

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA

PROPAGAÇÃO E DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Picrolemma sprucei* Hook. f.
(Simaroubaceae)

FRANCISCO CLEBER FELIX BARROS

MANAUS

2011

Ficha Catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Barros, Francisco Cleber Felix

B277p Propagação e diversidade genética de *Picrolemma sprucei* Hook.
f. (Simaroubaceae)/ Francisco Cleber Felix Barros. - Manaus:
UFAM, 2011.
63 f.; il.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) — Universidade Federal do
Amazonas, 2011.

Orientador: Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho

1. Caferana (Planta) - Germinação 2. Produção de mudas 3.
Plantas - Propagação 4. Plantas medicinais I. Astolfi Filho, Spartaco
(Orient.) II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

CDU 581.14/.143.3(043.2)

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA

FRANCISCO CLEBER FELIX BARROS

PROPAGAÇÃO E DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Picrolemma sprucei* Hook. f.
(Simaroubaceae)

Tese apresentada ao Programa Multi-institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, área de concentração de Biotecnologias para área agroflorestal.

Orientador: Dr. Spartaco Astolfi Filho

MANAUS

2011

FRANCISCO CLEBER FÉLIX BARROS

**PROPAGAÇÃO E DIVERSIDADE DA GENÉTICA DE *Picrolemma sprucei* Hook.f.
(Simaroubaceae)**

Tese apresentada ao Programa Multi-institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, área de concentração de Biotecnologias para área agroflorestal.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho, Presidente

Universidade Federal do Amazonas

Prof. Dr. José Ferreira da Silva, Membro

Universidade Federal do Amazonas

Profa. Dra. Rozana de Medeiros de Souza Galvão, Membro

Universidade Federal do Amazonas

Prof. Dr. Pedro de Queiroz Costa Neto, Membro

Universidade Federal do Amazonas

Dra. Suely Costa, Membro

Instituto Nacional de pesquisas da Amazônia

DEDICO ESSE TRABALHO

As minhas mulheres: a minha Mãe e ao meu Amor.

AGRADECIMENTO

**A todos que aqui contribuíram com esse trabalho e a música abaixo, que me inspirou
e fez vir para a Amazônia para lutar por essa causa:**

SAGA DA AMAZÔNIA

Era uma vez na AMAZÔNIA, a mais bonita floresta
Mata verde, céu azul, a mais imensa floresta
No fundo d'água as IARAS, caboclo lendas e mágoas
E os rios puxando as águas
PAPAGAIOS, PERIQUITOS, cuidavam das suas cores
Os peixes singrando os rios, Curumins cheios de amores
Sorria o JURUPARI, URAPURU, seu porvir
Era: FAUNA, FLORA, FRUTOS E FLORES
Toda mata tem caipora para a mata vigiar
Veio caipora de fora para a mata definhar
E trouxe DRAGÃO-DE-FERRO, prá comer muita madeira
E trouxe em estilo gigante, prá acabar com a capoeira.
Fizeram logo o projeto sem ninguém testemunhar
Prá o dragão cortar madeira e toda mata derrubar:
Se a floresta meu amigo tivesse pé prá andar
Eu garanto meu amigo, com o perigo não tinha ficado lá.
O que se corta em segundos gasta tempo prá vingar
E o fruto que dá no cacho prá gente se alimentar??
Depois tem passarinho, tem o ninho, tem o ar
ICARAPÉ, rio abaixo, tem riacho e esse rio que é um mar.
Mas o DRAGÃO continua a floresta devorar
E quem habita essa mata prá onde vai se mudar??
Corre ÍNDIO, SERINGUEIRO, PREGUIÇA, TAMANDUÁ
TARTARUGA, pé ligeiro, corre-corre TRIBO DOS KAMAIURA
No lugar que havia mata, hoje há perseguição
Grileiro mata posseiro só prá lhe roubar seu chão
Castanheiro, seringueiro já viraram até peão
Afora os que já morreram como ave-de-arribação
Zé da Nana tá de prova, naquele lugar tem cova
Gente enterrada no chão:
Pois mataram índio que matou grileiro que matou posseiro
Disse um castanheiro para um seringueiro que um estrangeiro
Roubou seu lugar
Foi então que um violeiro chegando na região
Ficou tão penalizado e escreveu essa canção
E talvez, desesperado com tanta devastação
Pegou a primeira estrada sem rumo, sem direção
Com os olhos cheios de água, sumiu levando essa mágoa
Dentro do seu coração.
Aqui termina essa história para gente de valor
Prá gente que tem memória muito crença muito amor

Prá defender o que ainda resta sem rodeio, sem aresta
ERA UMA VEZ UMA FLORESTA NA LINHA DO EQUADOR.

RESUMO

PROPAGAÇÃO E DIVERSIDADE DA ESPÉCIE *Picrolemma sprucei* Hook.f.

(Simaroubaceae)

Atualmente, há um grande interesse em plantas para extração de princípios ativos com atividade antimalárica, principalmente na Amazônia, onde a doença já se alastra há tempos, sem uma ação eficaz para sua erradicação. A Caferana (*Picrolemma sprucei* Hook. f.) é uma planta Simaroubaceae, conhecida como antimalárica por povos nativos da região Amazônica, sendo utilizada sem critérios como chá medicinal para combate à doença. A planta possui uma raiz pivotante e atinge em torno de 2 m de profundidade. No capítulo I, foi investigado o recrescimento da espécie em seu habitat, a fim de avaliar o incremento do material vegetal, num período de quatro anos, para obter informações sobre recrescimento do material selvagem e o melhor método de produção de mudas. A planta foi cortada no caule (corte rente à superfície do solo) em seu habitat natural. A população original apresentava 75% das plantas com altura média de 50 cm. Nos quatro anos seguintes, o recrescimento médio de 75% das plantas atingiu a altura de (28 a 30 cm). Concluiu-se que a planta necessita, conforme observações em campo, não menos que quatro anos para se recompor em recrescimento depois de cortada. Tendo um incremento de recrescimento lento e com grande variabilidade, devido a fatores desconhecidos. No capítulo II, utilizou-se a técnica agrônômica de estaquia a fim de avaliar a viabilidade na propagação da planta nativa para produção de mudas. Adotou-se experimento em delineamento inteiramente ao acaso em

esquema fatorial (4X4) com quatro tipos de estacas (lenhosa, semi-lenhosa, herbácea e semi-herbácea) e quatro tipos de substratos: (S₁) com areia (100%); (S₂) com 50% de areia + 50% de solo argiloso; (S₃), com solo argiloso (100%); e (S₄) com 30% de terra compostada + 30% de solo argiloso + 40% de areia). O melhor substrato para caferana foi o compostado S₄ (21,67%), e as melhores estacas foram: lenhosa (29,16%) e herbácea (20%). De um modo geral, as raízes só apareceram após um ano e meio de manutenção da muda, tornando difícil sua identificação, diminuindo o desenvolvimento da muda e inviabilizando a técnica de estaquia para produção das mudas nativas. No capítulo III, avaliou-se a germinação de plantas de caferana com sementes coletadas na UFAM/AM. O experimento foi delineado em blocos ao acaso, com quatro tipos de substratos: S1 (100% areia); S2 (50% areia + 50% solo argiloso); S3 (100% solo argiloso) e S4 (30% composto + 30% solo argiloso + 40% areia). Na casa de vegetação regou-se com aspersão automática a cada 10 min., com período de rega de 60s. A maior percentagem média de germinação foi com o substrato S4 (41,02%) seguido de S3 (31,92%) e S2 (30,29%) que não diferiram entre si. Obtendo o pior desempenho o substrato S1 (22,94%). A técnica de germinação em casa de vegetação para produção de mudas da espécie *Picrolemma sprucei*, apresentou um rendimento apenas mediano. Conclui-se que há dependência de umidade para germinação da espécie, provada pela composição dos melhores tratamentos S₄, S₃ e S₂, contendo partículas redutoras de argila e húmus, grande retentora de água, e, também verificada em seu habitat, próximas aos igarapés, se desenvolvem em maior quantidade. Recomenda-se testar outras técnicas de produção de mudas, em câmaras de BOD, onde poderá demonstrar melhores resultados do que a germinação em substratos de solo. Com relação ao experimento com marcador molecular AFLP, capítulo IV, obteve-se um índice de similaridade genética máxima em

torno de 29% para a população “P” (ZF2), 33% para a população “D” (Ducke) e o maior índice em torno de 87% para a população “C” (cultivada), mostrando definitivamente a baixa variabilidade genética em populações cultivadas, possivelmente devido ao endocruzamento. A análise por marcador genético foi realizada por sete diferentes combinações de iniciadores EcoRI-MseI, resultando num total de 443 bandas polimórficas. Esses dados foram utilizados para análise da divergência genética entre populações e dentro delas. Foram detectados baixos níveis de divergência genética entre populações. O máximo de similaridade genética foi de 88,8%, dentro de população “C”, o de 39% dentro da população “D” e semelhante dentro da “P”(39%), indicando uma menor variabilidade genética na população “C” que ficou sujeita a cruzamentos endogâmicos. O agrupamento das populações, a partir do dendrograma (Apêndice I) encontrado, sugere que populações com maior coeficiente de JACCARD, tenham maior similaridade e árvores próximas tendem a ser mais similar entre si.

Palavras chave: recrescimento; propagação; estaquia; germinação caferana; antimalária; *Picrolemma sprucei*, AFLP.

