

INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE CERA EPICUTICULAR FOLIAR NA INTERAÇÃO COM GALHAS EM ESPÉCIES DE CROTON L. (EUPHORBIACEAE)

Luiz Oliveira da Costa Filho¹; Maíra Honorato de Moura Silva²; Antônio Fernando Morais Oliveira³.

¹Universidade Católica de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas e Saúde (locfilho@gmail.com); ²Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Botânica, Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Laboratório de Ecologia Aplicada e Fitoquímica. (mairamhms@hotmail.com); ³Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Botânica, Laboratório de Ecologia Aplicada e Fitoquímica. (afmoliveira@gmail.com).

INTRODUÇÃO

As interações entre plantas e animais representam uma grande e diversificada área da ecologia. A herbivoria constitui uma das mais importantes interações que determinam a regulação de espécies vegetais e o padrão de distribuição destas. Os herbívoros diferem em suas necessidades de energia e nutrientes e podem apresentar preferências alimentares variadas de acordo com os valores nutricionais e de produtividade da planta hospedeira.

Dentre os variados tipos de herbivoria destacam-se à formação de galhas ou cecídeas, que são hipertrofias e hiperplasias do tecido vegetal em resposta aos ataques provocados por diversos agentes indutores como vírus, bactérias, fungos, nematóides, ácaros e insetos (MANI, 1964).

Um dos componentes vegetais que pode influenciar na mediação da interação inseto-plantas é a cutícula, formada pela cutina e recoberta pela cera epicuticular, camada mais externa da cutícula vegetal composta por uma mistura complexa de substâncias alifáticas de cadeias longas (*n*-alcanos, ácidos graxos, álcoois, cetonas, aldeídos e ésteres) e de estruturas cíclicas (triterpenóides e flavonóides) (SHEPHERD *et al.*, 1995).

Devido ao seu posicionamento, as ceras epicuticulares constituem a primeira superfície de contato entre a planta e o ambiente, funcionando como barreira física e química de interface entre a planta e o meio ambiente (LICHSTON; GODOY, 2006), podendo inibir ou estimular a oviposição e a alimentação de insetos herbívoros ou mesmo afetar a adesão e a locomoção desses (EIGENBRODE, 1996; EIGENBRODE; JETTER, 2002).

A importância econômica e ecológica das ceras epicuticulares na interação com insetos herbívoros em espécies da Caatinga despertou o interesse em estudar a composição química de ceras epicuticulares foliares de sete espécies de *Croton* (*Croton adamantinus*, *C. argyrophyllus*, *C. blanchetianus*, *C. glandulosus*, *C. grewoides*, *C. heliotropiifolius*, *C. urticifolius*) de região semiárida, utilizando análises multivariadas para verificar quais *n*-alcanos e ácidos graxos de cera epicuticular foliares diferenciam as sete espécies de *Croton* L. que apresentam distintos graus de infestação por galhas.

METODOLOGIA

* Extração da cera epicuticular

As folhas íntegras e maduras de *Croton adamantinus*, *C. argyrophyllus* e *C. blanchetianus*, *C. glandulosus*, *C. grewoides*, *C. heliotropiifolius* e *C. urticifolius* foram selecionadas e colocadas em estufa com ventilação forçada a 50°C, por cerca de 72h, ou até sua total desidratação. No

Laboratório de Ecologia Aplicada e Fitoquímica (Departamento de Botânica, UFPE), o material desidratado foi submetido aos procedimentos de extração da cera. Dez gramas de folhas íntegras e secas de cada espécie foram submetidas a duas extrações consecutivas com imersão em diclorometano por 30 segundos com agitação manual constante. Os extratos obtidos foram filtrados, concentrados sob pressão reduzida em evaporador rotatório e submetido às técnicas analíticas de fracionamento através da Cromatografia em Camada Delgada do tipo preparativa.

* Análise da cera epicuticular

Para o processo cromatográfico em camada delgada foi utilizado como fase móvel o sistema *n*-hexano:diclorometano (73:27 v/v) e gel de sílica G 60 impregnada com fluoresceína sódica 0,02% como adsorvente. As placas cromatográficas foram colocadas previamente em estufa a 100°C por 30 minutos, para a ativação. Cromatografias em Camada Delgada do tipo preparativa foram realizadas com todos os extratos e em seguida as placas foram visualizadas sob luz UV de ondas longas e medidos os valores de *R_f* de cada fração correspondentes às respectivas classes de compostos contidas na cera para posterior identificação com base na literatura.

