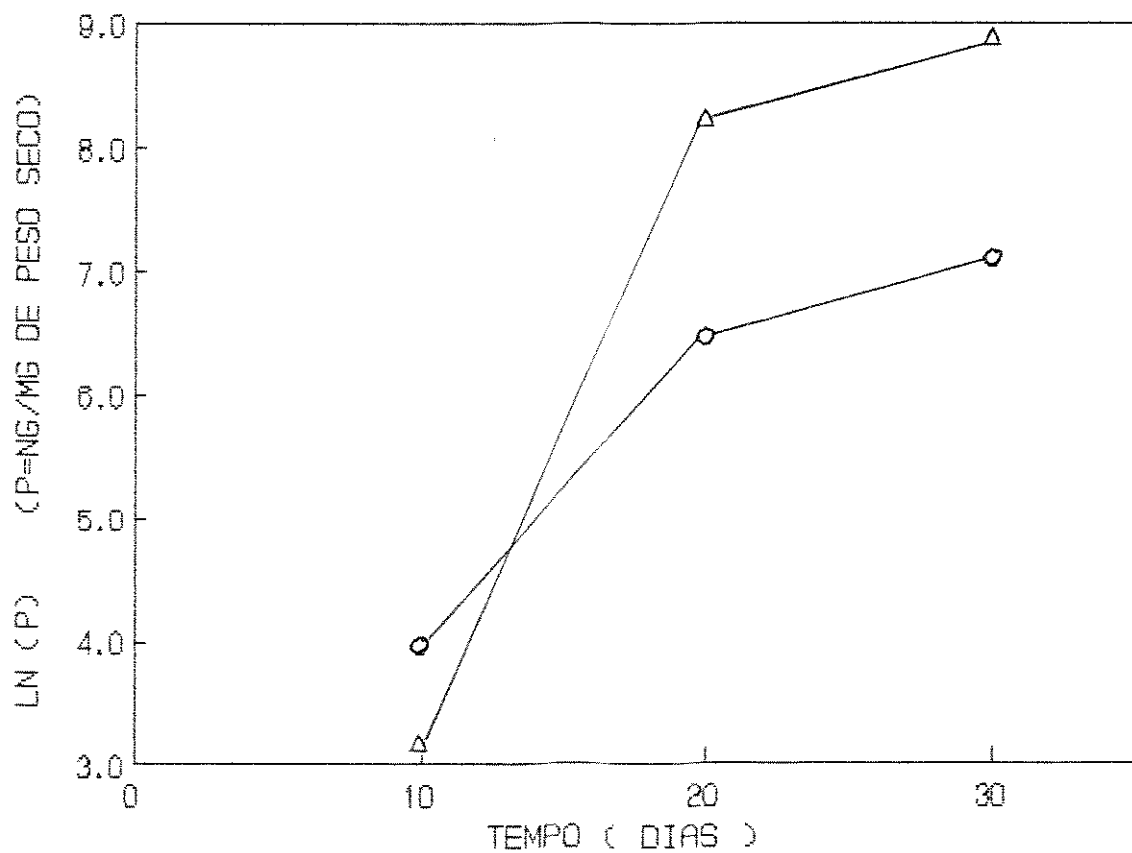
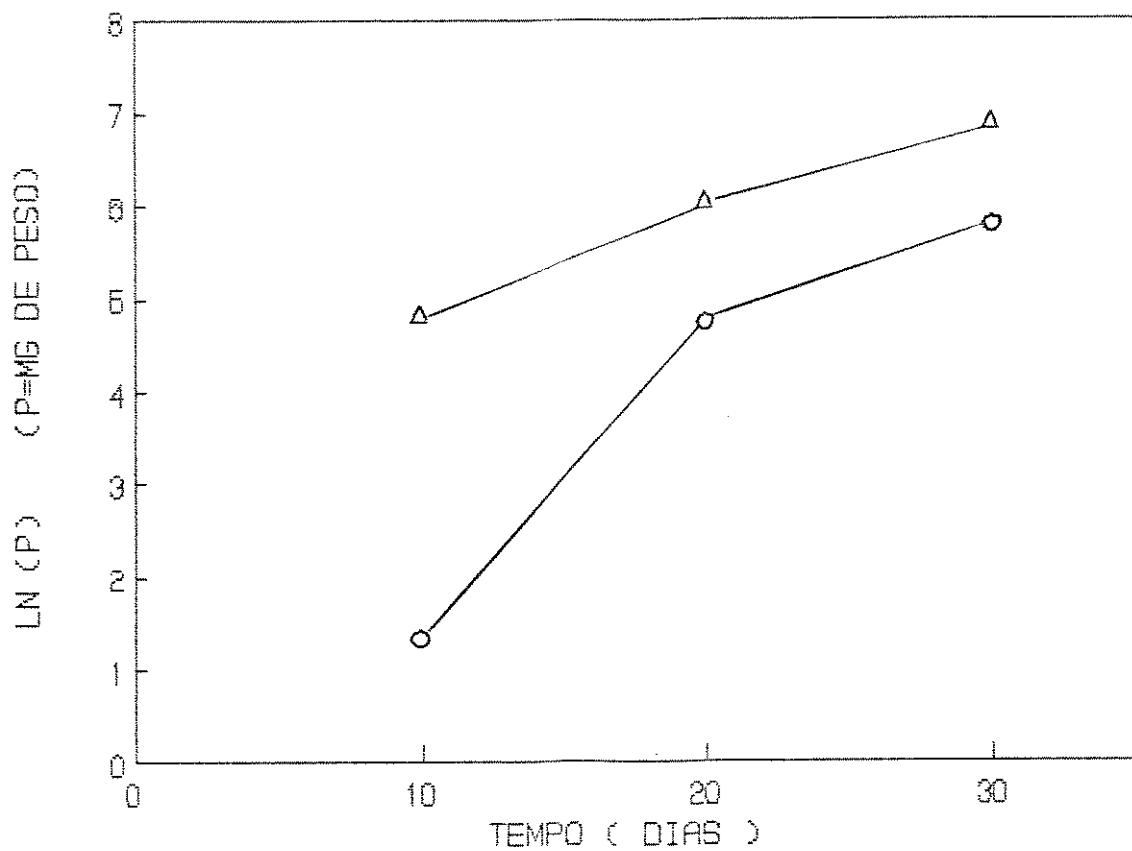


de matéria fresca. A partir do 20^o dia até o final do experimento o peso da matéria seca permanece praticamente estável com cerca de 343mg.

Neste trabalho, foi possível estabelecer os níveis de rotenona e pachyrhizina nas folhas primárias de *P. tuberosus*, utilizando a cromatografia líquida de fase reversa.

A quantidade de rotenona e pachyrhizina encontrada nas folhas primárias de *P. tuberosus* é mostrada na Figura 3.16.. No primeiro dia de análise (10^o dia do desenvolvimento da folha), a quantidade de rotenona encontrada é maior do que a quantidade de pachyrhizina. Nos outros dias analisados, observa-se um aumento das duas substâncias concomitante com o aumento da matéria seca. Verifica-se que a quantidade de pachyrhizina nas folhas primárias é maior do que a de rotenona. Nota-se, também, que a quantidade de pachyrhizina e principalmente a de rotenona é maior nas folhas primárias (20^o e 30^o dia) do que nas sementes em desenvolvimento (Figuras 3.9, 3.10 e 3.16).

BERTONI, 1913 *apud* SORENSEN, 1990 verificou que há indícios de que extratos das folhas de *P. tuberosus* já eram utilizadas pelos índios do rio Paraná (Paraguai) como inseticida. No entanto, os dados de quantificação de rotenona em folhas são escassos na literatura devido a dificuldade encontrada durante a extração e separação dessas substâncias dos pigmentos verdes (SESHADRI, 1971). É possível que todas as partes da planta de *Pachyrhizus*, que estão acima do solo possuam rotenona e pachyrhizina (SORENSEN, 1988).



3.2.3. Exsudato de caule P. tuberosus.

Os exsudatos do caule de plantas com e sem flores e do pedúnculo da inflorescência de P. tuberosus foram analisados. O objetivo destes experimentos foi verificar se rotenona e pachyrhizina poderiam ser transportadas pela seiva, fornecendo uma possível idéia do local ou do órgão onde seriam sintetizadas.

De acordo com as condições estabelecidas pelo método de dosagem empregado, nenhuma substância foi detectada no exsudato do caule e no exsudato do pedúnculo da inflorescência. Portanto, rotenona e pachyrhizina não são transportadas no caule de P. tuberosus, sugerindo que essas substâncias devem ser sintetizadas independentemente nos diferentes órgãos, tais como folhas, sementes e raízes desta planta.

3.2.4. Frutos de P. tuberosus.

O crescimento dos frutos de P. tuberosus foi estudado através dos parâmetros, peso de matéria fresca (mg) e comprimento (cm). Posteriormente, verificou-se o conteúdo de rotenona e pachyrhizina nos frutos, durante um determinado período de crescimento.

O crescimento dos frutos de P. tuberosus é mostrado na Figura 3.17 e nota-se que ocorre um aumento de matéria fresca nas vagens, a partir de 10cm de comprimento até atingirem 22cm, che-

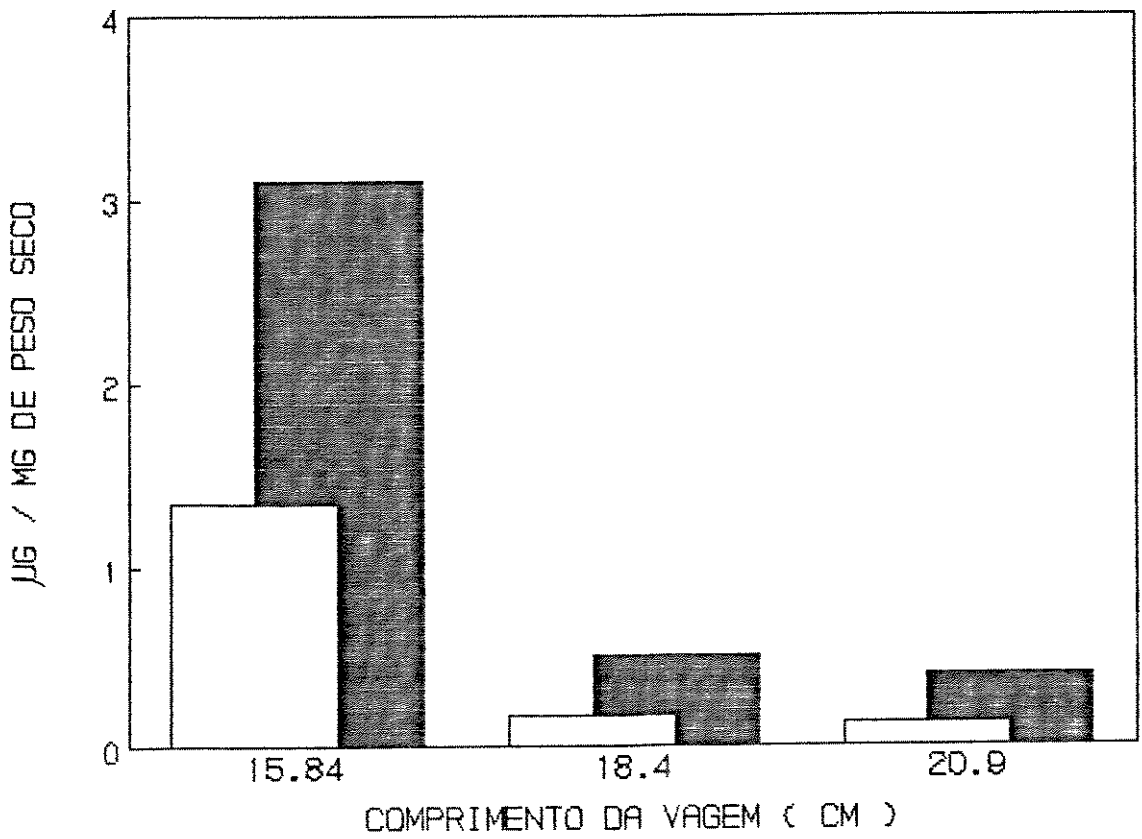
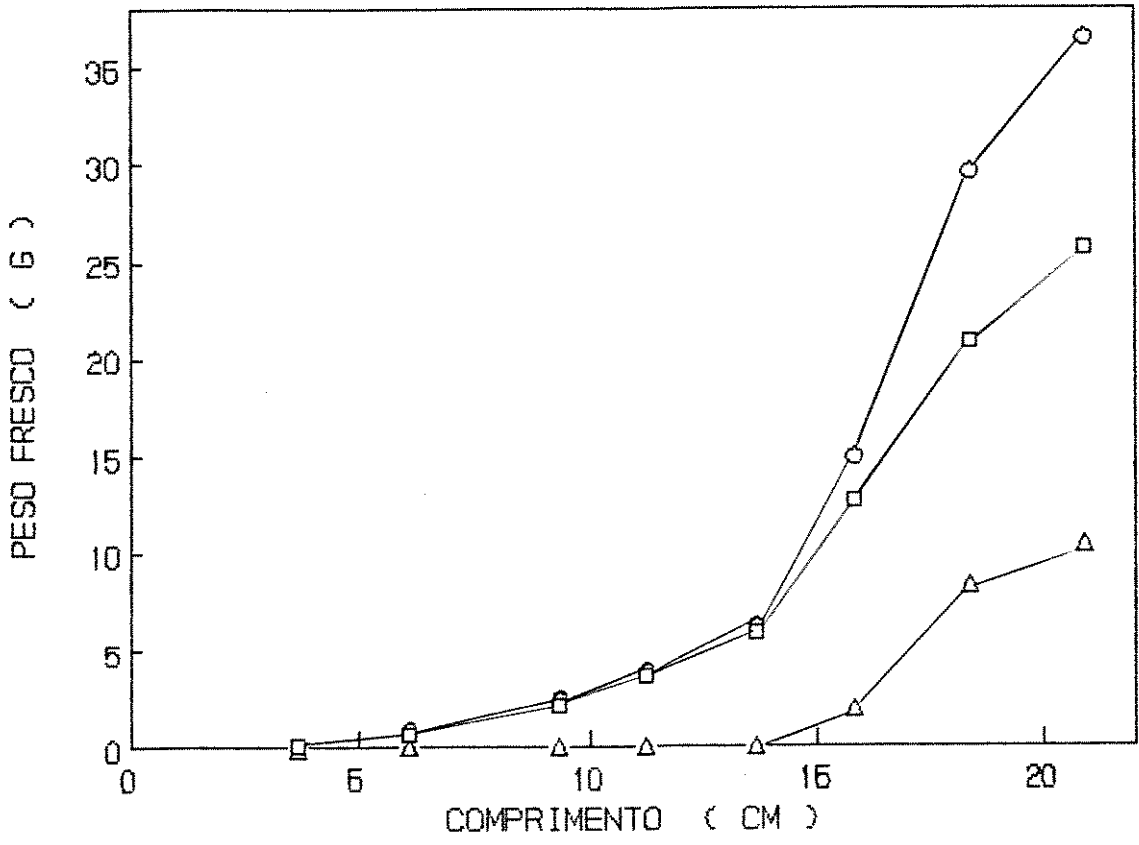
gando então a 36g. Já nas sementes destes frutos, o início do aumento de matéria fresca só acontece quando as vagens atingem 15cm de comprimento. De acordo com os resultados, as sementes das vagens com 22cm de comprimento possuem 10.5g de matéria fresca (cerca de oito sementes por vagem).