ABSTRACT

Diversity and Propagation studies of caferana sprouts *Picrolemma sprucei* Hook f. (Simarubaceae) in Amazonian habitat

Caferana *Picrolemma sprucei* Hook a plant from the Simarubaceae family with antimalarial effects well known by the Amazon region native populations is being used without any criteria by them as a medicinal tea in order to fight this disease. The plant has a taproot that could reach over 2mts depth. **On chapter one**, it has been researched the regrowing of the species in its own habitat, in order to evaluate the increment of vegetal material, in a given period of four years to attain technical information on cultivated stuff and a sprout production method. The selected part of plant was the stem in natural habitat, close-cut regrowing at ground-surface. The population had 75% of plants with average height of 50 cm. On following four years, after being cut to measure average height, 75 % of plants have reached maximum height between 28 to 30cm. As a main conclusion, it could be inferred that, according field observation the caferana plant needs at least the minimum of four years to recompose its growth after being cut. It has been observed a rather slow regrowth increment, because unknown factors. **On chapter two**, it has been used the agronomic stake technique aiming at to evaluate plant viability for sprout production. It was adopted a casual

design experiment absolutely at random in factorial scheme 4 x 4 with four types of stakes ligneous, semi-ligneous, herbaceous and semi-herbaceous and four types of soil; S1 with sand 100%, S2 with 50% sand plus 50% clay, S3 with clay 100%, and S4 with composite soil 30% plus 30% clay plus 40% sand. Best kind of soil for caferana has been S4 composite 21,67%, and best stakes were: ligneous 29,16% and herbaceous 20%. On a general mood, roots were only established after one and a half year of sprout maintenance, turning rather difficult its identification, diminishing sprout development, making non-feasible the stake-technique for sprout production. **On chapter three**, it has been evaluated caferana plants sprouting with seeds collected at UFAM-AM. The experiment was sketched in blocks at random, with four types of soils; S1 (100% sand); S2 (50% sand plus 50% clay); S3 (100% clay) S4 (30% composite plus 30% clay plus 40% sand), during four years. At the green-house caferana has been watered with automatic sprinkling every ten minutes at 60 second - irrigating period. The largest percentage sprouting average was with substratum S4 (41.02%) followed by S3 (31.92%) and S2 (30,29%) which do not differed between them. The worst performance has been for substratum S1 (22,94%). Germination techniques in green-house, for Picrolemma spruce Hook sprout production has had a rather medium yield. It has been concluded that there is a great dependence on moisture for this species germination, already proved by best treatments (S4, S3, S2), containing (clay and humus) moisture retaining particles, which was also verified in its habitat next to “Igarapes” (creeks), where they develop in larger quantities. It is highly recommended to test other sprout production techniques, as in B.O.D chambers where could prove better results than in soil substrata germination. **On chapter four**, it has been evaluated the analysis by genetic markers conducted by three different combinations of four EcoRI-Msel starters, resulting in

a total number of 443 polymorphic bands. These data has been used for the analysis of genetic divergence among populations. It was observed low-levels of genetic divergence among them. Genetic similarity at must has been of 88.8% inside “C” population, 39% inside “D” population, being similar inside “P” population, indicating, and lower genetic variability on “C” population, then influenced to endogamy crossing. Clustering populations has being displayed in the form of a dendrogram; inferring that, popula“--- with greater Jaccard coefficient tend to have more similarity, and trees next to each (tend to be more similar among them.

Key words = Regrowing, propagation, stalking, sprouting, caferana, antimalarial, Picrolemma spruce Hook, natural habitat and AFLP.

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vii
INTRODUÇÃO	1
1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA ESPÉCIE	3
1.1 A Família Simaroubaceae	4
1.2 Estudos químicos	5
1.4 uso popular	6
CAPÍTULO I: Avaliação do recrescimento da caferana (<i>Picrolemma sprucei</i>) em ambiente nativo	8
INTRODUÇÃO	8
MATERIAL E MÉTODOS	10
RESULTADOS E DISCUSSÃO	11
CONSIDERAÇÕES FINAIS	14
CAPÍTULO II: Método de produção de mudas por estaquia da espécie amazônica <i>Picrolemma sprucei</i>	15
INTRODUÇÃO:	15
MATERIAL E MÉTODOS:	17
RESULTADOS E DISCUSSÕES	19
CONCLUSÃO	24
CAPÍTULO III - Germinação de <i>Picrolemma sprucei</i> Hook f. em ambiente de casa de vegetação	25
INTRODUÇÃO	25
MATERIAL E MÉTODOS	26
RESULTADO E DISCUSSÕES	27
CONCLUSÃO	30
CAPÍTULO IV – Diversidade genética da caferana	31

INTRODUÇÃO.....	31
MATERIAL E MÉTODOS	33
RESULTADOS E DISCUSSÕES	38
CONCLUSÃO	40
REFERÊNCIAS:	41

SUMÁRIO DE TABELAS

Tabela 1. Avaliação da Altura Total da planta de caferana (<i>Picrolemma sprucei</i> , Hook. F.) nos quatro períodos de tempos (0, 1, 2 e 3) anos, na ZF2/INPA, Manaus, AM, 2005-2008.	12
Tabela 2. Rendimento da caferana (<i>Picrolemma sprucei</i> Hook F.) quando comparados os quatro diferentes tipos de substratos entre si, (experimento I), CPPN/INPA (2009).	19
Tabela 3. Comparação de pegamento (%) dos quatro diferentes tipos de estacas de caferana (<i>Picrolemma sprucei</i>) entre si, (experimento I), CPPN/INPA (2009).	20
Tabela 4. Desdobramento dos substratos dentro da Estaca 1(lenhosa), (experimento I), CPPN/INPA (2009).	20
Tabela 5. Desdobramento dos substratos dentro da Estaca 4 (herbácea), (experimento I), CPPN/INPA (2009).	21
Tabela 6. Pegamento (%) da Estaca 1 (lenhosa) em 4 diferentes tipos de substratos, (experimento II), CPPN/INPA (2009).	22
Tabela 7. Substratos dentro da Estaca 4 (herbáceae).	27

INTRODUÇÃO

A *Picrolemma sprucei* Hook.f. é um arbusto pertencente a família Simaroubaceae conhecido vulgarmente por caferana e tem uma semelhança com a planta do café, tanto nas folhas como nos frutos. A família Simaroubaceae, a qual pertence a caferana possui cerca de 25 gêneros e 200 espécies distribuídas na região tropical. São facilmente confundidas com outras plantas das famílias Meliaceae, Sapinaceae, Anacardiaceae e outras famílias da ordem Sapindales.

A *P. sprucei* é bastante conhecida por populações ribeirinhas e indígenas as quais a utilizam como antimalárica e abortiva, além de ser usado no tratamento gástrico e anti-helmíntico (LE COINTE, 1947).

A *P. sprucei* é encontrada principalmente em regiões de campinarana próximos a igarapés, tendo sido registrada no Equador, Guiana Francesa, Peru, Colômbia, Venezuela além do Brasil.

O trabalho foi dividido em três partes: Na primeira parte (Capítulo I) observou-se a planta em seu habitat natural (Fazendas ZF2/INPA), acompanhando-se durante um período de quatro anos, o desenvolvimento da mesma. Neste experimento foram avaliados ano a ano variáveis como altura, diâmetro e número de folhas de aproximadamente 300 plantas, feitas as primeiras medições em 2005 e o último registro em 2008. Paralelo a estes resultados, foi conduzido um cultivo controlado em campo dessa espécie para comparação de performances das mesmas variáveis, em área da sede do INPA, adjacente à CPPN, com material de estacas e sementes provindo da fazenda experimental ZF2/INPA. Neste foram estudados dois tipos de técnicas de propagação do material vegetal para produção de mudas. A primeira dessas técnicas foi a estaquia

(Capítulo II), com quatro tratamentos em diferentes substratos, a segunda foi a germinação de sementes (Capítulo III) também em quatro diferentes substratos.

A terceira parte do trabalho (Capítulo IV) foi o estudo da diversidade genética das três populações de plantas, através do marcador molecular AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms). Com essa ferramenta identificou-se a diversidade dentro e entre as populações, quando confrontadas umas com as outras, o que foi ilustrado em dendrograma (Apêndice I).

Portanto o objetivo do trabalho foi conhecer a diversidade genética da espécie *Picrolemma sprucei* dentro e entre populações, incluindo uma população cultivada através do marcador molecular AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms). Também é objetivo do trabalho estudar a melhor maneira de propagar a espécie para sua domesticação. Estes estudos são justificados devido a importância que a espécie vem ganhando nos últimos anos pelos pesquisadores da área de plantas medicinais.

1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA ESPÉCIE

A *P. sprucei* Hook. é um arbusto pertencente a família Simarubaceae conhecido vulgarmente por caferana - que quer dizer falso café – devido a planta ter muita semelhança a de café. A família Simaroubaceae possui cerca de 25 gêneros e 200 espécies bastante diversificada na região neotropical. No campo elas costumam ser confundidas com as Meliaceae, Sapinaceae, Anacardiaceae e outras famílias da ordem Sapindales (RIBEIRO et al., 1999).

As caferanas apresentam-se em forma de arbustos, folhas glabras e ramos pilosos, freqüentemente, com casca, ramos e folhas amargas. As folhas são alternadas, compostas pinadas (imparipinadas), sem estípulas e freqüentemente possuem glândulas nos ápices dos folíolos. Os folíolos são cactáceos, simétricos, verde-escuros e brilhantes (RIBEIRO et al., 1999). As folhas glabras apresentam células de paredes onduladas e estômatos anomócitos. O mesófilo é dorsiventral com uma camada de células empaliçada e um parênquima lacunoso. Há no caule uma evidência de um parênquima cortical desenvolvido, com células de natureza esclerenquimática, isoladas ou reunidas em pequenos grupos de paredes espessas. Já os feixes vasculares são bicolaterais, apresentando idioblastos escuros de conteúdo tânico. Internamente observa-se a região vascular com vasos xilemáticos isolados ou em grupos imersos em tecido fibroso, sendo o parênquima do tipo paratraquial, vasicêntrico. Na região central encontra-se uma medula desenvolvida (SARAIVA et al., 2004).

As flores da caferana, assim como de todas as Simarubaceae são pequenas, brancas, cremes, esverdeadas e alaranjadas, reunidas em inflorescências multiflorais, com flores de pétalas livres e com um disco aparentemente nectarífero na base do

ovário. Os frutos são drupas apocárpicas (1-5 carpódios), subcarnosos, de cores vivas quando maduros (alaranjados, rubros e enegrecidos) (RIBEIRO et al., 1999).

A caferana já é bem conhecida das populações indígenas e ribeirinhas, a planta tem sido utilizada há bastante tempo na medicina tradicional para o tratamento da malária. No Brasil, o chá das folhas e das raízes é usado no tratamento de gastrite, como febrífugo e anti-helmíntico sendo empregado também no Peru para as mesmas finalidades (LE COINTE, 1947; MORS et al., 2000).