Das classes de compostos presentes nas ceras das espécies em estudo os *n*-alcanos e os ácidos graxos foram isolados e, posteriormente, analisados através de Cromatografia Gasosa (Cromatógrafo Shimadzu 17A), tendo hélio como gás de arraste com fluxo constante de 1cm³/min. Foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida DB-5 (5%-fenil-metilpolisiloxano) e um detector de ionização em chama (FID). A temperatura inicial foi programada em 150°C/3 min, elevando-se 10°C/min até 280°C, permanecendo nesta temperatura por mais 15 min. A temperatura do injetor e do detector foi de 300°C. Os *n*-alcanos e os ácidos graxos foram identificados a partir do tempo de retenção comparando-se com os de amostras autênticas (padrão Fluka e Supelco, respectivamente) e confirmados por dados de espectrometria de massas quando necessário. Os ácidos graxos foram previamente derivados com trifluoreto de boro (BF₃) antes das análises cromatográficas.

* Análise Multivariada

Foram realizadas duas análises multivariadas com o programa Fitopac 2.1 software. A primeira buscou verificar quais classes de compostos químicos da cera epicuticular estavam relacionadas com a presença e intensidade de galhas nas espécies de *Croton* L. e a segunda, relacionar quais os *n*-alcanos e os ácidos graxos que influenciam na formação de galhas.

Primeiramente foi realizada uma análise utilizando uma matriz com sete amostras (espécies de *Croton* L.) e quatro descritores (ácidos graxos, alcanos, álcool e galhas) (Tabela 1), em seguida outra análise foi realizada com uma matriz com as mesmas amostras e vinte e quatro descritores (*n*-alcanos, ácidos graxos e presença de galhas) (Tabela 2), onde a variável galha foi utilizada como marcadora a espécies de *Cróton* pouco galhadas e 2 espécies de *Cróton* muito galhadas.

Em seguida, foi verificada a presença de outliers, utilizando a matriz no Pcord4. Sendo considerados outliers as amostras com Cutoff>2.0.

A variável galha foi mascarada para as duas análises de agrupamento e calculada uma matriz de distância com o índice de Distância Euclidiana Simples e gerado um dendrograma com Média de grupo (UPGMA) como tipo de agrupamento, estabelecendo-se o coeficiente cofenético de cada dendrograma.

Após as análises de agrupamento, foi realizada DCA no Pcord4 como análise de ordenação para verificar o tamanho do gradiente apresentado entre as amostras das matrizes.

Com o resultado da DCA menor que 2 (dois) nas duas análises, foi possível observar a linearidade dos dados e analisar os dados de ordenação por PCA (Análise de Componente

Principal).

Para a PCA foram utilizadas as matrizes no Fitopac2.1 software, onde foram observados os índices de correlação das variáveis com os eixos, o percentual do valor acumulado nos três primeiros eixos e o percentual de variação esperada, o que corresponde ao modelo de vara quebrada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com as análises das matrizes, as amostras não apresentaram outliers, embora na análise de outlier da matriz da tabela 1 uma amostra tenha apresentado $Cutoff > 2.0$, mas foi considerado para as análises de agrupamento e de ordenação, uma vez que não ultrapassou muito o valor de $Cutoff$, apresentando *Croton glandulosus* $Cutoff = 2.18503$.

A análise de agrupamento utilizando a Distância Euclidiana Simples para média de grupo UPGMA, apresentou correlação cofenética de 0,9046, gerando um dendrograma no qual informa a formação de dois grandes grupos: um agrupando *C. adamantinus*, *C. blanchetianus* e *C. heliotropiifolius* e o segundo, agrupando *C. argyrophyllus* e *C. urticifolius* (Fig. 1). Foi possível observar que *C. argyrophyllus* e *C. urticifolius* são as amostras com maior similaridade, apresentando $+px=8,0$ e *C. glandulosus* como sendo a amostra com maior distância do restante das amostras, com similaridade $+dx=56,0$ de Distância Euclidiana Simples.

Após o dendrograma ser gerado pela média de grupo UPGMA, foi possível colorir a variável galha, mostrando a influência dessa variável na formação dos grupos e semelhança do *C. adamantinus* e *C. blanchetianus*, sendo esta variável também importante para diferenciação do *C. argyrophyllus* do *C. urticifolius* no segundo grupo.

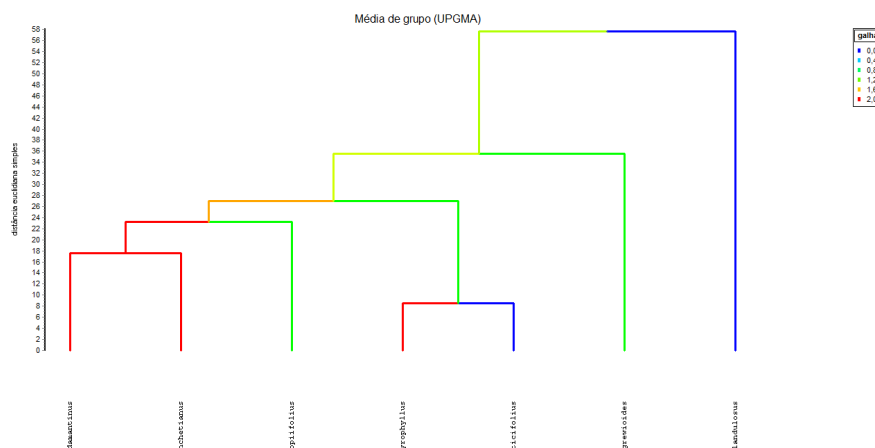


Figura 1: Dendrograma de Média do grupo (UPGMA), apresentando a similaridade entre as amostras de acordo com o índice de Distância Euclidiana Simples, relacionando a composição das classes químicas de cera epicuticular com a intensidade de galhas presentes em espécies de *Croton* L. (Euphorbiaceae).