Rotenona e pachyrhizina foram detectadas somente em sementes de vagens a partir de 15,8cm de comprimento. Não foi detectada nenhuma das substâncias estudadas nas vagens e nas sementes mais novas ou seja, sementes contidas em vagens com tamanho inferior ao de 15,8cm de comprimento. Em vagens maiores (18,4 e 20,9cm) a quantidade de rotenona detectada nas sementes foi menor do que nas vagens com 15,8cm. A quantidade de pachyrhizina nas sementes foi sempre maior do que a de rotenona (Figura 3.18).

A análise cromatográfica efetuada nos extratos de vagens em oito estádios diferentes em plantas de *P. tuberosus*, não detectou a presença de rotenona e pachyrhizina em sementes e vagens imaturas. Igualmente, não foram encontradas essas mesmas substâncias nas inflorescências de *P. tuberosus* (200mg de matéria seca). Estes dados sugerem a possibilidade do consumo das sementes e vagens imaturas de *P. tuberosus* na alimentação, como ocorre com as sementes imaturas (SCHROEDER, 1968) de *Pachyrhizus erosus*.

3.2.5. Raízes de plantas de *P. tuberosus*.

A Figura 3.19 apresenta resultados do cromatograma obtido do extrato das raízes de plântulas crescidas no escuro contínuo.



Cerca de 1.33 μ g de rotenona e 1.87 μ g de pachyrhizina por miligrama de matéria seca foram determinadas neste extrato.

De acordo com a Tabela 3.2, verifica-se que, com as análises feitas para dosagem dos isoflavonóides, somente a rotenona foi encontrada na raiz tuberosa de P. tuberosus. Detectou-se cerca de 0.14 μ g/mg de rotenona na raiz tuberosa inteira (com casca), sendo que a maior quantidade concentra-se na região do colo. Assim, após a tuberização das raízes, a pachyrhizina não foi detectada e os níveis de rotenona foram bastante reduzidos.

O tubérculo de Pachyrhizus erosus, contém amido, glicose e frutose, podendo ser consumido cru ou cozido, pois não contém rotenona (ZINSOU 1987a). De acordo com NODA *et al.* (1984), as raízes tuberosas de Pachyrhizuz tuberosus, são também consumidas na alimentação na região Amazônica.

3.3. Efeito de rotenona e pachyrhizina, bem como do exsudato das sementes na germinação de P. tuberosus.

As sementes de P. tuberosus possuem cerca de 0.59 μ g de rotenona e 20.7 μ g de pachyrhizina por miligrama de peso seco. Como estas substâncias são inibidoras de metabolismo, o objetivo destes experimentos foi verificar seus efeitos principalmente o de rotenona, na germinação de sementes desta planta.

O efeito dos isoflavonóides, rotenona e pachyrhizina, na germinação de sementes de P. tuberosus em luz e escuro a 25°C é

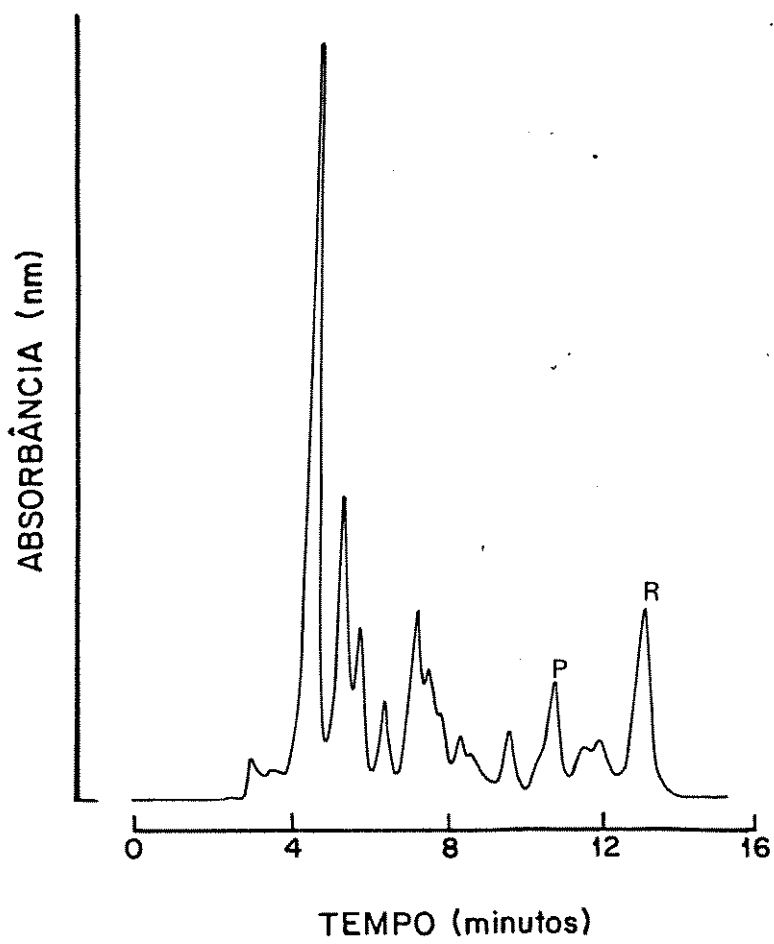


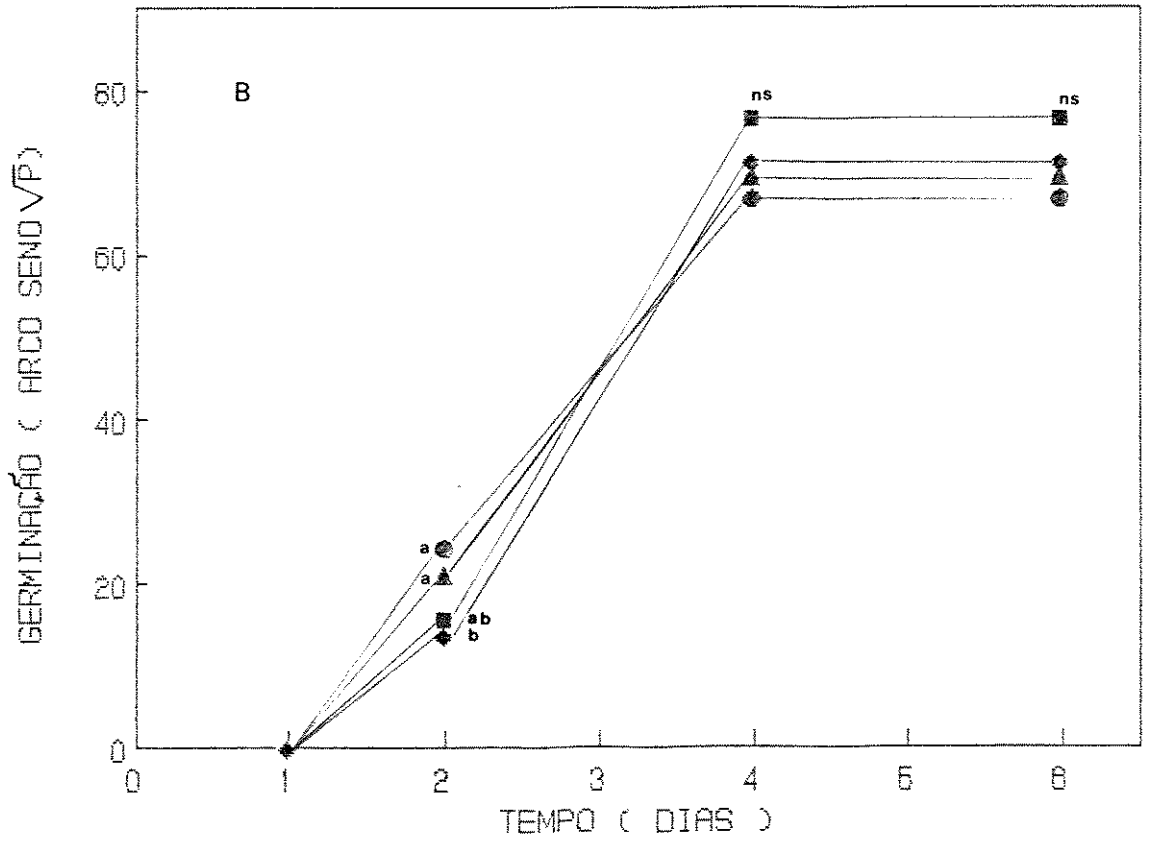
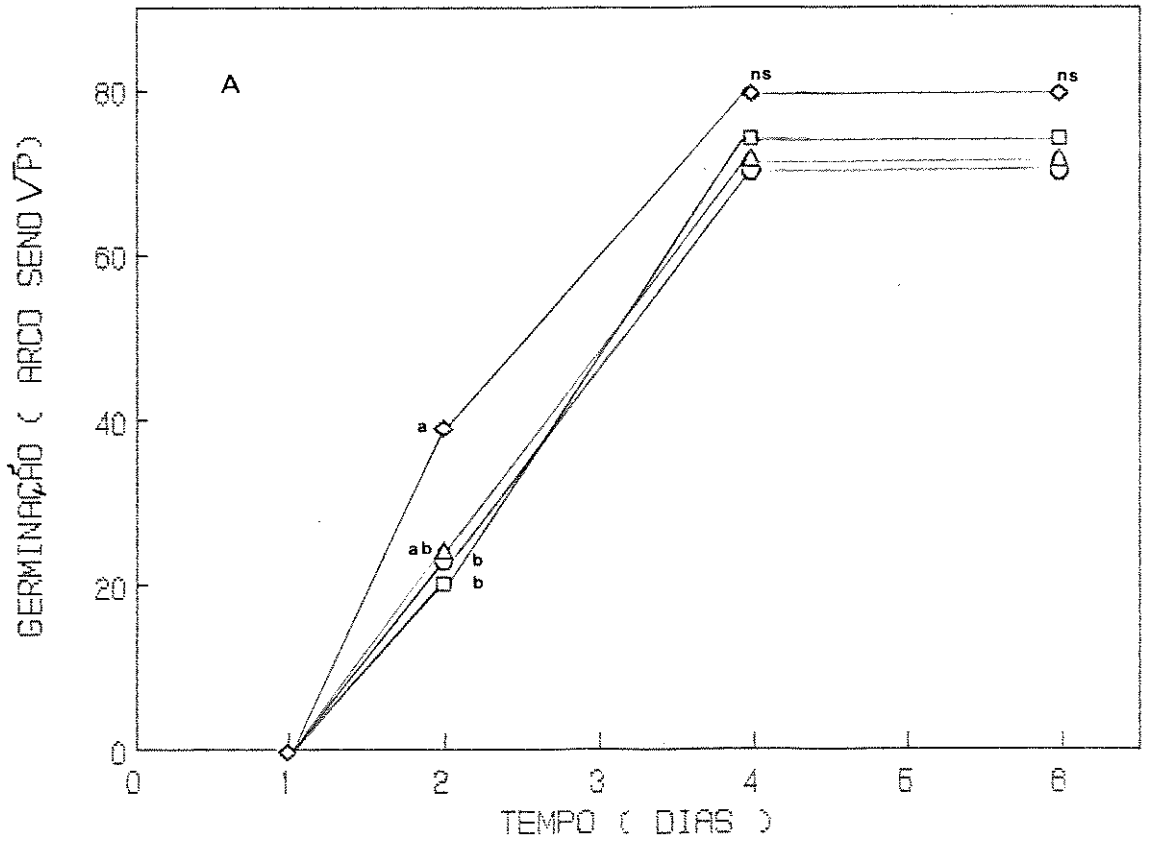
TABELA 3.2. Conteúdo de rotenona dosado na raiz tuberosa de plantas com 235 dias de idade de *P. tuberosus*.
 I- raiz inteira; II-região do colo, sem casca;
 III-região superficial do córtex sem casca; IV-re-
 gião do superficial do córtex com casca; V-re-
 gião inter na do córtex.