1.1 A Família Simaroubaceae

A família Simaroubaceae contém aproximadamente 25 gêneros e 200 espécies. Dentre estas pelo menos oito ocorrem na Amazônia Brasileira. Possui afinidades botânicas com as famílias Rutaceae, Burseraceae e Meliaceae. O principal uso comercial está relacionado à presença dos quassinóides (RIBEIRO et al., 1999; THOMAS, 1990). Quassinóides compõem um grupo de substâncias amargas que quimicamente são triterpenos degradados e altamente oxigenados em geral. De acordo com seu esqueleto básico, podem ser agrupados em cinco grupos contendo 18, 19, 20, 22 ou 25 carbonos (GUO et al., 2005).

As Simaroubaceae são árvores e arvoretas, glabras a pilosas, freqüentemente com casca, ramos e folhas amargas. As folhas são alternas, compostas pinadas (imparipinadas), sem estípulas e frequentemente possuem glândulas nos ápices dos folíolos. As flores são quase sempre pequenas, brancas, cremes, esverdeadas e alaranjadas, reunidas em inflorescências multiflorais, com flores de pétalas livres e com um disco aparentemente nectarífero na base do ovário. Os frutos são drupas apocárpicas

(1-5) carpídios, subcarnosos, de cores vivas quando maduros (alaranjados, rubros e enegrecidos) (RIBEIRO et al. , 1999)

1.2 Estudos químicos

Estudos químicos realizados desde a década de 80, pela CPPN/INPA, Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e Universidade Federal de Lavras (UFLA), revelaram a presença de quassinóides antileucêmicos, antiplasmódico (Malária), citotóxicos, nas folhas, caules e raízes desta planta. Os isômeros estruturais neosergiolida e sergiolida apresentam atividade antimalárica *in vitro* e *in vivo* (FAUDER et al., 1985; MORETTI et al., 1982). Segundo MORETTI et al. (1982), os quassinóides são constituintes encontrados nas Simaroubaceae e esses isolados das raízes dessa família já mostraram atividades inseticidas além de antiviral.

O primeiro relato de um estudo químico de *P. sprucei* foi feito por Othon Machado, o qual obteve um alcalóide denominado duckeina a partir dos caules. Em um estudo posterior, ALTMAN (1956) descreveu um laborioso método para obtenção do alcalóide quinina a partir dos caules de *P. sprucei*, com um rendimento de 0,07 %. Entretanto, a ausência de dados espectroscópicos, bem como o não isolamento desta substância em estudos químicos posteriores levanta dúvidas quanto a presença deste importante antimalárico em *P. sprucei*.

Dos caules, raízes e folhas de *P. sprucei* encontrada na Guiana Francesa foram isolados os quassinóides sergeolida e isobruceína B (MORETTI et al., 1982), além dos esteróides β -sitosterol, estigmasterol, sitostenona e estigmastenona, os alcalóides cantin-6-ona, ácido 1- β -carbolinil-3-propiónico e 7-hidroxi-3'-(1- β -carbolinil)-3-butanoato de etila. Isobruceína B também foi obtida de *Brucea antidysenterica* Mill., *Soulamea amara* e *P. huberi*, enquanto que a sergeolida também foi obtida dessa última espécie. A

acetilação da sergeolida produziu a diacetilsergeolida. Das folhas de *P. sprucei*, também da Guiana Francesa, foram isoladas a 15-desacetilsergeolida, além da sergeolida e da isobruceína B (POLONSKY et al., 1984; VIEIRA, 1995).

O grupamento cetona α - β -insaturado no anel A da isobruceína B (**2**) foi reduzido cataliticamente para obtenção de um derivado, o qual foi oxidado com trióxido de bismuto para obtenção do derivado diosfenol. No mesmo trabalho foi descrita pela primeira vez a acetilação da isobruceína B, produzindo o derivado diacetilado. Nenhum dos derivados foi testado em ensaios biológicos (KUPCHAN et al., 1975). Em um estudo posterior, foi descrito o preparo do primeiro derivado acetilado da neosergeolida (SILVA, 2006).

1.3 Uso popular

As plantas medicinais têm sido uma rica fonte de obtenção de moléculas para serem exploradas terapeuticamente. Muitas substâncias isoladas de plantas continuam sendo fontes de medicamentos, a caferana, por exemplo, é usada, comumente, como vermífugo pelas populações ribeirinhas. No Brasil 20% da população consome 63% dos medicamentos alopáticos, o restante encontra nos produtos de origem natural, especialmente as plantas, uma fonte alternativa de medicação. O interesse da pesquisa nesta área tem aumentado nos últimos anos onde estão sendo instituídos projetos financiados por órgãos públicos e privados. Nos anos 70, nenhuma das grandes companhias farmacêuticas mundiais mantinha programas nesta linha e atualmente isto tem sido prioridade na maioria delas. Dentre os fatores que têm contribuído para um aumento nas pesquisas está a comprovada eficácia de substâncias originadas de espécies vegetais como os alcalóides com atividade antileucêmica, ou com atividade

antiglaucoma, ambos ainda considerados indispensáveis para o tratamento e por muitas plantas serem matéria-prima para a síntese de fármacos (FOGLIO et al., 2006).

A *P. sprucei* é bastante conhecida por populações ribeirinhas e indígenas as quais a utilizam como antimalárica e abortiva, além de ser usado no tratamento gástrico e anti-helmíntico (LE COINTE, 1947). Extratos alcoólicos preparados a partir de caules, folhas e raízes de *P. sprucei* são utilizados no tratamento curativo da malária, em combinação com outras espécies vegetais e drogas modernas. O extrato é obtido por maceração da planta em rum ou outra bebida alcoólica por vários dias ou semanas. Um pequeno copo é tomado diversas vezes por semana, podendo chegar até 15 dias de administração do chá (VIGNERON et al. 2005).

CAPÍTULO I: Avaliação do recrescimento da Caferana (*Picrolemma sprucei*) em ambiente nativo

INTRODUÇÃO

A Caferana é um arbusto de até 3,5 m de altura, com distribuição nas florestas de campinaranas da Amazônia (BARROS et al., ainda não publicado), desde o Peru até a Guiana Francesa, onde é conhecida como uma planta antimalárica por povos nativos da região amazônica, sendo utilizada sem critérios como chá medicinal para combater essa doença por intermédio desses povos. É comum ver-se a planta, comercializada no mercado Adolfo Lisboa em Manaus por apenas R\$ 1,00 uma planta inteira, que leva conforme observações em campo, não menos que quatro anos para se recompor, depois de cortada, em recrescimento, pois, a mesma tem uma raiz pivotante, bastante profunda, que assegura um forte rebroto, após o corte do caule, mesmo que o corte seja rente ao chão ou mesmo um pouco abaixo.

A planta é coletada por povos nativos do interior do Amazonas com o intuito de se produzir um chá para ser ministrado para combater a malária, ou para ser comercializada em mercados municipais, tornando a planta de importância, tanto cultural como comercial por esses povos.

Deste modo, necessita uma investigação minuciosa, não só em suas propriedades químicas, mas também em seu comportamento fisiológico e agrônomo, devido à mesma ter ganhado importância entre os povos nativos, por suas inúmeras atividades, comumente relatadas por povos locais, tais como: antimalárica, antileucêmica, antitumoral, larvicida, vermicida, no tratamento gástrico, possivelmente devido seu alto teor de quassinóides (isobruceína B, sergeolide e neosergeolide).

Por isso, estudou-se o recrescimento de *P. sprucei* em ambiente nativo, a fim de conhecer o seu comportamento em relação ao incremento de material vegetal, durante um longo período de recrescimento, e assim poder levar essas informações de técnicas de crescimento de material cultivado para a produção de mudas (sementes e/ou estacas), desenvolvendo assim um método de produção.

De acordo com estudos preliminares realizados na Universidade Federal do Amazonas (UFAM), na EMBRAPA-AM e no INPA/ CPPN (Barros, F.C.F. & Pohlit, A.M. – ainda não publicados), com a caferana esta planta tem apresentado diversos entraves para a multiplicação, tais como: a) insuficiência de material disponível para as pesquisas químicas e agronômicas por diferentes motivos, gerando o desinteresse para pesquisa com esse material; b) ausência de material cultivado disponível para realização dos trabalhos de pesquisa; c) desaparecimento da espécie pela não ocorrência geográfica, ocasionada pelas intensas buscas de material selvagem nas matas, mais próximas dos municípios, afastando cada vez mais geograficamente sua ocorrência.

Este trabalho é inédito por não haver literatura, sobre propagação e recrescimento da planta em ambiente nativo, e nem mesmo da família, Simarubacea, para ajudar o estabelecimento e/ou uma padronização de mudas no processo de domesticação da planta.

MATERIAL E MÉTODOS

Inicialmente, identificou-se na Reserva ZF2, do INPA, AM, plantas de caferana em ambiente nativo e em estado adulto, com altura mínima de 20 cm e com pelo menos duas folhas maduras, caracterizadas com a coloração verde escura. As plantas escolhidas foram marcadas com placas de alumínio numeradas, de 1 a 300. Posteriormente, na época de cada medida foram avaliadas apenas plantas ≥ 20 cm de comprimento.

De cada planta foram analisadas as características: altura total do caule (medida do chão até o ápice do caule); diâmetro da base (medido rente ao chão) e o número de folhas na planta.

O recrescimento foi avaliado, inicialmente, em relação aos dois primeiros parâmetros de crescimento (altura total e diâmetro). Posteriormente, observou-se que o diâmetro não apresentou viabilidade técnicas na medição na hora da coleta, pois, a casca da planta variou bastante na primeira medição, podendo apresentar erros de avaliação e as medidas das folhas também variavam, muitas vezes diminuindo. Deste modo, optou-se em avaliar apenas a altura. As medidas foram feitas, anualmente, durante quatro anos consecutivos, iniciando-se em 2005, que foi o ano da coleta e primeira medida, as outras três medições estenderam-se até 2008.