	rotenona ($\mu\text{g}/\text{mg}$ peso seco)
I	0.14
II	0.11
III	0.00
IV	0.00
V	0.00

mostrado na Figura 3.20. As sementes foram imersas em soluções de rotenona e pachyrhizina a 10^{-4}M , dissolvidas em diclorometano durante 15 minutos, de acordo com o item 2.3. Observou-se que, no experimento com luz constante (Figura 3.20A), não houve diferença significativa entre a germinação de sementes embebidas em água destilada e em diclorometano. Em relação às substâncias testadas, somente a concentração de 10^{-4}M de pachyrhizina mostrou-se promotora da germinação apenas no segundo dia após o início da embebição. A partir do quarto dia, não houve diferenças significativas entre a germinação de sementes embebidas com rotenona, pachyrhizina e os controles com água destilada ou diclorometano. O coeficiente de variação no segundo dia foi de 32% e para o quarto e sexto dia foi de 7.3%.

A Figura 3.20B apresenta resultados do efeito da rotenona e pachyrhizina na germinação, no escuro a 25°C . Neste caso, também, não houve diferenças significativas entre os controles em água e diclorometano. Entretanto, no escuro, a germinação de sementes embebidas em solução de pachyrhizina numa concentração de 10^{-4}M foi significativamente menor do que nos controles com água destilada ou diclorometano, apenas no segundo dia após o início da embebição. A partir do quarto dia de embebição, não houve diferenças significativas entre os tratamentos. O coeficiente de variação para o segundo dia foi de 21.8% e para o quarto e sexto dia de germinação foi de 10%.

Pode-se observar que a imersão por quinze minutos no diclorometano não afetou a germinação das sementes de *P. tuberosus*



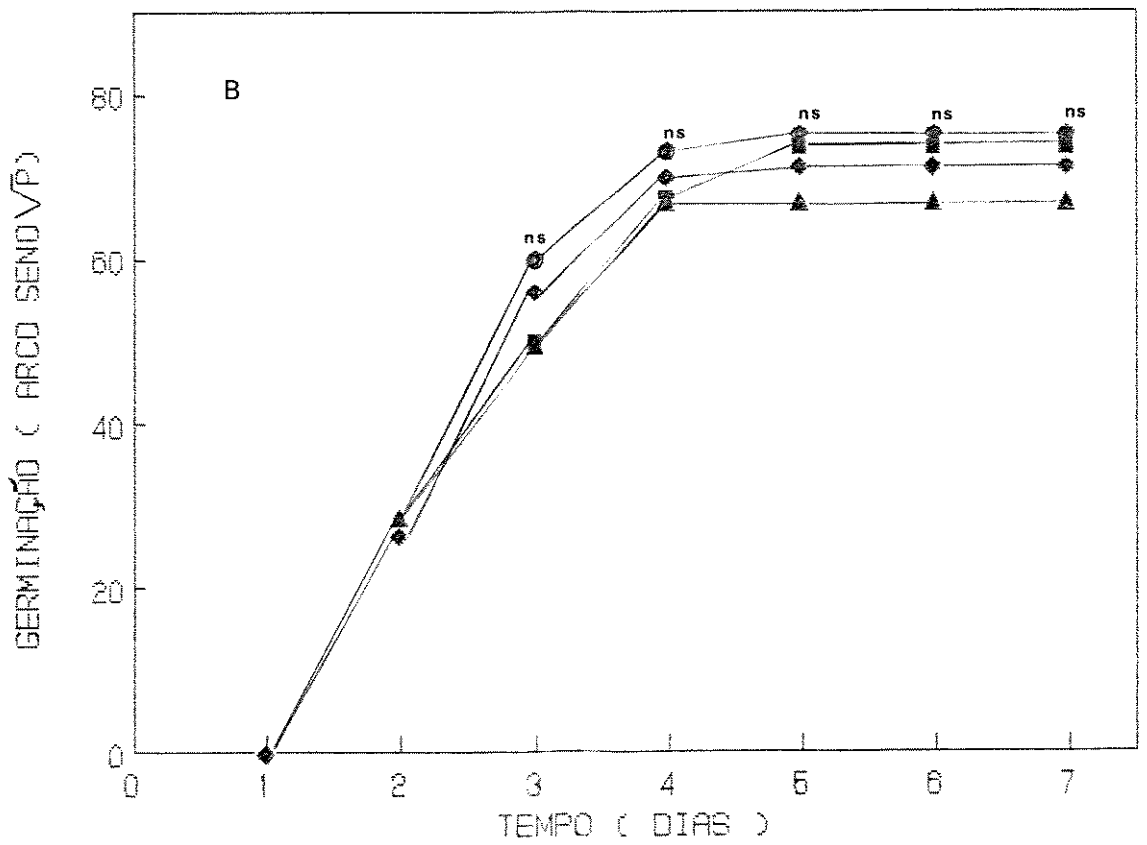
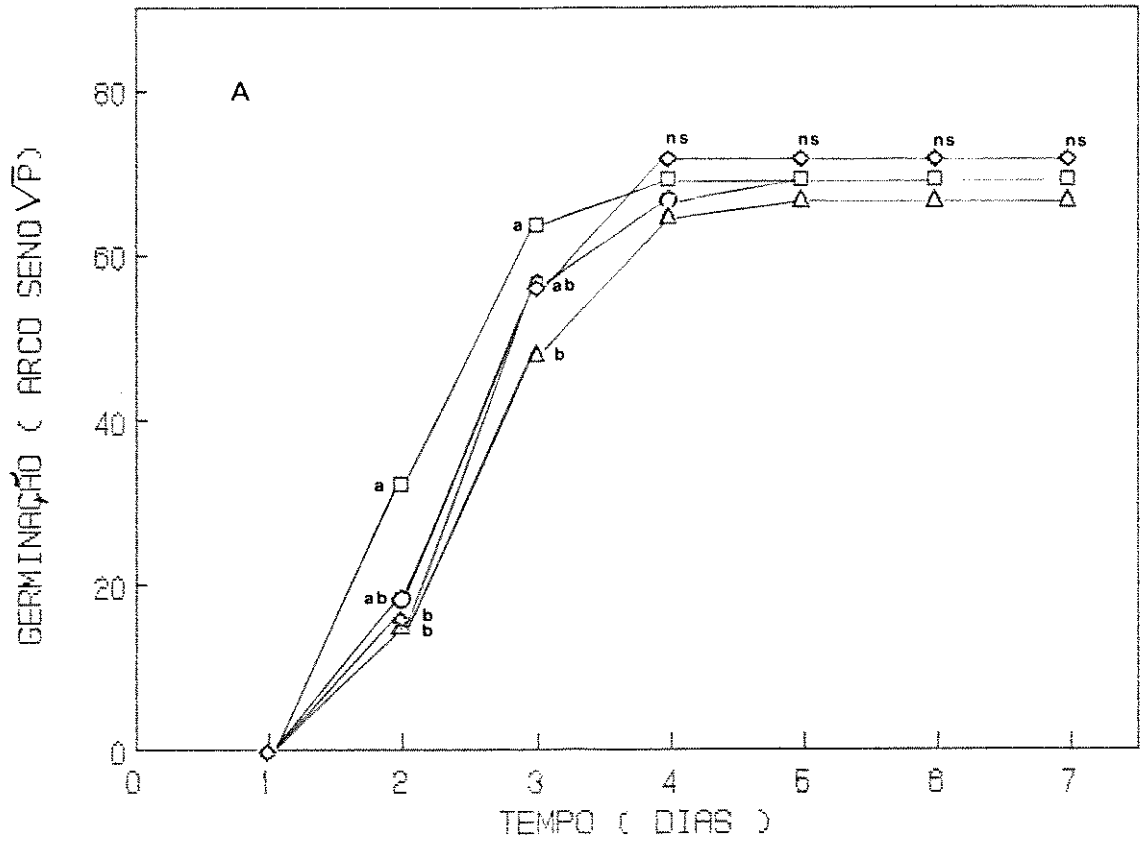
tanto em luz como no escuro contínuos. Parece que rotenona e pachyrhizina, na concentração utilizada nestes experimentos, não alteraram o padrão da germinação de sementes de *P. tuberosus*.

Foram testadas diferentes concentrações de rotenona. A Figura 3.21 mostra resultados obtidos em experimentos onde utilizou-se rotenona nas concentrações de $10^{-2}M$, $10^{-3}M$ e $10^{-4}M$. Foi verificado o efeito dessas concentrações na germinação de sementes mantidas na luz (Figura 3.21A) e no escuro (Figura 3.21B).

Observou-se que, em relação ao controle de sementes embebidas em diclorometano, não houve diferenças significativas entre as concentrações de rotenona utilizadas. No segundo dia após o início da embebição (na luz), verificou-se que rotenona a $10^{-3}M$ teve um efeito promotor na germinação em relação às concentrações de $10^{-4}M$ e $10^{-2}M$. Essa diferença se manteve no terceiro dia, entre as concentrações de $10^{-4}M$ e $10^{-3}M$. Entretanto, a partir do quarto dia do início da embebição, não foram verificadas diferenças entre os tratamentos. O coeficiente de variação dos tratamentos a partir deste dia foi de 6.3%.

Em relação às sementes germinadas no escuro, (Figura 3.21B), não houve diferenças significativas na germinação, avaliadas em diferentes concentrações de rotenona, ou entre essas e o controle, durante todo o período do experimento

Pelos resultados apresentados, verificou-se que rotenona, nas concentrações utilizadas, não afetou a germinação de sementes de *P. tuberosus*, tanto na luz como no escuro a $25^{\circ}C$. Isto poderia ter sido ocasionado pela não penetração da rotenona nas se-

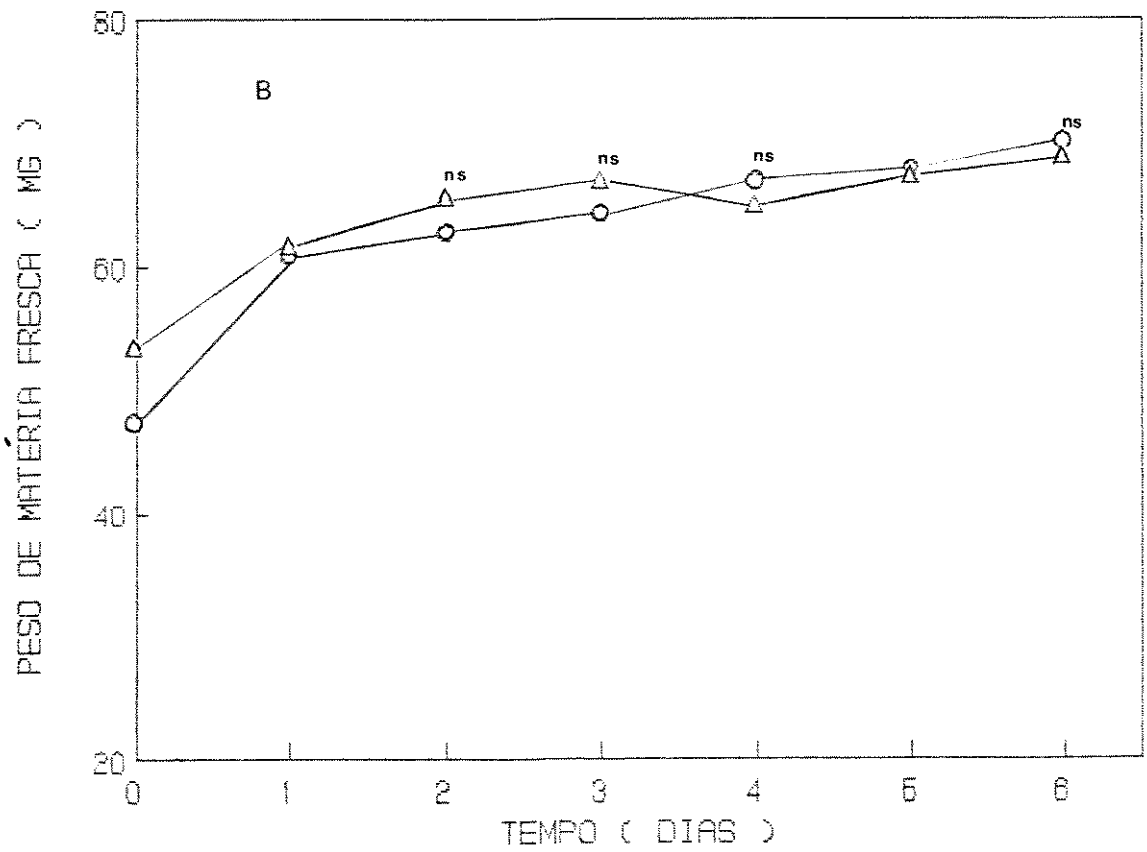
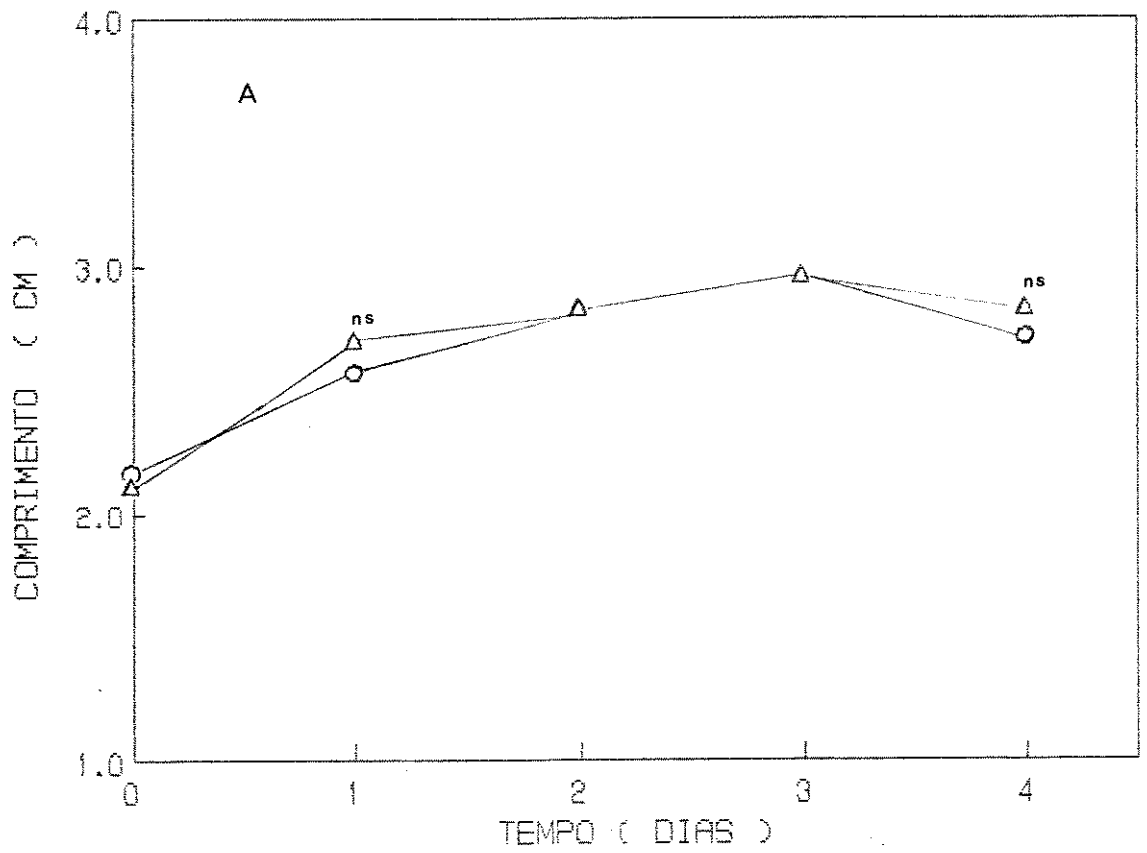


mentos do *P. tuberosus* durante a embebição. Sendo assim, testamos o efeito da rotenona, da pachyrhizina e do exsudato das sementes, no crescimento inicial dos eixos embrionários do *P. tuberosus*.

A Figura 3.22 mostra o efeito do exsudato das sementes no crescimento dos eixos embrionários das mesmas sementes, em luz a 25°C. O exsudato obtido de sementes embebidas por 48 horas no escuro, não teve efeito significativo tanto no comprimento do eixo embrionário (Figura 3.22A), quanto no seu peso fresco (Figura 3.22B). Verificou-se também, neste experimento, que o parâmetro de peso de matéria fresca reduziu a variação ocasionada pelo manuseio dos eixos embrionários. Desta forma, na série de experimentos a seguir, efetuou-se o estudo do crescimento utilizando somente o peso de matéria fresca.

O efeito da concentração de $10^{-4}M$ de rotenona e pachyrhizina, no crescimento inicial dos eixos embrionários, isolados após 24 horas do início da embebição, em luz e escuro à 25°C é observado na Figura 3.23. Verifica-se que não ocorrem diferenças significativas no crescimento medido em peso de matéria fresca (mg) dos eixos embrionários tratados com rotenona e pachyrhizina, na concentração de $10^{-4}M$, até o décimo dia analisado, em luz (Figura 3.23A) e escuro (Figura 3.23B).

A Tabela 3.3 indica que não ocorrem diferenças significativas no peso de matéria seca (mg) dos eixos embrionários, utilizados para o experimento da Figura 3.23, tratados com rotenona, pachyrhizina e água destilada, em luz e escuro a 25°C.



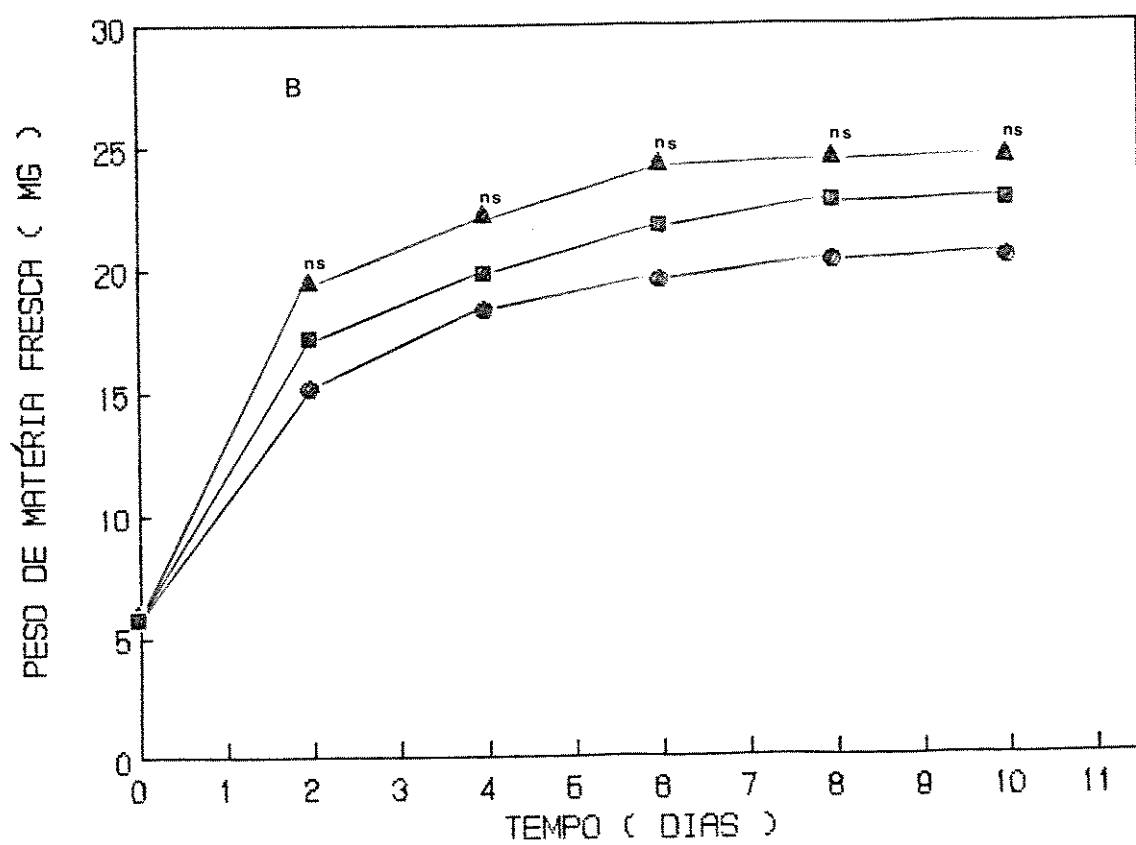
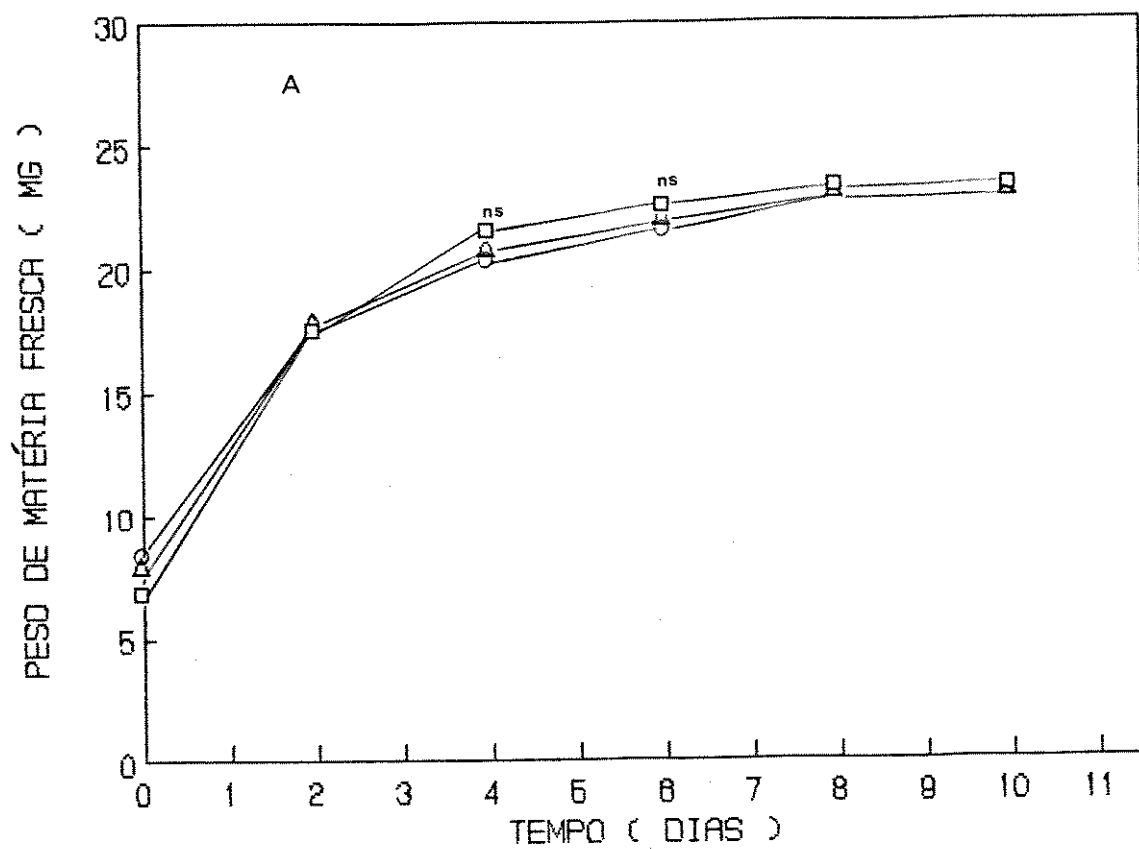


TABELA 3.3. Peso de matéria seca (mg) dos eixos embrionários de *P. tuberosus* submetidos aos tratamentos com rotenona e pachyrhizina na concentração de $10^{-4}M$, em luz e escuro contínuos a $25^{\circ}C$.

	peso de matéria seca (mg)		
	controle	rotenona	pachyrhizina
luz	1.83(ns)	1.70(ns)	1.66(ns)
escuro	1.79(ns)	1.75(ns)	1.72(ns)

(ns) - valores não significativos estatisticamente.