Os dados foram analisados por estatística descritiva com medidas: de posição (média, mínima, máxima, medidas de quartis) e medidas de variabilidades (amplitude total, desvio-padrão, coeficiente de variação), além de análise de inferência - intervalo de confiança da média, (limite inferior e limite superior) ao nível de 5% de probabilidade, através do software Minitab 14.1.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A variável altura total das plantas nos quatro períodos (população nativa inicial), considerado o tempo zero e nos três anos (1, 2 e 3), apresentou diferença entre o tempo de corte (população nativa inicial, o qual era desconhecido suas verdadeiras idades) e, os demais períodos de avaliação (tempos de recrescimento) conforme a Tabela 1. O número de plantas avaliadas ≥ 20 cm foi: 245 plantas, no ano inicial “0”; 103 no ano “1”; 107 no ano “2” e 151 no ano “3”.

Na Tabela 1, os períodos de recrescimento (1, 2 e 3) foram analisados pelas estatísticas descritivas das medidas de posição e de variabilidade, seguidas do intervalo de confiança das médias dos períodos observados.

Nas medidas de posição - as estimativas das médias de recrescimento foram de 25,46 cm para o ano 1; 25,49 cm para o ano 2 e 27,25 cm para o ano 3. Estas estimativas de alturas dos recrescimentos foram inferiores à média da população nativa inicial (41,54 cm) com desvio padrão (22,24 cm). Baseado no cálculo da distribuição normal padronizada, conclui-se que as estimativas para cada período de crescimento foram de 0,7230 cm, no primeiro ano; 0,7216 cm, no segundo ano; e 0,6425cm no terceiro ano, conforme tabela Z da distribuição normal padrão (NASCIMENTO et al., 2009) que corresponde a incremento de 23,58%, 23,58% e 26.11%, respectivamente, em cada ano. Isto demonstrou que o incremento de material vegetal é lento. Justificando um melhor estudo agronômico sobre a espécie.

Para avaliar a performance de plantas foi necessário fazer a estimativa de quartis. O do primeiro quartil foi 20 cm, igual para todos os períodos de recrescimento. Significa que 25% das plantas atingiram a altura de 20 cm de comprimento, enquanto a população nativa inicial obteve 26 cm (Tabela 1).

A estimativa do segundo quartil, mediana, significou que 50% das plantas atingiram as alturas de 23, 22 e 24 cm, respectivamente para os anos 1, 2 e 3. Enquanto a população nativa inicial obteve 37 cm (Tabela 1).

Na estimativa do terceiro quartil significou que 75% das plantas atingiram a altura de 28, 28 e 30 cm, respectivamente para os anos 1, 2 e 3. Entretanto a população nativa inicial obteve 50 cm (Tabela 1).

Lembrando que a altura mínima foi, pré-determinada, de 20 cm, entretanto os máximos obtidos foram de 60, 90 e 105 cm, respectivamente para anos 1, 2 e 3.

Nos períodos de recrescimento 1, 2 e 3 observou-se que as medidas de variabilidade, amplitude total - maior observação e a menor observação, foram 40, 70 e 85 cm. As estimativas de desvio padrão foram de 7,97; 9,50; e 10,35 cm, respectivamente para os anos 1, 2 e 3. Mostrando haver uma tendência crescente de variabilidade nos períodos.

Tabela 1. Avaliação da Altura Total da planta de caferana (*Picrolemma sprucei* Hook. f.) nos quatro períodos de tempos (0, 1, 2 e 3 anos), na ZF2/INPA, Manaus, AM, 2005-2008.

Estimativas	Períodos de avaliação			
	ano 0	ano 1	ano 2	ano 3
N	245	103	107	151
Média	41,54	25,46	25,49	27,25
1º Quartil	26,00	20,00	20,00	20,00
Mediana	37,00	23,00	22,00	24,00
3º Quartil	50,00	28,00	28,00	30,00
Máximo	130,00	60,00	90,00	105,00
Mínimo	20,00	20,00	20,00	20,00
Amplitude	100,00	40,00	70,00	85,00
Desvio Padrão	22,24	7,97	9,50	10,35
Limite de Confiança – Inferior	38,99	23,90	23,67	25,58
Limite de Confiança - Superior	44,08	27,01	27,32	28,91
C V(%)	53,54	31,30	37,27	37,98

FONTE: Organização estatística do Autor usando o programa MINITAB 14.1

As estimativas da altura total dos limites de confiança da média (inferior e superior) da população nativa estudada foram de (38,99 a 44,08 cm). Na Tabela 1, os demais

períodos de recrescimento no ano 1 (23,90 a 27,01 cm); no ano 2 (23,67 a 27,32 cm); no ano 3 (25,58 a 28,91 cm) não atingiram o limite inferior médio da altura total da população nativa.

Por outro lado, as estimativas do coeficiente de variação foram de 31,30%, 37,27% e 37,98%, respectivamente para os anos 1, 2 e 3 e 53,54% no tempo zero. Conforme GOMES (2005) o coeficiente de variação é considerado baixo $\leq 10\%$; médio, de 10 a $\leq 20\%$; altos de 20 a $\leq 30\%$; muito alto $\geq 30\%$. As medidas de coeficiente de variação foram todas maiores do que 30%, indicando que há grande variabilidade, que há no crescimento dessa espécie em ambiente natural, devido a fatores desconhecidos, suscitam-se a estudos ambientais e fenológicos da espécie.

Vale salientar que, por ser uma avaliação pioneira e inédita as medidas de recrescimento com espécies selvagens permanentes e mesmo com espécies cultivadas, salvo em caso de plantas forrageiras, não foi possível fazer comparações com resultados de recrescimento de outras espécies. O motivo de avaliar-se o recrescimento, até as plantas investigadas atingirem as mesmas alturas originalmente coletadas na medida do ano zero, justifica-se devido esse trabalho ter um contexto dentro da Botânica Econômica, avaliando a viabilidade econômica por parte dos comerciantes de plantas medicinais comerciarem uma planta de caferana por R\$ 1,00 (um real), a qual leva pelo menos quatro anos para atingir novamente o tamanho a qual foi originalmente cortada em campo, já que a mesma tem a característica de sempre rebrotar. A caferana é uma planta sem galhos, e seu crescimento se deve ao desenvolvimento vertical de seu único tronco que recebe diretamente suas folhas,

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As plantas de caferana, após o corte ao nível do solo, alcançaram um incremento de recrescimento lento, durante os anos analisados,

As alturas médias de recrescimento das plantas, nos períodos observados, foram baixas e com muita variabilidade dentro de cada ano.

O recrescimento de 75% das plantas, no quarto ano, período final do estudo foi, apenas, aproximado ao tamanho dos 25% da população nativa inicial.

Recomenda-se evitar o extrativismo vegetal da espécie e fazer estudos de técnicas agronômicas de produção, em ambiente cultivado, devido ao seu baixo incremento de material vegetal em ambiente nativo, a fim de melhorar seu rendimento. Sendo totalmente inviável sua venda in natura em comércios, pois estes não conseguem sequer pagar um preço ao nível do desgaste ambiental sofrido pela espécie nesse tipo de extrativismo.

CAPÍTULO II: Método de produção de mudas por estaquia da espécie amazônica *Picrolemma sprucei* Hook. f.

INTRODUÇÃO:

Picrolemma sprucei é uma planta da família Simaroubaceae, conhecida popularmente por caferana. É um arbusto encontrado mais frequentemente em um ecossistema chamado “campinarana” que possui solo tipo arenoso. As caferanas costumam aproveitar a luz das clareiras para se desenvolverem melhor, por isso é mais fácil encontrá-las nas campinaranas próximas a clareiras e também ocorrem mais próximas a igarapés, por preferirem ambientes mais úmidos (BARROS et al., 2006). Em estudos recentes foram encontradas plantas de caferana em terrenos arenosos em pequenas encostas, com inclinações de aproximadamente 30°,

A espécie foi localizada no município de Manaus, em matas do Campus da UFAM, na Reserva Ducke e nas reservas ZF2 do INPA. Foi também encontrada em grande quantidade no município de Silves. A altura do arbusto é muito variável nessas regiões citadas, e próximas de Manaus foram encontradas plantas de caferana com 3,5 m de altura. Também devido a observações colhidas nestas regiões, cada planta produz no máximo seis cachos, e até o momento ainda não foi encontrado plantas com número superior a 200 sementes por cacho, os quais se apresentaram com coloração verde escuro, quando nova, indo até um amarelo ou avermelhado escuro, quando madura.

A exploração de plantas nativas na medicina popular é largamente difundida no país. A maioria das espécies tem sido usada de forma extrativista. A disponibilização de informação sobre a propagação de espécies medicinais, vai facilitar aos agricultores o cultivo dessas plantas (FARIAS, 1999). O processo de fitoterapia e a obtenção de

fitofármacos dependem do acesso facilitado às plantas produtoras de substâncias ativas, evitando falsificação ou substituição por outras plantas, aumentando a credibilidade nos mesmos por parte de pacientes e médicos (ROSA, 2000).

Existe uma grande dificuldade de se obter material para conduzir experimentos com essa espécie principalmente nas proximidades de Manaus. Até o presente momento só existiu um plantio cultivado de *P. sprucei* Hook F., o qual se encontrava na área adjacente à CPPN/INPA, provenientes de mudas de sementes, tendo sido instalado pelos pesquisadores Francisco Cleber Felix Barros (CBA) e Adrian Martin Pohlitz (INPA).

Conhecendo a dificuldade de propagação da espécie, iniciou-se o processo de domesticação da planta *P. sprucei* Hook F., com a ajuda de técnicas agronômicas apropriadas. A primeira técnica testada foi a estaquia, avaliando-se o índice de pegamento de diferentes tipos de estacas de *P. sprucei* Hook F. em diferentes substratos, a fim de selecionar os melhores substratos e técnicas para conduzir futuros experimentos de cultivo controlado com a espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados dois experimentos, a fim de avaliar a melhor percentagem de pegamento de estacas. O primeiro experimento foi realizado em casa de vegetação (INPA/CPPN) em delineamento inteiramente ao acaso em esquema de fatorial (4x4) com 10 estacas por repetição, dispostos em quatro tipos de estacas: “E1” (lenhosa); “E2” (semi-lenhosa); “E3” (semi-herbácea); “E4” (Herbácea) e quatro tipos de substratos: S1 (somente areia); S2 (50% de Areia + 50% de Solo argiloso); S3 (somente solo argiloso) e S4 (40% de areia + 30% de solo argiloso + 30% de terra compostada), perfazendo assim um total de 160 estacas. As estacas mediram aproximadamente 20cm de comprimento e diâmetro entre 0,8 a 1cm e foram plantadas em sacos de polietileno de 1kg, com respectivos substratos, cheios até um centímetro da borda.