Portanto, os resultados demonstram que rotenona e pachyrhizina presentes nas sementes de *P. tuberosus*, não tem efeito na germinação e no crescimento inicial dos eixos embrionários.

Germinação pode ser definida como uma sequência de eventos morfogênicos e fisiológicos que resultam na transformação do embrião em plântula (BERLYN, 1972; BRADBEER, 1988). Um adequado suprimento de água, composição de gases na atmosfera e condições apropriadas de luz e temperatura, são requisitos necessários para a germinação de sementes da maioria das espécies (MAYER & POLJAKOFF-MAYBER, 1982). Durante a germinação e crescimento da plântula, substâncias de crescimento regulam a síntese ou a liberação de enzimas necessárias à mobilização de reservas (METIVIER & PAULILO, 1980; BEWLEY & BLACK, 1983 e BRADBEER, 1988). Além dos hormônios, substâncias do grupo dos isoflavonóides podem também influenciar e participar do desenvolvimento das sementes, no controle da germinação e crescimento de plântulas (HARBORNE, 1967; DIETRICH 1979, e BEWLEY & BLACK, 1983). Foi verificado que cumarina não afeta a germinação de *Coumarouna odorata* e *Myroxylon peruiferum*, porém, esta substância inibe a germinação de alface, tomate e rabanete (BERRIE, 1968; VALIO, 1973; MAYER & POLJAKOFF-MAYBER, 1982 e INENAMI, 1984). ALVARENGA (1987) demonstrou, em seu trabalho com *P. tuberosus*, que a pachyrhizina, um tipo de cumarina, inibiu totalmente a germinação de sementes de alface. Em relação ao efeito da rotenona e outros isoflavonóides na germinação de sementes, praticamente nada se conhece. Foi verificado que somente rotenona inibiu em 56% a germinação de sementes de

alface. Esta inibição, nas sementes de alface, foi diminuindo gradativamente após 24 horas de embebição, sugerindo uma possível alteração metabólica dessas substâncias (ALVARENGA, 1987).

3.4. Efeito de rotenona e pachyrhizina na atividade respiratória de mitocôndrias isoladas de *P. tuberosus*.

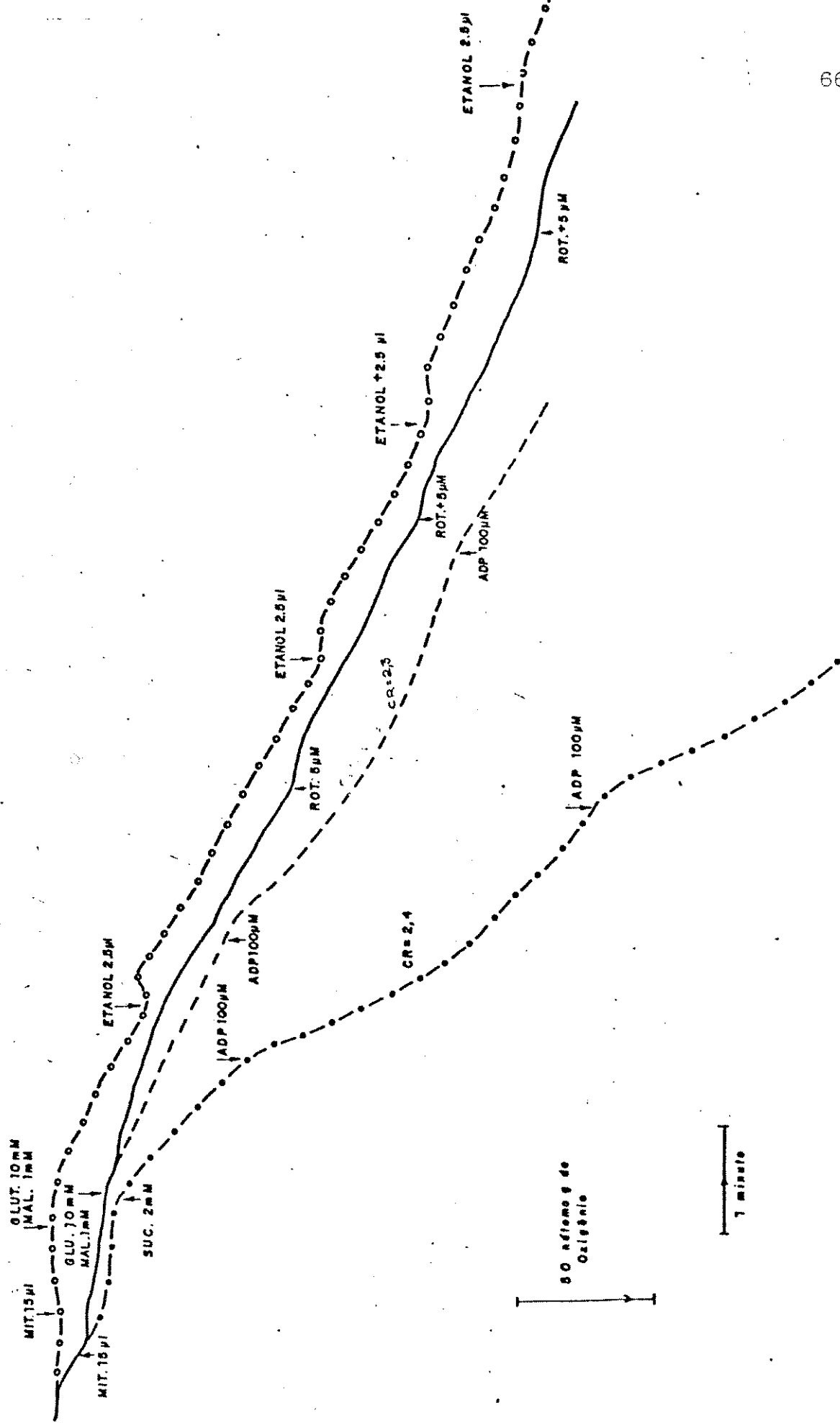
Estudos com mitocôndrias isoladas de animais e vegetais mostram que rotenona exerce um efeito inibitório no transporte de elétrons, diminuindo o consumo de oxigênio.

Pelos resultados apresentados neste trabalho, *P. tuberosus* possui cerca de 0.59 μ g de rotenona por miligrama de peso seco na semente, sendo 0.06 μ g no eixo embrionário. Entretanto, como a aplicação de rotenona não interferiu na germinação e no crescimento inicial dos eixos embrionários, estudou-se a seguir o efeito da rotenona e da pachyrhizina, na atividade respiratória de mitocôndrias isoladas do *P. tuberosus*.

Na Figura 3.24 observa-se a atividade respiratória em mitocôndrias isoladas de plântulas de *P. tuberosus*. As preparações mitocôndriais (15 μ l), consomem oxigênio lentamente na ausência de substrato respiratório, sendo a taxa de consumo aumentada pela adição do succinato. Este intermediário, do ciclo de Krebs, adicionado ao meio de reação, ativa a succinato desidrogenase (enzima presente somente na mitocôndria) e observa-se o aumento do consumo de oxigênio. O transporte eletrônico se processa em uma velocidade máxima somente quando o fosfato e ADP estão presentes

Figura 3.24. Efeito de rotenona na atividade respiratória, nas mitocôndrias isoladas dos epicótilos das plântulas de Pachyrhizius tuberosus, contendo como meio de reação, sacarose 0.3M, KCl 20mM, HEPES 2mM e BSA 0.1%. Succ.=succinato, glut.=glutamato, mal.=malato, rot.=rotenona, mit.=mitocôndria e C.R.=controle respiratório.

- succ. 2mM e ADP 100µM
- mal. 1mM, glut. 20mM e ADP 100µM
- mal. 1mM, glut. 20mM e rot. 5µM
- mal. 1mM, glut. 20mM e etanol 2.5µL



no meio de reação. Quando uma quantidade conhecida de ADP é adicionada ao meio de reação, o consumo de oxigênio aumenta até um máximo, sendo o ADP fosforilado, produzindo ATP. Esta fase é denominada de "estado 3". Quando todo o ADP adicionado foi fosforilado, a velocidade de consumo do oxigênio diminui, sendo este período denominado de "estado 4". Este fenômeno, no qual a velocidade do transporte de elétrons é controlada pela concentração de ADP, é denominado de controle respiratório. O controle do ADP sobre a taxa de consumo de oxigênio é indicativo do acoplamento da fosforilação oxidativa e é caracterizado pela razão entre a velocidade de respiração no estado 3 e no estado 4. Para as mitocôndrias vegetais, o controle respiratório geralmente está entre 2 e 10 (LEHNINGER, 1976; DOUCE, 1985 e CARNIERI, 1986). Entretanto, muitas plantas possuem uma via alternativa, que não resulta em síntese de ATP, conduzindo a uma elevada velocidade no estado 4, e contribuindo para um controle respiratório baixo, sem indicar um preparado mitocondrial ruim (DOUCE, 1985). Como pode ser observado nestes resultados, o controle respiratório foi 2.4 quando adicionado succinato a 2mM, e 2.3 quando adicionado malato a 1mM com glutamato a 20mM, mostrando que o preparado mitocondrial estava funcional. Nesta Figura 3.24, nota-se claramente que com adições subsequentes de rotenona na concentração de 5 μ M, não houve praticamente uma diminuição no consumo de oxigênio, e a tendência à diminuição do consumo foi provocada pelo etanol utilizado para dissolver a rotenona. Entretanto, para este experimento não foi calculada a velocidade de consumo de oxigênio, pois não

foi possível estimar a quantidade de proteína pelo método de KIES & MURPHY (1960), comumente usado em preparados mitocondriais devido a presença de clorofilas. Mesmo assim, esses resultados indicam que rotenona, na concentração utilizada, parece não inibir o consumo de oxigênio na cadeia respiratória das mitocôndrias de P. tuberosus.

A Figura 3.25 também mostra os resultados da atividade respiratória das mitocôndrias isoladas de plântulas de P. tuberosus. Neste experimento, após a centrifugação diferencial, obteve-se uma suspensão mitocondrial com 69mg de proteína por mililitro. Verifica-se que as mitocôndrias estavam funcionais, pois com a adição de succinato o controle respiratório foi de 3.3 e com malato mais glutamato foi de 2.27. Neste experimento foi utilizado um agente desacoplador, o FCCP, substância que estimula a velocidade de incorporação do oxigênio, permitindo a continuação do transporte eletrônico, evitando a fosforilação do ADP a ATP. Logo, com esta substância adicionada ao meio de reação, poderia se ter uma melhor visualização do efeito inibitório de rotenona e pachyrhizina.

A Figura 3.26 mostra a atividade respiratória nas mitocôndrias com rotenona e pachyrhizina adicionadas ao meio de incubação. Pelos resultados, nota-se que, mesmo com a adição do FCCP, a rotenona e a pachyrhizina nas concentrações utilizadas não inibem o consumo de oxigênio em mitocôndrias isoladas de P. tuberosus. Uma leve diminuição no consumo de oxigênio é observada, porém esta é devido a utilização do etanol para solubilizar a

Figura 3.25. Atividade respiratória das mitocôndrias isoladas dos epicótilos das plântulas de Pachyrhizus tuberosus contendo como meio de reação, sacarose 0.3M, KCl 20mM, HEPES 2mM e BSA 0.1%. mit.=mitocôndria, succ.=succinato, glut.=glutamato, mal.=malato e C.R.=controle respiratório,