Depois de plantadas nos sacos, as estacas foram pressionadas pelo substrato para dar uma boa sustentação às mesmas. Todos os tratamentos, que levaram mistura de materiais em sua composição, foram devidamente homogeneizado em pátio de cimento antes de ir para os sacos de polietileno, tendo sido bem socados, antes e depois da introdução das estacas.

Todos os tratamentos foram conduzidos em casa de vegetação (INPA/CPPN) com aspersão automatizada a cada 20 min. e com uma duração de 60s de chuva por aspersão.

No segundo experimento utilizou-se a estaca lenhosa, de melhor desempenho, obtido no experimento 1, sendo implantado com os tratamentos, dos quatro substratos anteriormente descritos (S1, S2, S3 e S4), sendo realizado em delineamento ao acaso com 30 estacas para cada substrato, num total de 120 estacas para o experimento 2.

Posteriormente, foram obtidas as percentagens de pegamento em ambos experimentos, e para análise foi realizada transformação para variável percentagem de pegamento em $y = \sqrt{\text{arcosseno}\left(\frac{x}{100}\right)}$. A análise estatística realizada foi análise de variância. Análise de variância (ANOVA) com teste F e comparação de médias pelo teste Tukey (MINITAB 14.1), ambas ao nível de 5% de probabilidade, para ambos experimentos.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

No primeiro experimento os substratos, as estacas e a interação (estacas X substratos) foram significativas pelo teste F, ao nível de 5% de probabilidade.

Na tabela 2, as maiores percentagem de pegamentos foram com os substratos S4, S3 e S2 respectivamente (21,63, 13,13 e 9,16 %). Os substratos S1 (9,16%) e S2 (8,33%) deram um rendimento bem abaixo dos outros dois. Todos os substratos diferiram entre si, sendo o melhor desempenho o do S4 (Terra compostada + areia + Solo argiloso), que pode ter sido beneficiado pela maior quantidade de partículas retentoras de água, como sugeriu PESCADOR et al. (2007), quando estudando estaquia cultivada sobre substrato úmido afirmou que, estacas cultivadas nesses substratos são capazes de formar maior número de folhas, raízes e brotações, devido a boa retenção de água e ótimo espaço de ar na capacidade de retenção. Também SODRÉ (2007) afirma que a presença de silte, argila e matéria orgânica envolvendo areia exerce influencia sobre a retenção de água, e é exatamente o que o substrato S4 sugere. Enquanto o pior desempenho foi (8,33%) de pegamento no substrato S2, contendo areia e solo argiloso.

Tabela 2. Rendimento da caferana (*Picrolemma sprucei* Hook. f.) quando comparado os quatro diferentes tipos de substratos entre si, (experimento I), CPPN/INPA (2009).

Substratos	MédiaTukey	
S4 - Terra compostada + areia + solo argiloso	21,63	a
S3 – Solo argiloso	13,33	b
S1 – Areia	9,16	c
S2 - Areia+ Solo argiloso	8,33	d

O melhor desempenho médio foi obtido pelas estacas do tipo lenhosa E1 (29,16%), seguida da estaca tipo herbácea E4 (20%), e não se mostraram eficiente para o

pegamento as estacas semi-lenhosa (2,50%) e semi-herbáceas (0,80%), conforme Tabela 3. Entretanto, as melhores performances foram abaixo de 30% de pegamento, inviabilizando a técnica para produção de mudas.

Tabela 3. Comparação de Pegamento (%) dos quatro diferentes tipos de estacas de caferana (*Picrolemmasprucei*) entre si, (experimento I), CPPN/INPA (2009).

Tipos de Estacas	MédiaTukey	
E1 – Lenhosa	29,16	a
E4 – Herbácea	20,00	b
E2 – Semi-lenhosa	2,50	c
E3 – Semi-herbácea	0,80	d

Como a interação (estacas X substratos) foi significativa, optou-se em avaliar o efeito de substrato dentro das melhores estacas (E1 e E4) na análise de variância, onde foi realizado o desdobramento dos graus de liberdade dos tratamentos. E conforme as comparações de médias (Tabela 3), foi possível visualizar que dentro da estaca lenhosa (E1), o melhor substrato foi o compostado S4(43,33%), e seguido do S3, composto apenas com solo argiloso (33,33%). Sendo os dois piores substratos S2 e S1 similares, com 20% de pegamento apenas (Tabela 4).

Tabela 4. Desdobramento dos substratos dentro da Estaca 1(lenhosa), (experimento I), CPPN/INPA (2009).

Substrato	Tipo de Substratos	X(%)	Tukey
S4	30% areia + 30% Composto + 40% areia	43,33	A
S3	100% Solo argiloso	33,33	B
S2	50% Areia + 50% Solo argiloso	20,00	C
S1	100% Areia	20,00	C

Apesar da estaca E1 ter sido melhor significativamente do que a estaca E4, nos desdobramentos de substrato dentro de estaca E4 confirma que os substratos que obtiveram melhores rendimentos foram S4 (30%) e S3 (20%), sendo os piores desempenhos S2 (13,33%) e S1 (16,66%). Entretanto as melhores estacas dentro da estaca E4 alcançaram $\leq 30\%$ de pegamento (Tabela 5).

Tabela 5. Desdobramento dos substratos dentro da Estaca 4 (herbácea), (experimento I), CPPN/INPA (2009).

Substrato	Tipo de Substratos	(%)	Tukey
S4	30% areia + 30% Composto + 40% areia	30,00	A
S3	100% Solo argiloso	20,00	B
S1	100% Areia	16,66	C
S2	50% Areia + 50% Solo argiloso	13,13	D

Constatado que a melhor performance foi da estaca lenhosa (E1), quando comparada entre as estacas e dentro dos substratos (Tabelas 3 e 4), suscitou-se desta forma então a realização do segundo experimento para comprovação da performance da estaca lenhosa apenas, com os quatro substratos (S1, S2, S3 e S4), já que o melhor rendimento E4 não passou de 30% na interação entre substratos. Obteve-se porém neste segundo experimento um desempenho análogo ao experimento 1, conforme mostra a Tabela 6.

Tabela 6. Pegamento (%) da Estaca1 (lenhosa) em quatro diferentes tipos de substratos, (experimento II), CPPN/INPA (2009).

Substrato	Tipo de Substratos	X(%)	Tukey
S4	30% areia + 30% Composto + 40% areia	23,72	A
S3	100% Solo argiloso	18,02	AB
S1	100% Areia	13,29	B
S2	50% Areia + 50% Solo argiloso	5,67	C

Verificou-se que entre as estacas, o melhor rendimento foi da estaca lenhosa (21,67%) no primeiro experimento com o substrato S4 (30% areia + 30% Composto + 40% areia), que é maior um pouco que o rendimento médio das quatro estacas juntas com este mesmo substrato (21,63% - Tabela 2), o que também segue acontecendo com os demais pegamentos da estaca lenhosa (E1) sobre os demais substratos do segundo experimento, com exceção do substrato S2 (50% Areia + 50% Solo argiloso) que teve no segundo experimento menor rendimento (5,67%) que no primeiro (8,33%).

Observou-se também que durante o experimento, esta espécie teve dificuldade no pegamento. Na Tabela 6, as maiores percentagens de pegamentos foram com os substratos S4, S3 e S2 respectivamente, 23,72, 18,02 e 13,29 %. Os substratos S4, S3 não diferiram entre si, como também os pegamentos S3 e S1 não diferiram entre si, embora S3 obteve uma classificação intermediária entre S4 e S1. No entanto S4 difere de S1. Enquanto o pior desempenho foi 5,67% de pegamento no substrato S1, com areia apenas.

Estes resultados demonstraram que a planta tem afinidade com a umidade, pois, foi constatado que com a presença de partículas retentoras de umidades as performances foram melhores, nos substratos S4 e S3 os quais possuíam argila. Deste modo, o substrato que obteve o melhor desempenho de pegamento continha, além de argila, o húmus que é a partícula de maior retenção de umidade. Além do que quando se fez a interação

substrato dentro das estacas 1 e 4 (as de melhores desempenhos, vide Tabelas 4 e 5), também teve destaque o substrato S4 com o melhor desempenho para ambas as estacas. Ficando demonstrado então, que o substrato S4 é o melhor substrato para a produção de muda da caferana com a técnica da estaquia. Provavelmente, esta técnica não é aconselhada para a produção de mudas. Possivelmente, outras técnicas poderão demonstrar melhores resultados do que mudas por estaquia.

CONCLUSÃO

O melhor substrato para a técnica de estaquia de caferana foi o substrato S4 (30% solo argiloso + 30% Composto + 40% areia). O maior pegamento se deu com a estaca lenhosa (29,16%) seguida da estaca herbácea (20%). Estes resultados demonstraram que a planta tem afinidade com a umidade, pois, foi constatado que com a presença de partículas retentoras de umidades as performances foram melhores, nos substratos S4 e S3 os quais possuíam quantidade de partículas retentoras de umidade >60%. Deste modo, o substrato que obteve o melhor desempenho de pegamento continha, além de argila, o húmus que é a partícula de maior retenção de umidade. Esta foi a única técnica testada até o presente momento, possivelmente outras técnicas poderão demonstrar melhores resultados do que mudas por estaquia. Recomenda-seno entanto a utilização de estacas lenhosas (E1) combinadas com o substrato S4 (30% solo argiloso + 30% Composto + 40% areia) no caso de se querer produzir mudas da espécie *P. sprucei* por técnica de estaquia, enquanto desconhece-se melhores técnicas de produção de mudas.

Durante o experimento, todas as mudas que enraizaram, produziram raízes muito pequenas, No final do experimento 1, conforme mostra a Tabela 02, observa-se que esta espécie tem dificuldade de pegamento.