—— succ. 2mM e ADP 100 μ M

—○— mal. 1mM, glut. 20mM e ADP 100 μ M

--- mal. 1mM, glut. 20mM, FCCP 1 μ M e EGTA 1mM

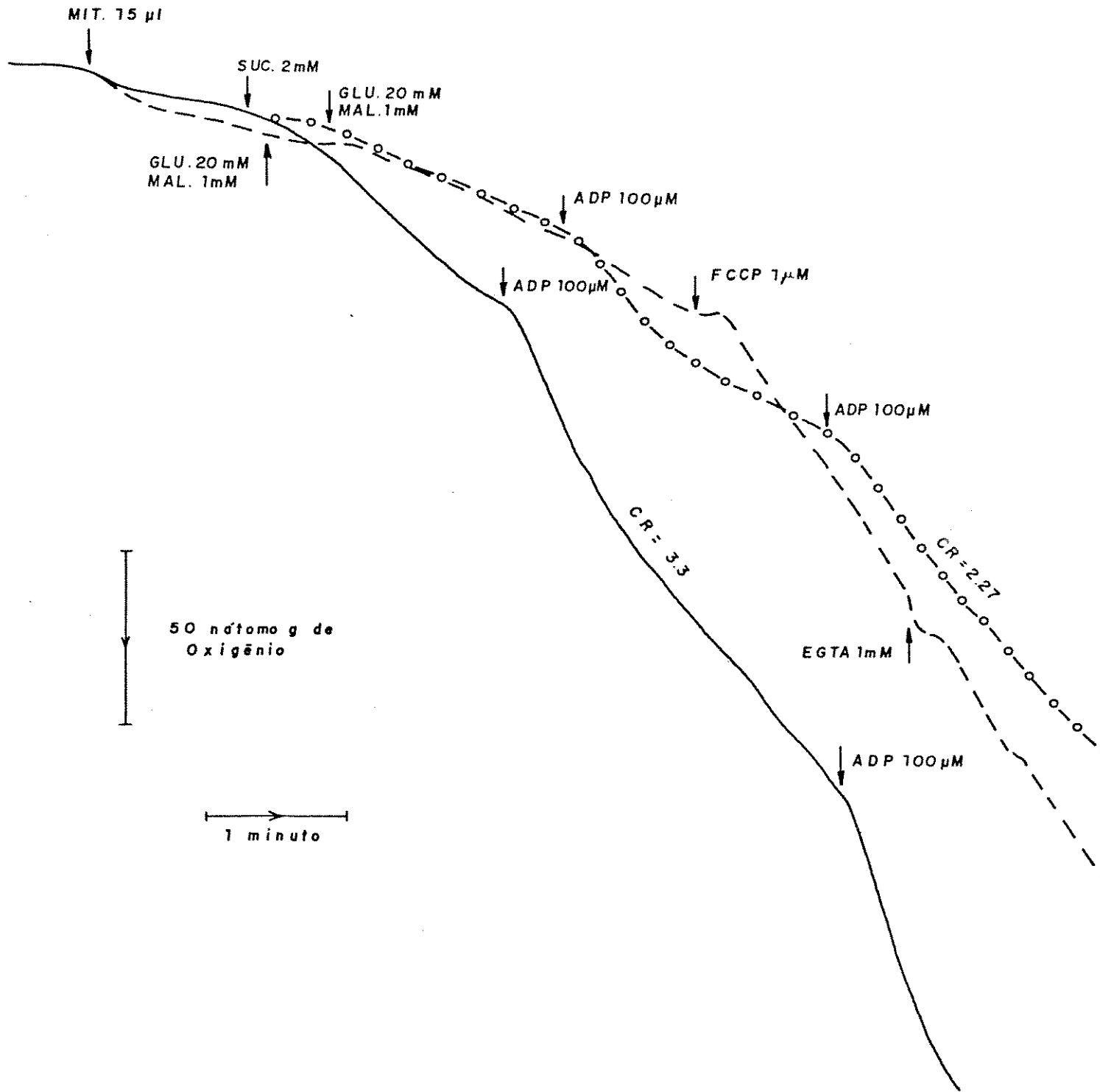
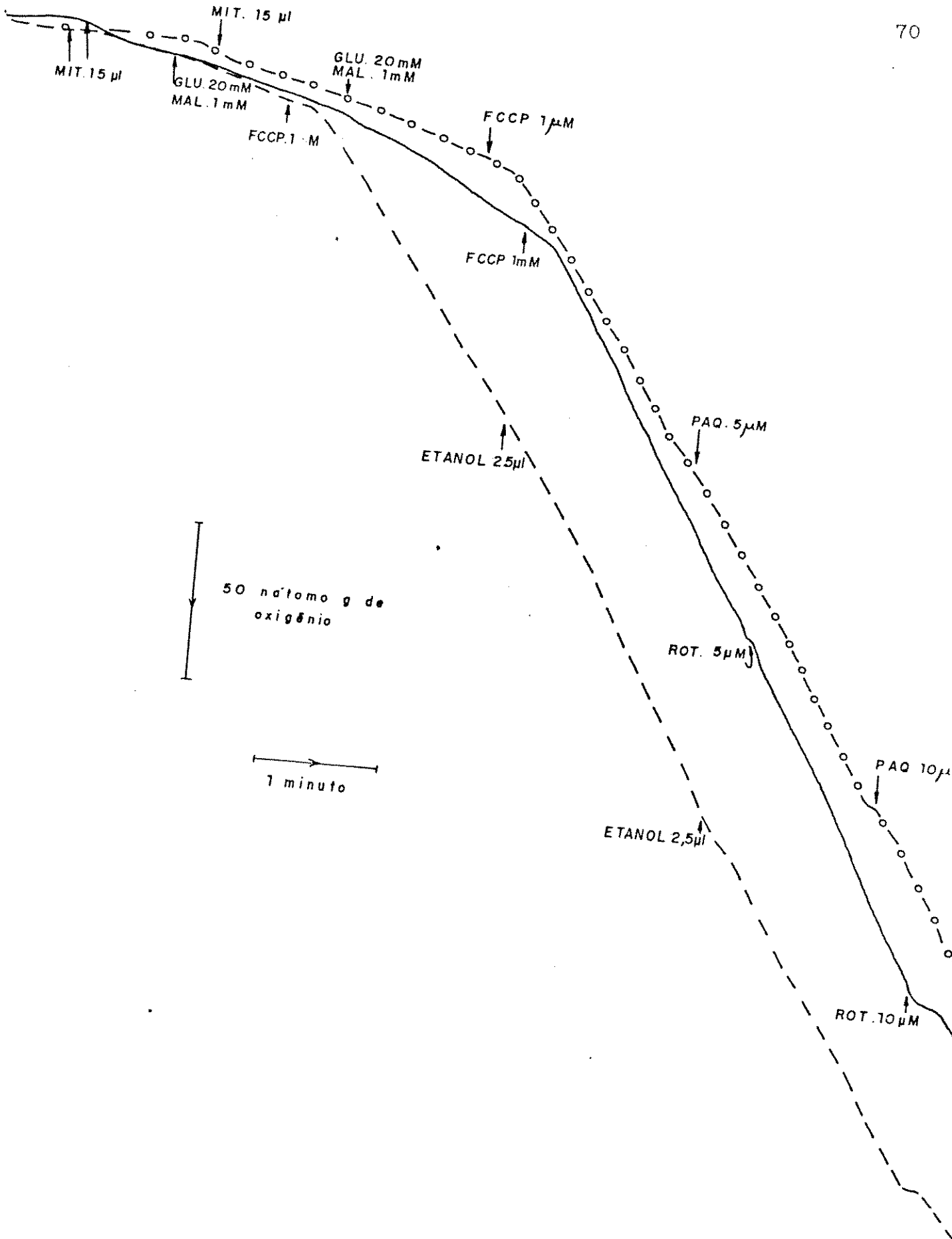


Figura 3.26 Efeito de rotenona e pachyrhizina na atividade respiratória, das mitocôndrias isoladas dos epicótilos das plântulas de Pachyrhizus tuberosus contendo como meio de reação sacarose 0.3M, KCl 20mM, HEPES 2mM e BSA 0.1%. mit.=mitocôndria, glu.=glutamato, mal.=malato, rot. rotenona, paq.=pachyrhizina.

- mal.1mM, glut. 20mM com FCCP 1 μ M e rot.5 μ M
- - - mal. 1mM, glut. 20mM, FCCP 1 μ M e etanol 2.5 μ L
- mal. 1mM, glut. 20mM, FCCP 1 μ M e pac. 5 μ M.



rotenona e a pachyrhizina.

Na Tabela 3.4 são apresentados os dados transformados em nmoles de oxigênio por minuto em um miligrama de proteína de plântulas estioladas de *P. tuberosus*. Observa-se que o FCCP aumenta o consumo de oxigênio em relação ao consumo dado pelo succinato e pelo malato mais glutamato, nas quatro aplicações (I, II, III e IV) do experimento. Os resultados indicam, que praticamente não houve uma diminuição no consumo de oxigênio tanto na adição de rotenona quanto na de pachyrhizina.

RAVANEL *et al.* (1982), observaram que em mitocôndrias de plântulas estioladas de *Phaseolus aureus*, kaempferol inibiu a oxidação do NADH, succinato e o fluxo de elétrons após o sítio da flavoproteína. RAVANEL *et al.* (1984) compararam o efeito de vários rotenóides extraídos das raízes de *Derris* (deguilina, eliptona, 12-hidroxirotenona e rotenona 2-ácido enólico) nas atividades mitocondriais, utilizando tubérculos de *Solanum tuberosum* e plântulas estioladas de *Phaseolus aureus*. Os resultados mostraram que não só a rotenona, mas o complexo de rotenóides, foi ativo na inibição do complexo I da cadeia respiratória na mitocôndria. A porcentagem de inibição em relação ao consumo de oxigênio é diferente para cada um desses rotenóides, sendo a deguilina a mais ativa e a rotenona 2-ácido enólico a menos efetiva.

Muitos trabalhos têm sido feitos, visando elucidar o papel dos flavonóides e os isoflavonóides nos mecanismos respiratórios e possíveis vias alternativas de resistência a estes compostos (PALMER, 1976; MARX & BRINKAMANN, 1978; JOHNSON-FLANAGAM & SPEN-

TABELA 3.4. Atividade respiratória, medida em nmoles de oxigênio por minuto por miligrama de proteína, utilizando mitocôndrias isoladas de plântulas estioladas de *P. tuberosus*.

substratos		adições		consumo de oxigênio (nmoles.min ⁻¹ .mg ⁻¹ de proteína)
I-	succinato 2mM			48.6
II-	glutamato 20mM			
	+ malato 1mM			31.3
		FCCP	1µM	93.9
		rotenona	5µM	86.9
		rotenona	10µM	76.5
		rotenona	10µM	62.6
III-	glutamato 20mM			
	+ malato 1mM			20.8
		FCCP	1µM	83.4
		pachyrhizina	5µM	93.9
		pachyrhizina	10µM	83.4
		pachyrhizina	10µM	80.0
IV-	glutamato 20mM			
	+ malato 1mM			30.5
		FCCP	1µM	86.4
		etanol	2.5µl	93.3
		etanol	2.5µl	86.9
		etanol	2.5µl	62.6

CER, 1981; RAVANEL *et al.* 1982; RAVANEL *et al.* 1984 e DOUCE & NEUBURGER, 1989). Tem-se verificado que há diferenças entre mitocôndrias vegetais e animais (CUNNINGHAM, 1964; PALMER & COLEMAN, 1974; DOUCE, 1985 e DOUCE & NEUBURGER, 1989). Estas diferenças estão na presença de desidrogenases específicas no sistema de transporte de elétrons, no tamanho da organela e complexidade de seu DNA (DOUCE *et al.* 1972 e DOUCE, 1985).

A cadeia respiratória nas células animais e vegetais consiste de quatro complexos proteicos, complexo I, complexo II, complexo III, usualmente chamado de citocromo b-c, e complexo IV, citocromo oxidase. Existem duas entradas principais do fluxo de elétrons na cadeia respiratória, uma no complexo I, que recebe os elétrons e prótons da coenzima NADH, proveniente da oxidação de intermediários do ciclo de Krebs, e a outra através do complexo II, onde se localiza a succinato-desidrogenase e coenzima FAD. Os elétrons são transferidos para as moléculas de ubiquinona e depois para o complexo III, onde irão para o citocromo c e deste para o complexo IV. O complexo IV constitui a oxidase terminal, encarregada de transferir os elétrons para o oxigênio, formando a água (DOUCE, 1985 e DOUCE & NEUBURGER, 1989).

A rotenona é frequentemente utilizada em experimentos de laboratório, devido as suas propriedades inibitórias no complexo I, na cadeia transportadora de elétrons em mitocôndrias animais e vegetais (IKUMA & BONNER, 1967). Nas células vegetais, observa-se a existência de uma via alternativa, na cadeia transportadora de elétrons, que é insensível ao cianeto e antimicina (LATIES, 1982

e DOUCE & NEUBURGER, 1989). Observa-se também a insensibilidade da NADH-desidrogenase interna na mitocôndria pela rotenona (PALMER, 1976 e MOLLER & LIN, 1986).

É geralmente assumido que a via de oxidação do NADH insensível à rotenona é catalisada por uma NADH-desidrogenase diferente, dentro da membrana interna da mitocôndria (MOLLER & LIN, 1986). Esta enzima possui outras características e afinidade muito mais baixa à molécula de rotenona do que à enzima do NADH da via sensível à rotenona do complexo I (MOLLER & PALMER, 1982). Mesmo aumentando o nível da NADH-desidrogenase, não ocorre um aumento no consumo de oxigênio na presença de rotenona (PALMER, 1982; DOUCE, 1985; DAY *et al.* 1989 e DOUCE & NEUBURGER, 1989). A oxidação do NADH endógeno em mitocôndrias vegetais parece ser muito mais complexa do que em mitocôndrias animais. Esta complexidade se deve ao fato de que alguns inibidores, tais como rotenona, inibem a oxidação do NADH endógeno em mitocôndrias animais, porém causam algumas vezes uma leve inibição no sistema respiratório dos vegetais (IKUMA & BONNER, 1967 e PALMER, 1976).

Nos experimentos utilizando mitocôndrias de plântulas estioladas de Pachyrhizus tuberosus, verificou-se que rotenona e pachyrhizina nas concentrações de 5 μ M, 15 μ M e 25 μ M, parecem não inibir o transporte de elétrons na cadeia respiratória nesta planta. Estes resultados indicam que estas substâncias, nestas concentrações, parecem não interferir no processo respiratório nas mitocôndrias de P. tuberosus.

O significado fisiológico da inibição ou não das enzimas que oxidam o NADH (resistência da NADH-desidrogenase a rotenona) na cadeia respiratória permanece ainda obscuro (DOUCE, 1985; e DOUCE & NEUBURGER, 1989). Recentes estudos com mitocôndria purificada de soja mostram variações na inibição com cianeto e rotenona em diferentes partes da planta (DAY *et al.* 1986). Nos cotilédones de soja com sete dias de idade, a rotenona inibiu em 50% a oxidação do malato e piruvato adicionados ao meio, e nas mitocôndrias dos nódulos, inibiu em 80% (BRYCE *et al.* 1990). A influência da rotenona tem particular importância nos tecidos com alta capacidade para atividade da via alternativa oxidase e parece que depende das condições de crescimento e da idade da planta (AZCON-BIETO *et al.* 1989 e BRYCE *et al.* 1990). Em geral, as condições que favorecem a alta atividade da via alternativa oxidase são também as que favorecem a via do fluxo de elétrons que é insensível à rotenona (DRY *et al.* 1989 e BRYCE, *et al.* 1990).

A maneira como funciona o mecanismo da via insensível à rotenona é muito importante para um melhor conhecimento e entendimento do papel fisiológico da NADH-desidrogenase. Entretanto, nenhuma informação é disponível até o momento, em relação à estrutura e às propriedades termodinâmicas da enzima NADH-desidrogenase insensível à rotenona (DOUCE & NEUBURGER, 1989).

Fica evidente a necessidade de estudos mais detalhados a respeito do efeito da rotenona e pachyrhizina no consumo de oxigênio em *P. tuberosus*. Provavelmente, estes isoflavonóides acumulados em determinados órgãos da planta, estão isolados anatômica

ou fisiologicamente do citoplasma, sendo ativos quando necessários. RAVANEL *et al.* (1984), sugerem que os rotenóides presentes em alta concentração nas raízes de Derris estão na forma de agliconas livres, tendo um efeito ecofisiológico, prevenindo assim a predação ou o parasitismo de animais, principalmente invertebrados, nas sua raízes.

De acordo com HARBORNE (1988), estas substâncias tóxicas tem alguma importância no sistema natural ecológico. Contudo, a função dessas substâncias não é ainda totalmente esclarecida. O fato, é que muitas plantas superiores vivem em relação simbiótica com espécies inferiores, sugerindo em último caso, proteção ao ataque de animais predadores, fungos ou bactérias, no tecido que contém algum tipo de substância letal. Contudo, a função fisiológica dessas substâncias não está ainda totalmente esclarecida.

IV - CONCLUSOES.

No presente trabalho com *P. tuberosus*, foi possível identificar os isoflavonóides, rotenona e pachyrhizina, através de dosagens por cromatografia líquida de fase reversa. Estabeleceu-se, então, o método para comparar, rotenona e pachyrhizina, nas diferentes partes desta planta.

Observou-se que os cotilédones possuem maior quantidade desses isoflavonóides, principalmente pachyrhizina, do que os eixos embrionários, até 120 horas de embebição em luz e escuro constante. Foi verificado que não há uma relação entre a quantidade dessas substâncias, com o aumento do peso de matéria seca. É provável que nos embriões e cotilédones de *P. tuberosus* não ocorra síntese de rotenona e pachyrhizina durante o período de embebição analisado. Mesmo ferverdas, as sementes de *P. tuberosus* apresentam rotenona e pachyrhizina. O fato é que, somente as sementes de vagens imaturas devem ser utilizadas na alimentação, pois rotenona e pachyrhizina não foram detectadas nesses estádios analisados.

Rotenona e pachyrhizina foram detectadas em folhas primárias (com 10, 20 e 30 dias de idade) de *P. tuberosus*. Estas

substâncias se apresentam em maior quantidade na folha do que nas sementes em desenvolvimento.

De acordo com os resultados, observou-se que rotenona e pachyrhizina não foram detectadas no exsudato do caule, nem no pedúnculo da inflorescência desta espécie. A inflorescência de *P. tuberosus* não contém nenhum desses isoflavonóides estudados. Sendo assim, é possível que ocorra síntese dessas substâncias, rotenona e pachyrhizina, apenas nos diferentes órgãos da planta em desenvolvimento, como sementes, folhas e raízes.

Rotenona e pachyrhizina foram observadas nas raízes de plântulas com 28 dias, mas após a tuberização, estas substâncias, são encontradas em quantidades pequenas. Desta forma, as raízes tuberosas (sem casca e sem o tecido da região do colo) podem ser utilizadas na alimentação.

Através dos resultados apresentados neste trabalho, demonstrou-se que rotenona e pachyrhizina não tiveram efeito significativo nas porcentagens finais de germinação em luz e escuro. Estas substâncias também não afetaram o desenvolvimento do eixo embrionário isolado dos cotilédones.

Foi demonstrado que rotenona e pachyrhizina não tiveram efeito no consumo de oxigênio em mitocôncrias isoladas de *P. tuberosus*, confirmando que estas substâncias não interferem no desenvolvimento desta espécie.

Portanto, neste trabalho, o papel da rotenona e pachyrhizina, durante o desenvolvimento de *P. tuberosus* não ficou esclarecido. Mas provavelmente, estes compostos que fazem parte do meta-

bolismo secundário, devem ter uma função ecofisiológica de proteção, garantindo assim a sobrevivência da espécie.

V - RESUMO.

Pachyrhizus tuberosus é uma espécie que possui um potencial alimentar expressivo nas raízes tuberosas. É nativa da região Amazônica, onde é cultivada comercialmente. Suas sementes são ricas em proteínas e lipídeos, porém são tóxicas ao consumo dos animais, pois apresentam um alto nível de isoflavonóides, rotenona e pachyrhizina. Entretanto, com exceção das sementes, nenhum trabalho foi desenvolvido para verificar a presença desses componentes nos vários órgãos da planta.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi determinar, através das extrações e dosagens, a quantidade de rotenona e pachyrhizina, na fase de crescimento inicial e nos vários órgãos da planta. Além disso, verificou-se também o efeito dessas substâncias na atividade respiratória em mitocôndrias isoladas desta espécie.

Neste trabalho foi possível estabelecer o método por cromatografia líquida de fase reversa para determinar e identificar a rotenona e pachyrhizina de P. tuberosus. A partir da fração de rotenóides extraídos das sementes de P. tuberosus, foi possível identificar e determinar a rotenona e pachyrhizina no mesmo

cromatograma. Observou-se que a rotenona elue em 13 minutos e a pachyrhizina em 11 minutos aproximadamente, utilizando ácido acético 0.5% e metanol 70%, numa velocidade de fluxo de 1ml por minuto.

Após várias análises feitas por HPLC, observou-se que as sementes secas possuem cerca de 0.59 μ g de rotenona e 20.7 μ g de pachyrhizina por miligrama de matéria seca. Durante o período de embebição em luz e escuro, verificou-se que rotenona e pachyrhizina estão em maior quantidade nos cotilédones do que nos eixos embrionários. Parece não ocorrer síntese dessas substâncias nos embriões e cotilédones, durante a embebição dessas sementes, pois, de acordo com os resultados, não houve variações significativas na quantidade dessas substâncias. Não existe uma relação entre o aumento do peso de matéria seca, com a quantidade de rotenona e pachyrhizina encontrada durante a embebição das sementes. É proposto que os níveis dessas substâncias, não interfiram no desenvolvimento das plântulas desta espécie. Rotenona e pachyrhizina foram encontradas também em sementes fervidas, com alta temperatura e pressão.

Neste trabalho, foi possível estabelecer os níveis de rotenona e pachyrhizina nas folhas de *P. tuberosus*, utilizando a cromatografia líquida de fase reversa. Nas folhas primárias analisadas, observou-se um aumento na quantidade de pachyrhizina e principalmente de rotenona, concomitante com o aumento de matéria seca. Essas substâncias se apresentam em maior quantidade nas folhas primárias do que nas sementes em desenvolvimento.

Não foram detectadas, rotenona e pachyrhizina no exsudato do caule e no pedúnculo da inflorescência nesta espécie. Além disso, nenhum desses isoflavonóides foi encontrado na inflorescência de *P. tuberosus*. É sugerido que rotenona e pachyrhizina não sejam transportadas no caule, indicando que possam ser sintetizadas independentemente nos diferentes órgãos (sementes, folhas e raízes).

Nos frutos, rotenona e pachyrhizina não foram determinadas nos extratos das vagens e sementes imaturas. Estes isoflavonóides só foram detectados nas sementes das vagens com 15.8cm, 18.4cm e 20.9cm de comprimento.

Rotenona e pachyrhizina foram observadas nas raízes de plântulas com 28 dias de idade crescidas no escuro. Nas raízes tuberosas de plantas com 10 meses de idade, verificou-se uma pequena quantidade de rotenona concentrada principalmente na região do colo. Porém, pachyrhizina não foi encontrada na raiz tuberosa de *P. tuberosus*. Sendo assim é possível utilizar na alimentação somente a raiz tuberosa sem a casca e sem o tecido da região do colo da raiz.

Rotenona nas concentrações de $10^{-2}M$, $10^{-3}M$ e $10^{-4}M$ e pachyrhizina a $10^{-4}M$ não afetaram significativamente as porcentagens finais de germinação de sementes mantidas na luz e escuro contínuos.

Foi observado, também, que rotenona e pachyrhizina, nas concentrações utilizadas neste trabalho, não afetaram o desenvolvimento em peso de matéria fresca e comprimento dos eixos embrio-

nários isolados dos cotilédones, mantidos na luz e escuro contínuos. Portanto, sugere-se que estes isoflavonóides não interferem no desenvolvimento inicial da planta de *P. tuberosus*.

Nos experimentos com mitocôndrias isoladas de *P. tuberosus*, os resultados mostram que rotenona e pachyrhizina nas concentrações utilizadas, adicionadas ao meio de reação, não inibem o consumo de oxigênio em plântulas estioladas do Jacatupé. Sendo assim, supõe-se que estas substâncias, não interferem no transporte eletrônico da cadeia respiratória na mitocôndria desta espécie.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- ABIDI, S.L. 1984. High-efficiency resolution of isomeric rotenona compounds by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr., 317:383-401.
- ABIDI, S.L. 1987. Chiral-phase high-performance liquid chromatography of rotenoid racemates. J. Chromatogr., 404:133-143.
- AZCON-BIETO, J., SALOM, C.L., MACKIE, N.D. & DAY, D.A. 1989. The regulation of mitochondrial activity during greenig and senescence of soybean cotyledoms. Plant Physiol. Biochem. 27(6):82-6.
- ALVARENGA, A.A. 1987. Estudo de alguns aspectos do desenvolvimento no feijão jacatupé - Pachyrrhizus tuberosus (Lam.) Spreng. Tese de Doutorado apresentada na Universidade Estadual de Campinas.
- ALVARENGA, A.A. & VÁLIO, I.F.M., 1989. Influence of temperature and photoperiod on flowering and tuberous root formation of

- Pachyrrhizus tuberosus. Ann. Bot. 64: 411-414.
- ARRON, G.P. & EDWARDS, G.E. 1980. Oxidation of reduced NADP by potato mitochondria. Plant. Physiol. 65: 591-594.
- BERLYN, G.P. 1972. Seed germination and Morphogenesis. In: Seed Biology. (ed., T.T. Kozlowski). vol. 1. Academic Press.
- BERRIE, A.M.M. 1968. The interaction of coumarin and temperature in the germination of lettuce seeds. Physiol. Plant. 21:960-965.
- BEWLEY, J.D. & BLACK, M. 1983. Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination: viability, dormancy and enviromental control. Berlin, Springer-Verlag. v.2, 375p.
- BIRCH, N., CROMBIE, L. & CROMBIE W.MARY. 1985. Rotenoids of Lonchocarpus salvadorensis: their effectiveness in protecting seeds against bruchid predation. Phytochemistry 24(12):2881-2883.
- BORTOLATO, C.A., MAGALHAES, E.G. & VALIO, I.F.M. 1985. Rotenóides de Pachyrrhizus tuberosus In: Química de Produtos Materiais, Resumos da 37a. Reunião Anual da SBPC. Belo Horizonte, pp.50.
- BRADFORD, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of protein-dye

- binding. Anal. Biochem. 72:248-254.
- BRADBEER, J.M., 1988. Seed Dormancy and Germination. Chapman and Hall, New York. 142p.
- BROWN, R. 1972. Germination. In Plant Physiology: (ed. F.C. Steward.) Acadec. Press. London.
- BRYCE, J.H., AZCON-BIETO, J., WISKICH, J.T. & DAY, A.D. 1990. Adenylate control of respiration in plants: the contribution of rotenone-insensitive electron transport to ADP-limited oxygen consumption by soybean mitochondria. Physiol. Plant. 78:105-111.
- BUSHWAY, R.J. 1983a. Reverse phase radial compression high performance liquid chromatographic determination of rotenona in formulations. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 66(3):793-95.
- BUSHWAY, R.J. 1983b. High performance liquid chromatographic analysis of rotenone formulations: collaborative study. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 66(3):796-800.
- BUSHWAY, R.J., 1984. High Performance Liquid Chromatographic analysis of rotenona and rotenonona in water by direct injection. J. Chromatogr. 303: 263-66.