CAPÍTULO III Germinação de *Picrolemma sprucei* Hook f. em ambiente de casa de vegetação

INTRODUÇÃO

A caferana (*Picrolemma sprucei*) é um arbusto nativo da região Amazônica que vem ganhando notoriedade devido ao seu uso popular como planta antimalárica. Estudos químicos realizados desde a década de 80, pela CPPN/INPA, Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e Universidade Federal de Lavras (UFLA), revelaram a presença de quassinóides antileucêmicos, antiplasmódico (Malária), citotóxicos, nas folhas, caules e raízes desta planta. Os isômeros estruturais neosergiolidina e sergiolidina apresentam atividade antimalárica *in vitro* e *in vivo* (FAUDER et al., 1985; MORETI et al., 1982). Segundo MORETTI et al. (1982), os quassinoides são constituintes encontrados nas Simaroubaceae e os quassinoides isolados das raízes dessa família já mostraram atividades inseticidas além de antiviral.

Em estudos prévios que fizemos e ainda não publicado, mas já submetido em BARROS et al. (2011), mostraram que na multiplicação por estaquia da *P. sprucei* tem-se obtido baixos índices de enraizamento. O melhor resultado obtido por estaquia está sendo de 30%, realizado por nós no horto da CPPN/INPA. O que justifica plenamente a tentativa de multiplicar a planta por outras técnicas agronômicas, já que existe grande dificuldade de se obter a planta para estudos na região de Manaus. Decidiu-se então um experimento com utilização da técnica de germinação sobre quatro tipos diferentes de substratos, com o objetivo de se testar o rendimento da técnica em relação à estaquia com essa espécie, desenvolvendo-se com isso mais uma técnica de produção de mudas, para possivelmente se obter melhores resultados do que as já testadas.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento conduzido em casa de vegetação em blocos inteiramente ao acaso sobre quatro tipos diferentes de substrato: para o tratamento (G_1) foram preenchidos 30 sacos, somente com areia. No segundo tratamento (G_2), 30 sacos contendo 50% de areia e 50% de solo argiloso, O terceiro tratamento (G_3), 30 sacos somente com solo argiloso, e por final; o quarto tratamento (G_4), 30 sacos com 30% de matéria orgânica (terra preta), com 30% de solo argiloso e mais 40% de areia.

Para o experimento utilizou-se sementes oriundas do campus da UFAM e que plantadas em sacos de polietileno de 1 kg, em casa de vegetação com aspersão automatizada por 60s a cada 20 min. O experimento foi montado em três blocos ao acaso realizados em quatro tipos de tratamentos, levando-se em consideração os 4 tipos de substratos, no primeiro tratamento (G_1) foram preenchidos 30 sacos, somente com areia até um centímetro da borda. No segundo tratamento (G_2), 30 sacos contendo 50% de areia e 50% de solo argiloso, cheios também até a um centímetro da borda. O terceiro tratamento (G_3), 30 sacos somente com solo argiloso, da mesma maneira cheio até um centímetro da borda e por final; o quarto tratamento (G_4), 30 sacos com 30% de matéria orgânica (terra preta), com 30% de solo argiloso e mais 40% de areia, também cheio até um centímetro da borda.

Todos os tratamentos que levaram mistura de materiais de substrato em sua composição, foram devidamente homogeneizado em pátio de cimento antes de ir para os sacos de polietileno. As sementes foram colocadas em número de uma por saco e imediatamente socadas após inserção nos sacos. A cada cinco dias foi observado se houve germinação.

RESULTADO E DISCUSSÕES

Para o experimento de germinação de sementes foram coletadas um total de 120 sementes de caferana no Campus da UFAM (Universidade Federal do Amazonas) por bloco, num total de três blocos, cada um conduzido em três diferentes anos (2005, 2006 e 2008).

Somente após aproximadamente 45 dias depois de plantadas, as primeiras sementes começaram a germinar nos tratamentos G_2 , G_3 e G_4 .e somente após aproximadamente 55 dias no G_1 .

Durante o experimento observou-se que a espécie tem uma dificuldade moderada de germinação, pois dos tratamentos desse experimento, o melhor foi o G_4 o qual possuía um substrato composto por (G_4 -30% de terra compostada com 30% de solo argiloso e mais 40% de areia), onde se obteve 41,02% de germinação, seguido do terceiro tratamento (G_3 – somente solo argiloso) com 31,92%, em seguida o segundo tratamento (G_2 - 50% de areia e 50% de solo argiloso) com somente 30,29% de germinação, e por último o primeiro tratamento (G_1 – somente areia) com 22,94% de pega(Veja Tabela 7).

Tabela 7. Substratos dentro da Estaca 4 (herbácea).

Substrato	Tipo de Substratos	X(%)	Tukey
G4	30% areia + 30% Composto + 40% areia	41,02	A
G3	100% Solo argiloso	31,92	B
G2	50% Areia + 50% Solo argiloso	30,29	B
G1	100% Areia	22,94	C

Os substratos G3 e G2 não diferiram entre si, respectivamente 31,92 e 30,29, sendo, porém classificados como intermediários.

Estes resultados demonstram que a planta teve melhor germinação em substratos com maior quantidade de partículas retentoras de umidade como húmus e argila dos três melhores substratos (G4, G3 e G2), ficando o pior rendimento para o substrato sem essas partículas, que é o caso do G1, somente areia.

Se considerarmos trabalhos recentes com germinação com uma das espécies florestais conhecida por ter dificuldade com a germinação como o Pau-Rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke), veremos que resultados segundo BARBOSA et al.(2007) mostram que 66% de germinação foi o melhor resultado em testes de germinação com o substrato composto por, areia(50%) + vermiculita (25%) + 25% de serragem, porém para essa espécie a germinação com dependência do teor de uma maior % de umidade não se comprova aqui, já que o tratamento de substrato somente com areia (100%) também foi elevada, ou seja foi de 55%. O que demonstra também um baixo rendimento das duas espécies em relação a técnica de estaquia. Isto se confirma quando comparamos resultados de técnicas de germinação em câmaras de BOD com rendimentos superiores a 95% (BARROS et al. – não publicados).

A reação da umidade com a germinação é bastante comum com algumas plantas, VIU et al.(2007) que estudou a espécie *Brosimum gaudichaudii*, planta arbórea adaptada a solos semelhantes a campinarana também encontrou melhores resultados em substratos com melhor retenção de água e mais poroso, característica a qual foi por ele indicado como fator de diferenciação na maior germinação das sementes de seu melhor tratamento T₄ (70%) com mais de 60% de matéria orgânica na mistura do substrato e seu segundo melhor tratamento(T₂) tendo 30% de matéria orgânica na mistura do substrato, sugerindo o autor uma relação direta entre a germinação e o teor de matéria

orgânica dos substratos. VARELA et al.(2005) trabalhando com a espécie amazônica *Acosmium nitens* também encontra essa relação entre a umidade e a maior taxa de germinação, o mesmo ocorreu com RESENDE et al.(2011) estudando a germinação de *C. viscidula* que encontrou o maior acúmulo de massa seca no tratamento do substrato com maior retenção de água.

CONCLUSÃO

O que nos faz concluir que há dependência para germinação da semente de *Picrolemma sprucei* em relação à umidade, ou seja a germinação se propicia de ambientes mais úmido. Isso se comprova na composição dos melhores tratamentos G₄ e G₃, que contêm partículas de argila e húmus, grandes retentoras de água. Possivelmente, outras técnicas e/ou outros substratos poderão demonstrar melhores resultados do que germinação nos substratos avaliados, como por exemplo, germinação em câmaras de BOD.

CAPÍTULO IV –Diversidade genética da caferana através de AFLP

INTRODUÇÃO

A caferana (*Picrolemma sprucei* Hook. f.) é uma planta pertencente à família simaroubacea, e comumente encontrada da Amazônia legal, abrangendo os Estados do Amazonas, Acre, Rondônia, etc e alguns países sul americanos desde o Peru até a Guiana Francesa, na cidade de Manaus a espécie é encontrada na Reserva Ducke (reserva do INPA) e no Campus da UFAM (Universidade Federal do Amazonas), no bairro do Aleixo, de onde foram recolhidas amostras para a realização desse trabalho.

Para a identificação da diversidade genética das três populações estudadas nesse trabalho (população da Reserva Ducke, população da ZF2, e uma população cultivada do INPA) foi utilizada a técnica de AFLP (Amplified Fragment Length polymorphism). A técnica foi desenvolvida por ZABEAUS e VOS, em 1993, e patenteada pela Keygene NV (Wageningen, The Netherlands). No AFLP, os polimorfismos genéticos são identificados no gel pela presença ou ausência de fragmentos de DNA após a digestão e amplificação do DNA genômico.

Técnica de AFLP combina especificidade, resolução e poder de amostragem da digestão com enzimas de restrição com velocidade e praticidade de detecção de polimorfismo via PCR (Polymerase Chain Reaction) (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). A técnica de AFLP consiste basicamente em quatro etapas, digestão do DNA genômico, ligação dos adaptadores, amplificação via PCR e por último a separação dos fragmentos amplificados pela eletroforese em gel de poliacrilamida. O AFLP apresenta vantagens comparativas, dentre elas não é necessário conhecimento prévio do genoma da

espécie a ser estudada; entre os marcadores disponíveis é o que fornece o maior número de fragmentos em uma única análise; maior reprodutibilidade em comparação ao RAPD e são altamente polimórficos.

A técnica de AFLP é demonstrada através de eletroferogramas e análises de dendrograma feitas através de índices de similaridades. Dentro das medidas de similaridade e dissimilaridade empregadas em marcadores dominantes, uma das principais é a de JACCARD.

Após esta análise, que é utilizada para verificar a formação de grupos de similaridade genética de indivíduo dentro de uma população ou de populações, fez-se a apresentação gráfica dos resultados num dendrograma (Apêndice I).

O objetivo deste trabalho foi estudar, mediante a aplicação da técnica de AFLP, a diversidade genética de três diferentes populações da espécie *P. sprucei* Hook, para compará-las entre si, já que uma das populações é a primeira população de caferana já cultivada e a qual foi submetida a cruzamentos endogâmicos.

MATERIAL E MÉTODOS

As coletas foram feitas em três populações, distante uma da outra em pelo menos 10 km (INPA, Reserva Ducke e ZF2).

A população do INPA é uma população cultivada (População “C”), que se encontrava nas adjacências da CPPN/INPA e a qual as sementes provieram da população P, oriunda das fazendas do INPA conhecida como ZF2. A segunda população estudada, denominada população “D”, está situada na Reserva Ducke, na região norte de Manaus. A terceira população estudada foi a população nativa “P”, que se encontra nas Reservas ZF2 do INPA, localizada no km 52 da AM 010.