- BUSHWAY, R.J., JOHNSON, H. & SCOTT, D.W., 1985. Simultaneous Liquid Chromatographic Determination of Rotenone and Pyrethrins in Formulations. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 68 (3):580-83.
- CARNIERI, E.G.S. 1986. Transporte de Ca^{2+} por mitocôndrias vegetais. Tese de Doutorado apresentada no Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná.
- CHING, T.M. 1972. Metabolism of germination seeds. In: Seed Biology. vol.II. Acad. Press. London.
- CUNNINGHAM, W.P. 1964. Oxidation of externally added NADH by isolated corn root mitochondria. Plant Physiol. 39:699-703.
- DAY, D.A., PRICE, G.D. & GRESSHOFF, P.M. 1986. Isolation and oxidative properties of mitochondria and bacteroids from soybean root nodules. Protoplasma. 134:121-29.
- DRY, I.B., MOORE, A.L., DAY, D.A. & WISKICH, J.T. 1989. Regulation of alternative pathway activity in plant mitochondria. Non-linear relationship between electron flux and the redox poise of the quinone pool. Arch. Biochem. Biophys. 273:148-157.
- DIETRICH, S.M.C. 1979. Inibidores de crescimento. In: Fisiologia Vegetal. (ed. M.G. Ferri). vol.1. 193-212.

- DOUCE, R., CHRISTENSEN, E.L., & BONNER, W.D. 1972. Preparation of intact plant mitochondria. Biochim. Biophys. Acta, 275:148-156.
- DOUCE, R., 1985. Specific properties of higher plant mitochondria In:Encyclopedia of Plant Physiology. (eds. Douce, R. e Day, D.A.) vol.18. Berlin. Spring-Verlog.
- DOUCE, R. & NEUBURGER, M. 1989. The Uniqueness of Plant Mitochondria. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 40: 371-414.
- FUKAMI, J., YAMAMOTO, I. & CASIDA J. 1967. Metabolism of rotenone in vitro by tissue homogenates from mammals and insects. Science 157:713-716.
- FUKAMI, H. & NAKAJIMA, M., 1971. In: Naturally Occurring Inseticides (eds. Jacobson e D. G. Crosby.) New York. pp. 71-97.
- GRUM, M. 1990. Breeding Pachyrhizus Rich. ex.D.: A review of goals and methods. A review of PhD Thesis. The Royal Veterinary and Agricultural University. Copenhagen, Denmark. 75p.

- HANSBERRY, R. CLAUSEN, R.T. & NORTON, L.B. 1947. Variations in the chemical composition of the yam bean, Pachyrrhizus. J. Agric. Res. 74(2):55-64.
- HARBORNE, J.B. 1967. Comparative Biochemistry of the Flavonoids. Academic Press, London. p.280-303.
- HARBORNE, J.B. 1971. Distribution of flavonoids in the Leguminosae. In: Chemotaxonomy of the Leguminosae. (eds. J.B. Harborne, P. Bouter, B.L. Turner). Acad. Press. London, pp.31-71
- HARBORNE, J.B. 1988. Introduction to Ecological Biochemistry. Academic Press. London. 350p.
- HOAGLAND, D.R. & ARNON, D.I. 1938. The water culture method for growing plants without soil. Cir. Univ. Calif. Agr. Exp. Sta. 347:1-39.
- INENAMI, T.D. 1984. Estudo do inibidor de germinação em sementes de Myroxylonl peruiferum L. (Cabriúva-leguminosae). Tese de Mestrado apresentada na Universidade Estadual de Campinas. 89p.
- INGLE, J., BEEVERS, L. & HAELGMAN, R.H. 1964. Metabolic changes associated with the germination of corn. Changes in weight metabolites and their distribution in embryo axis, scutellum and endosperm. Plant Physiol. 39:735-40.

- IKUMA, H. & BONNER, Jr.W.D. 1967. Properties of Higher Plant Mitochondria. III. Effects of Respiratory Inhibitors. Plant Physiol. 42:1535-1544.
- JOHNSON-FLANAGAN, A. M. & SPENCER, M.S. 1981. The effect of rotenone on respiration in pea cotyledon mitochondria. Plant Physiol. 68:1211-1217.
- KIES, M.W. & MURPHY, J.B. 1960. Spectrophotometric determination of protein in dilute solutions. Biochem. Biophys. Acta, 45:380-384.
- KRISHNAMURTI, M., SABHY, Y.R. & SESHADRI, T.R. 1970. Chemical study of Indian Yam Beans (Pachyrrhizus erosus). Isolation of two new rotenoids: 12a-hydroxydolineone and hydroxypachyrrhizone. Tetrahedron 26:3023-027.
- LATIES, G.G., 1982. The Cyanide- resitent, alternative path in higher plant respiration. Ann. Rev. Plant. Physiol. 33:519-55.
- LEHNINGER, A.L. 1976. Bioquímica. trad. 2^a. ed. americana. sup. José Magalhães, vol 2. ed.Edgard Blucher. São Paulo.
- LINDAHL, P.E. & OBERG K.E. 1961. The effect of rotenone on respiration and its point of attack. Exptl. Cell. Res. 23:228-37.

- MAGALHAES, A.F., SALES, B.H.L.N., MAGALHAES, E.G. & VALIO, I.F.M. 1987. Rotenóides de Pachyrrhizus tuberosus. Resumo do 7. Encontro Regional de Química da Sociedade Brasileira de Química. p.10.
- MAGALHAES, A. F., MAGALHAES, E.G., VALIO, I.F.M. & SALES, B.H.L.N. 1988. Ocorrência de neotenona em Pachyrrhizus tuberosus. Resumo da 40. Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência. 552-553.
- MARTINS, I.S. & VERCESI, A.E. 1985. Some characteristics of Ca^{2+} transport in plant mitochondria. Biochem. and Biophys. Res. Com. 123(3):943-48.
- MARX, R. e BRINKMANN, K. 1978. Characteristics of Rotenone in sensitive oxidation of matrix-NADH by broad bean mitochondria. Plant. 142: 83-90.
- MAYER, A.M. & POLJAKOFF-MAYBER, A. 1982. The Germination of Seeds. Pergamon Press. Ltda. Oxford. 3. ed. 211p.
- McCLURE, J.W. 1975. Physiology and functions of flavonoids. In: Harborne, J.B., Mabry, T.J. & Mabry, H. The Flavonoids. Chapman and Hall, London. p.971-1055.

- MENICHINI, F., MONACHE DELLE, F. & MARINI-BETTOLO, E. 1982. Flavonoids and rotenoids from Tephrosiaceae and related tribes of Leguminosae Plant. Med. 45:243-44.
- MEIJER, T. M. 1936. Aproximate colorimetric determination of Derris extract. Rec. Des. Trav. Chim. Pays. Bas. 55:954-958.
- METIVIER, J. & PAULILO, M.T. 1980. The utilization of cotyledonary reserves in Phaseolus vulgaris L. cv. carioca. II. The effects of 6-benziladenine and gibberellic acid upon embryonated and detached cotyledone. J. Exp. Bot. 31(124):1271-282.
- MOLLER, I.M. & PALMER, J.M. 1982. Direct evidence for presence of a rotenone-resistant NADH dehydrogenase on the inner surface of the inner membrane of plant mitochondria. Physiol. Plant. 54:267-74.
- MOLLER, I.M. & LIN, W. 1986. Membrane-bound NADPH dehydrogenases in higher plant cell. Ann. Rev. Plant. Physiol. 37:309-34.
- NELSON, C.D. & GORHAM, P.R. 1957. Uptake and translocation of C¹⁴ labeled sugars applied to primary leaves of soybean seedlings. Can. J. Bot. 35:339.
- NODA, H., PAIVA, W.O. & BUENO C. R. 1984. Hortaliças da Amazônia. Ciência Hoje 3(13):32-37.

- NORTON, L.B. 1943. Rotenone in the Yam Bean (Pachyrrhizus erosus). J. Amer. Chem. Soc. 61: 2259-260.
- OBBERG, K.E. 1961. The site of the action of rotenone in the respiration chain. Exptl. Cell. Res. 24:163-64.
- PALMER, J.M. & COLEMAN, J.O.D. 1974. Multiple pathways of NADH oxidation in the mitochondrion. Horizons. Biochem. Biophys. 1:220-260.
- PALMER, J.M. 1976. The organization and regulation of electron in plant mitochondria. Ann. Rev. Plant. Physiol. 27:133-157.
- PAULILO, M.T.S. 1980. Efeito do ácido giberélico e 6-benziladenina na utilização das reservas da semente de Phaseolus vulgaris L. cv. carioca. Tese de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas. Campinas
- RAVANEL, P., TISSUT, M. & DOUCE, R. 1982. Effects of de kaempferol on the oxidative properties of intact plant mitochondria. Plant Physiol. 69: 375-78.
- RAVANEL, P., TISSUT, M. e DOUCE, M. 1984. Effects of rotenoids on isolated plant mitochondria. Plant. Physiol. 74: 414-20.

- SAWAZAKI, H. E., 1986. Efeito de fonte externa de nitrogênio no transporte de compostos nitrogenados em plantas de soja Glicine max (L.) Merrill cultivar Santa Rosa. Tese de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas. Campinas. 124p.
- SCHOONHOVEN, L.M. 1972. Secondary plant substances and insects. In: Runeckles, V.C. & Tso, T.C. Recent Advances in Phytochemistry. vol.5. Academic Press. New York. p.197-224.
- SCHROEDER, C. A. 1968. The Jicania, a root crop from Mexico. Amer. Soc. Hort. Sci. 11:65-71.
- SESHADRI, T.R. 1971. Isolation of flavonoid compounds from plant materials. In: Chemotaxonomy of the Leguminosae. (eds. Harborne, J.B., Boulter, D. & Turner, B.L.). Academic Press. London. Cap.2.
- SIMON, E.W. & MEANY, A. 1965. Utilization of reserves in germination Phaseolus seed. Plant Physiol. 40:1136-139.
- SNEDECOR, G.W. & COCHRAN, W.G. 1967. Statistical methods. Iowa State College Press., Ames, Iowa, USA. 534p.
- SORENSEN, M. 1988. A taxonomic revision of the genus Pachyrhizus (Fabaceae-Phaseoleae). Nord. J. Bot. 8:167-92.

- SORENSEN, M. 1990. Observations on distribution, ecology and cultivation of the tuber-bearing legume genus Pachyrhizus Rich. ex Dc. Wageningen Agricultural University Papers. 90(3):1-38.
- VÁLIO, I.F.M. 1973. Effect of endogenous coumarin on the germination of seeds of Coumarouna odorata Aublet. J. Exp. Bot. 24(79):442-49.
- VAN STANDEN, J. 1973. Changes in endogenous cytokinins of lettuce seed during germination. Physiol. Plant. 28:222-27.
- WISKISH, J.T. & DAY, D.A. 1982. Malate oxidation of respiratory inhibition on NADH, succinate and malate oxidation in corn mitochondria. Plant Physiol. 70:959-64.
- WONG, E. 1975. The isoflavonoids. In: Harborne J.B.; Mabry, T.J. & Mabry, H. The Flavonoids. Academic Press. London, pp. 743-800.
- ZINSOU, C. VENTHOU-DUMAINE, A. & VANSUYT, G. 1987a. Croissance et développement du Pachyrhizus erosus (Urban) I. Effets de l'acide gibbérellique et du chlorure de chlorocholine en jours courts. Agronomie 7(9):677-83.
- ZINSOU, C. VANSUYT G. & VENTHOU-DUMAINE, A. 1987b. Croissance et développement du Pachyrhizus erosus (Urban) II. Effets de l'acide gibbérellique et du chlorure de chlorocholine sur la

composition glucidique du tubercule. Agronomie 7(10):821-25.

C. VAN DER WOUDE, A. & VAN DER WOUDE, J.

Research on the carbohydrate composition of tubers

of potatoes

in the Netherlands

REPORT G. 1. 1964. Wageningen, A. 1964

Wageningen, Centre for Agricultural Publishing