Para as análises de diversidade genética deste trabalho foram coletados 101 indivíduos nas três populações previamente descritas: Reserva Ducke (n= 34), ZF2 (n=34) e população cultivada/INPA (n=33). É importante ressaltar que em todas as populações procurou-se coletar amostras de indivíduos que possuíam altura superior a 30 cm.

Para obtenção do DNA total de todas as amostras das três populações foi utilizado o protocolo de Plant-DNAzol (INVITROGEN), com 300mL do mesmo e 50 mg de material vegetal de cada indivíduo.

O DNA genômico extraído teve sua concentração e integridade determinados em gel de agarose 0,8% e TEB 1X. A quantificação do DNA extraído foi feita comparando-se este DNA com concentrações conhecidas de DNA do fago λ . O DNA padrão foi utilizado nas concentrações de 25, 50, 100 e 200 $\eta\text{g}/\mu\text{L}$.

Realizou-se a migração eletroforética em uma cuba horizontal contendo tampão TEB 5 X e corante Azul de bromofenol, para visualização do DNA. As amostras foram aplicadas no gel e a migração eletroforética foi realizada a voltagem de 100 V. Após aproximadamente 30 minutos de migração, o DNA foi observado em um transiluminador de luz ultravioleta, após submersão em solução de brometo de etídeo por 30 minutos.

Todos os indivíduos coletados nas três populações de *P. sprucei* Hook foram analisados geneticamente, utilizando-se o marcador molecular AFLP (VOS et al., 1995). Esse marcador se caracteriza por ser altamente polimórfico, permitindo a diferenciação dos indivíduos de uma mesma espécie. Este ainda apresenta uma alta taxa de resolução, sendo altamente reprodutível sem a necessidade de haver o conhecimento prévio sobre o genoma da espécie a ser estudada. Entretanto, trata-se de um marcador dominante e o cálculo da frequência do genótipo é feito a partir dos fenótipos (ausência de banda). Sete combinações iniciador/enzima foram utilizadas para análises: ADAPTADORES - *EcoRI* – Forward CTC GTA GAC TGC GTA CC; *EcoRI* Reverse AAT TGG TAC GCA GTC TAC *MseI* – Forward GAC GAT GAG TCC TGA G *MseI* Reverse TAC TCA GGA CTC AT. PRÉ-SELETIVA: *EcoRI* GAC TGC GTA CCA ATT CT *MseI* – GAT GAG TCC TGA GTA AC. SELETIVA: *EcoRI* (Fam) – GAC TGC GTA CCA ATT; *EcoRI* (Fam) - GAC TGC GTA CCA ATT CAG; *EcoRI* (Fam) - GAC TGC GTA CCA ATT CAT; *EcoRI* e (Fam) - GAC TGC GTA CCA ATT CTA e *EcoRI* (Fam) - GAC TGC GTA CCA ATT CTC.

A digestão foi feita com 30 µL de mix (0,5 µL de BSA-100X; 5 µL de OPA-10X; 0,5 µL da enzima *MseI* -5U; 0,5 µL *EcoRI*-10 U; complemento de 23,5 µL de água) + 20 µL de DNA (20 ng/20 µL) fazendo um volume final de 50 µL. Para realização da digestão colocou-se as amostras no termociclador VERITI 96 well Thermalcycler (Applied Biosystem) com as seguintes etapas: digestão de três horas a 37°C; inativação da

enzimas por 15 minutos a 70°C e hold a 4°C por tempo indeterminado, todas as etapas com apenas um ciclo.

Ao término da digestão, os fragmentos foram ligados a adaptadores *EcoRI* complementares aos sítios de corte. Para tal, preparou-se um MIX suficiente para 120 ligações.

Para fazer o estoque dos adaptadores, misturou-se 5,6 µL do adaptador forward 60 ng/µL, 4,8 µL do adaptador reverso (620 µg/µL); 6,0 µL de OPA; 103 µL de água milli-Q, fazendo um volume final de 120 µL suficiente para 120 reações. Para o preparo dos adaptadores foram utilizadas as seguintes etapas do programa: 65°C por 10 minutos, 37°C por 10 minutos e 25°C por minutos; estocando-se o MIX a 20°C. Para a ligação dos adaptadores usou-se o seguinte protocolo: misturou-se 6,7 µL de água milli-Q com 1µL do adaptador-MIX *EcoRI*; 1µL adaptador-MIX *MseI*; 1µL do tampão 10X buffer da ligase e 0,3 de T4 DNA Ligase (3U/µL). Fazendo um volume final de 10 µL, que foram adicionados em cada tudo contendo 50 µL do DNA digerido com as enzimas de restrição. As amostras foram incubadas a 23°C por 3 horas e estocadas a -20°C.

Logo após, foi feita uma pré-amplificação seletiva dos fragmentos previamente ligados a seus adaptadores. Para o volume final de 10 µL utilizou-se: 1,5 µL do DNA digerido e ligado a adaptadores; 0,5 µL do iniciador *EcoRI* (25ng/µL); 0,5µL do iniciador *MseI* + óligo seletivo C; 0,4 µL de dNTP (2,5mM); 1 µL do tampão 10X PCR (500 mM KCl, 100mM Tris-HCl pH 8,3) e 0,3 U da enzima taq DNA polimerase platinumplus (invitrogen®5U/µL). As reações de pré-amplificação seguiram as etapas: dois minutos de desnaturação a 94 °C com 26 ciclos; desnaturação também em 26 ciclos à 92°C por 60 segundos; anelamento em 26 ciclos à 56 °C por 60 minutos; extensão em 26 ciclos à 72

°C por 60 segundos; final da extensão em um ciclo à 72°C por mais cinco minutos. Após a pré-amplificação acrescentou-se 40µL de água Milli-Q a cada tubo, e armazenou-se a -20°C.

Para a amplificação usou-se um volume final de 20µL por amostra: 2,5µL de água milli-Q; 2 µL de 10X buffer; 1,2 µL de MgCl₂ (25 mM); 0,4 µL de DNTP (2,5Mm); 1 µL do primer *EcoRI* (25 ng/µL); 1,2 µL do primer *MseI* (25 ng/µL); 0,2 µL de Taq DNA polimerase Platinum Plus (5U/µL) e 1,5 µL de DNA pré-amplificado. Preparadas as amostras amplificou-se em termociclador Applied Biosystem: desnaturação inicial em um ciclo a 94°C por 2 minutos; a desnaturação em 12 ciclos a 94°C por 30 segundos; um anelamento em 12 ciclos a 65°C a 30 segundos; uma extensão a 12 ciclos a 72°C por 1 minuto; 23 ciclos a 94°C por 30 segundos; 23 ciclos a 56°C por 30 segundos; 23 ciclos a 72°C por 60 segundos e uma extensão final de 1 ciclo a 72°C por 2 minutos e; um hold a 4°C por tempo indeterminado estocando-se a -20°C.

Para obtenção dos eletroferogramas das amostras, utilizou-se o seqüenciador automático MegaBace 1000 (GE-Healthcare) do Laboratório de Tecnologia do DNA (UFAM).

A eletroforese foi em gel de poliacrilamida a 6% o qual foi aplicado em uma cuba de poliacrilamida com placa do modelo FB-SEQ- 3545(Fisher Biotech), sendo o DNA marcado com nitrato de prata e revelado com carbonato de sódio 3%.

O estudo populacional foi realizado a partir dos dados obtidos com as combinações de iniciador/enzima em todos 101 indivíduos analisados em 443 bandas. As análises de diversidade foram feitas através do coeficiente de JACCARD:

$$S_j = \frac{a}{(a + b + c)}$$

Onde:

a= presença de banda em ambos indivíduos (11)

b = presença de banda em um indivíduo e ausência no outro (1 0)

c = ausência de banda em um indivíduo e presença no outro (0 1)

d= ausência de banda em ambos indivíduos (00).

Observa-se que a combinação (00) há ausência de banda, for 0 a estimativa do coeficiente S_j terá valor absoluto igual a zero (GOMES, 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os pares de primers utilizados na análise AFLP, para as três populações de *P. sprucei*, apresentaram dois grupos G1, abrangendo praticamente a população “D” e grupo G2, abrangendo as populações “C” e “P”, e revelaram um número relativamente grande de 443 bandas, que foram superior aos observados em alguns trabalhos realizados com o marcador AFLP com o mesmo intuito, como ao encontrado em *Azadirachta indica* (SINGH et al., 2002), *Pinus pinaster* (MARIETTE et al., 2001), *Hevea* spp. (LESPINASSE et al., 2000) e *Moringa oleifera* (MULUVI et al., 1999), que revelaram sempre um número menor que 300 bandas. Também do mesmo modo FREITAS et al.(2005) com *M. urundeuva*, revelaram apenas 137, o mesmo apresentado por SANTOS et al.(2008) trabalhando com *Spondias tuberosa* que também trabalhou com apenas 141 bandas.

PAIVA (1998) já identificava uma grande variabilidade genética dentro de populações de plantas em regiões tropicais. Estudos intrapopulacionais poderão proporcionar melhores expectativas para a espécie, em relação a este tipo de marcador molecular, sendo que altos níveis de polimorfismo pode ser esperada. SOUZA (2006) estudando *Araucaria angustifolia* verificou que a maior parte da diversidade genética está presente dentro de cada população

No momento, estima-se que os níveis de variabilidade genética da *Picrolemma sprucei* com as três populações aqui estudadas se encontraram superiores a algumas espécies, porém observando-se estudos relacionados, percebe-se que a variabilidade entre populações costuma ser alto em outras espécies como no estudo de variabilidade com umbuzeiro com esse marcador, que segundo SANTOS et al. (2008) revela alta

variabilidade entre populações, ao contrário das populações de *Picrolemma sprucei* aqui estudadas que apresentou apenas a população D como diferente.

A porcentagem de confiabilidade da topologia da árvore mostra que em mil árvores testadas 89% confirmaram que as plantas c11 e c12 são as mais próximas com 88% de similaridade de acordo com a matriz de similaridade (Apêndice I).

De acordo com o mesmo raciocínio as plantas c13 e c14, com 89% de confiabilidade apresentaram uma similaridade de 81% (Apêndice I).

Já com uma confiabilidade de 90% as plantas c10 e c11 atingiram uma similaridade de 85% (Apêndice I).

As plantas D15 e D16 com a confiabilidade de 81% possui uma similaridade de 18% apenas (Apêndice I).

As plantas P22 e P23 apresentam confiabilidade de 95% e possui similaridade de 30% (Apêndice I).

As plantas P30 com o grupo (P1 e P33) mostram uma similaridade de 38%.com confiabilidade de 80% (Apêndice I).

CONCLUSÃO

Os marcadores AFLP foram eficientes para caracterizar a variabilidade genética em populações de *P. sprucei*. A maior proporção da variabilidade nessa espécie encontra-se distribuída dentro das populações. Foi detectada variabilidade genética entre as populações regionais, havendo subdivisão das populações em função do local de ocorrência.

A amplitude de variabilidade dentro da população “C” foi a maior, em torno de 63%, seguido da população “D” com 27% enquanto que na população “P” ficou com a menor amplitude, de 25%. O que implica na população “C” ter tanto indivíduos muito similares, como indivíduos, bastante dissimilares. Enquanto as outras duas populações possuem mais indivíduos dissimilares.

Esse resultado mostra que a variabilidade genética da espécie é bastante alta. A população C teve a maior amplitude de variabilidade. Na população D a similaridade foi apenas em torno de 30%, ou seja, tiveram variabilidade em torno de 70%, nesta população, os mais diferentes foram os indivíduos D15 e D16. A população P teve também forte variabilidade genética, porém misturou-se geneticamente com a população C.

REFERÊNCIAS

ALTMAN, R.F.A., Identificação microquímica dos alcalóides do grupo cinchona. Boletim Técnico do Instituto Agrônômico do Norte, nº 31, p. 9-66, 1956.

BARBOSA, A.P. et al. Plantios de Pau-Rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) e produção de óleo a partir de mudas plantadas. Manaus: INPA, 2007.

BARROS, F.C.F.; POHLIT, A.M.; CHAVES, F.C.M. Crescimento de *Caferana* (*Picrolemma sprucei* Hook.f.) em Função do Tamanho da Muda. In: **XVIII Simpósio de Plantas Medicinais**. Manaus: INPA&FDB, 2006, p. 245.

BARROS, F.C.F.; COSTA, S.S. Germination of *Picrolemma sprucei* in a green house environment. Tamilnadu/India: Journal of Research in Biology Team, 2011. Submetido.

FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias primas vegetais. IN: SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira et al (Org). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 1999. 822p

FAUDER, T.; MORETTI, C.; POLONSKY, J. In vitro and in vivo assessment of the antimalarial activity of sergeolide. 1985, *Planta Médica*, p.20-23.

FERREIRA, M.A. & GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2ªed. 220 pp. Brasília: EMBRAPA-Cenargem, 1999.

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C.L.; SOUZA, I.M.de O.; RODRIGUES, R.A. F. Plantas medicinais como fonte de recursos terapêutico: Um modelo multidisciplinar. São Paulo: MULTICIÊNCIA/UNICAMP, 2006.

FREITAS, M.L.M.; AUKAR, A.P.A; SEBBEN, A.M.; MORAES, M.L.T.; LEMOS, E.G.M. Variabilidade genética intrapopulacional em *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. pormarcador AFLP. In: SCIENTIA FORESTALIS, n. 68, p.21-28, ago. 2005.

GOMES, Frederico Pimentel. **Curso de Estatística Experimental**. 14. ed. Piracicaba: Degaspari, 2000

GUO, Z., VANGAPANDU, S., SINDELAR, R.W., WALKER, L.A., SINDELAR, R.D. Biologically active quassinoids and their chemistry: Potential leads for drug design. *Current Medicinal Chemistry*, v. 12, p. 173-190, 2005.

KUPCHAN, S.M.; BRITTON, R.W.; LACADIE, J.A.; ZIEGLER, M.F.; SIGEL, C.W. The isolation and structural elucidation of bruceantin and bruceantanol, new potent antileukemic quassinoids from *Brucea antidysenterica*. *J. Org. Chem.*, v. 40 (5), p. 648-654, 1975.

LE COINTE, P. Árvores e plantas úteis (Amazônia brasileira III). Companhia Editora Nacional: São Paulo – SP, 1947.

LESPINASSE, D; RODIER-GOUD, M.; GRIVET, L. A saturated genetic linkage map of rubber tree (*Havea spp.*) based on RFLP, AFLP, microsatellite, and isozyme markers.

Theoretical Applied Genetic. Berlin, v.100, p.127-128, 2000.

MARIETTE S.; CHAGNÉ, D.; LÉZIER, C.; PASTUSZKA, P.; RAFFIN, A.; PLOMION, C.; KREMMER, A.. Genetic diversity within among *Pinus pinaster* population: comparison between AFLP and microsatellite markers. **Heredity**, London, v.86, p.469-479, 2001.

MINITAB Realease 14.1. 2003.

MORETTI, C.; POLONSKY, J.; VUILHORGNE, M.; PRANGE, T. Isolation and structure of sergiolide, a potent cytotoxic quassinoid from *Picrolemma pseudocoffea*. Gif-sur-Yvette- France, 1982, Vol. 23, N°. 6. p 647-650.

MORS, W.B.; Rizzini, C.T.; Pereira, N.A.; Defilipps, R.A. Medicinal plants of Brazil. Editora Reference Publications, p. 314, 2000.

MULUVI, G.M. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of genetic variation in *Moringa oleifera* Lam. **Molecular Ecology**, Oxford, v.8, p.463, 1999.

PAIVA, J.R. Melhoramento genético de espécies agroindustriais na Amazônia: estratégias e novas abordagens. Brasília: EMBRAPA-SPI; Fortaleza: EMBRAPA-CNPAT, 1998.

PESCADOR, R.; VOLTONI, A.C.; GIRARDI, C.G.; ROSA, F.A.F da. Cuttings of Pariparoba using indolbutiric acid in two substrates, In: Scientia agrarian, v.8, n.4. Curitiba: Scientia Agraria editor, 2007.

POLONSKY, J.; BHATNAGAR, S. 15 Deacetylsergeolide, a potent antileukemic quassinoid from *Picrolemma pseudocoffea*. In: **journal of Natural Products**. Gif-sur-Yvette – France, 1984, Vol. 47, N°. 6. pp. 994-996.

RESENDE, S.V.; CREPALDI, I.C.; PELACANI, C.R.; BRITO, A.L. Influência da luz e substrato na germinação e desenvolvimento inicial de duas espécies de *Caliandra* Benth. (Mimosoideae – leguminosae) endêmicas da chapada Diamantina da Bahia. In: Revista Árvore, vol. 35, n. 1, p 107-117. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2011.

RIBEIRO, J.E.L. S.; HOPKINS, M.J.G.; VICENTINE, A.; SOTHERS, C.A.; COSTA, M.A.S.; BRITO, J.M.; SOUZA, M.A.; MARTINS, L.H.P; LOHMANN, L.G.; ASSUNÇÃO, P.A.C.L; PEREIRA, E.C.; SILVA, C.F.; MESQUITA, M.R.; PROCÓPIO, L.C. *Flora da Reserva Ducke: Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central*. Manaus: INPA/DFID, 1999, p. 547-549.

ROSA, S.M.F.L.; VERRA, S.F. & MAIA, C.M.M., [199-]. **Introdução a Fitoterapia**. Rio de Janeiro: Prefeitura Municipal de Duque de Caxias. 21p., 2000.

SANTOS, C.A.F.; RODRIGUES, M.A.; ZUCCHI, M.I. Variabilidade genética do umbuzeiro no semi-árido brasileiro, por meio de marcadores AFLP. In: Pesquisa Agropecuária Brasileira, v43, n.8-ago.Brasília, 2008.

SARAIVA, R.C.G; BARRETO, A.S.; SIANI, J.L.P.; FERREIRA, R.B.A.; NUNOMURA, S.M.; PHOLIT, A.M. Anatomia Foliar e Caulinar de *Picrolemma sprucei* Hook (Simaroubaceae). *ACTA AMAZONIA*, 2004, 33(2): 213-220.

SILVA, E.C.C. Isolamento, transformação química e ativiade biológica in vitro dos quassinóides neosergeolida e isobruceína B. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Amazonas (UFAM). Manaus, Amazonas. 191 pp, 2006.

SINGH et al. 2002. Gene expression correlates of clinical prostate cancer behavior. *Cancer Cell*1:203–209.

SODRÉ, G.A. Substrato e estaquia na produção de mudas de cacaueiro. Tese de doutorado, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP). Jaboticabal, São Paulo. 93pp, 2007.

SOUSA de, M.I.F. Análise da diversidade genética de populações de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze utilizando marcador AFLP. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 11pp, 2006.

THOMAS, W.W. The american genera of Simaroubaceae and their distribution. **ACTA Botanica Brasilica**, 4(1): 11-18, 1990.

VARELA, V.P.; COSTA, S. de S. RAMOS, M.B.P. Influência da temperatura e do substrato na germinação de sementes de *Acosmium nitens* (Vog.) Yakolev. **ACTA AMAZÔNICA**, vol. 35(1)Manaus: Editora do INPA, 2005.

VIEIRA, I.J.C. Uma contribuição à química da família Simaroubaceae. Tese de doutorado, Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR). São Carlos, São Paulo, 318 pp, 1995.

VIGNERON M.; DEPARIS X.; DEHARO E.; BOURDY G. Antimalarial remedies in French Guiana: a knowledge attitudes and practices study. *J Ethnopharmacol* 98: 351-360, 2005.

VIU, A.F.M; COSTA da, E.A.; VIU, M.A. de O; SILVA, J.F; CAMPOS, L.Z.D.O. Avaliação do efeito de diferentes substratos sobre a germinação e o crescimento de plântulas de *Brosimum gaudichaudii*. Revista Brasileira de Biociência, v.5 supl.2. Porto Alegre: Universidade de Goiás, 2007.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KULPER, M.; ZABEU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, Eynsham, v.23, n.21, p.4.407-4.414, 1995.

ZABEAU, M.; VOS, P. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. European Patent Application.EP 0534858, 1993.

APÊNDICE