Foi possível verificar na matriz triangular de distância a semelhança entre as amostras, observando que *C. urticifolius* apresentou a maior semelhança com *C. argyrophyllus* dentre as amostras.

Foi realizada uma DCA no Pcord4 para verificar o tamanho do gradiente entre as amostras para as duas tabelas. Com resultado da DCA, foi obtido um gradiente de 1,022 e 1,622, respectivamente, ou seja, com tamanho das amostras inferior a 2 (dois), implicando assim que os dados são lineares, dessa forma a PCA constitui a análises de ordenação mais adequada (Fig. 2 e 3).

Figura 3: Gráfico ilustrando o resultado da Análise de Componente Principal (PCA) entre a intensidade de galhas com os *n*-alcanos e ácidos graxos presente nas ceras epicuticulares das espécies de *Croton* L. (Euphorbiaceae), onde o vermelho significa elevada intensidade de galhas; o verde, baixa intensidade de galhas e o azul, ausências de galhas.

TABELA 1: Matriz de análise com amostras e descritores utilizada na análise multivariada no programa Fitopac2.

	ácidos graxos	álcool	alcanos	galha
<i>Croton adamantinus</i>	23,44	25,78	15,63	2
<i>Croton argyrophyllus</i>	37,87	3,7	11,11	2
<i>Croton blanchetianus</i>	18,86	9,43	11,32	2
<i>Croton glandulosus</i>	6,06	3,03	66,66	0
<i>Croton grewioides</i>	21,43	42,85	21,43	1
<i>Croton heliotropiifolius</i>	12	4	28	1
<i>Croton urticifolius</i>	43,14	9,8	13,72	0

TABELA 2: Matriz de análise com amostras e descritores utilizada na análise multivariada no programa Fitopac2.

	Galhas	C21	C22	C23	C24	C25	C26	C27	C28	C29	C30	C31	C32	C33	C16:0	C17:0	C17:1	C18:0	C18:1	C18:2	C20:0	C22:0	C24:0	C24:1
<i>C.ada</i>	2	0	0	0	3,15	3,51	9,23	13,86	0	40,06	0	26,38	0	0	13,69	0	0	17,24	4,19	0	3,35	0	0	0
<i>C.arg</i>	2	0	0	0	0	5,44	0	14,61	0	43,43	0	25,8	0	0	15,88	0	0	15,52	2,5	0	9,78	3,69	0	5,23
<i>C.bla</i>																								
<i>n</i>	2	0	0	1,53	1,98	2,77	1,71	11,13	1,68	42,61	0	13,7	0	0	28,76	0	0	38,38	0	0	0	0	0	0
<i>C.gla</i>																								
<i>n</i>	0	0	0	1,97	0	10	1,82	40,21	1,74	21,99	0	8,08	0	0	9,55	5,11	0	4,02	5,64	0	2,73	1,83	3,27	0
<i>C.gre</i>	1	0	0	1,18	1,53	3,12	2,15	13,68	6,11	45,66	1,79	18,24	0	0	14,16	0	3,16	13,24	10,43	6,03	3,72	0	0	5,7
<i>C.heli</i>	1	0,68	1,11	1,4	1,47	3,33	1,52	4,26	1,58	23,51	3,39	35,94	1,83	5,99	43,01	0	0	56,98	0	0	0	0	0	0
<i>C.urt</i>	0	2,67	0	0	0	3,52	0	5,56	0	21,86	0	24,32	0	0	11,7	0	0	10,02	0	0	0	0	0	11,89

(83) 3322.3222

contato@conidis.com.br

www.conidis.com.br

CONCLUSÕES

Foi possível verificar, por meio da análise multivariada utilizada nas análises, que há uma semelhança química entre as espécies de *Croton* que apresentam elevada quantidade de galhas, com exceção do *C. urticifolius* que assemelha-se e agrupa-se quimicamente com estas espécies de *Croton*.

Os álcoois foram responsáveis por explicar a maior relação da baixa intensidade de galhas em *C. grewoides*, embora a presença do C29, do C17:1 e do C18:2 também tiveram forte influência sobre a explicação do padrão de formação de galhas para esta espécie; enquanto os alcanos foi a variável que melhor explicou a ausência de galhas em *C. glandulosus*, dos quais o C25 e o C27 foram os alcanos que teve uma maior influência sobre esse padrão.

A baixa intensidade de galhas observada em *C. heliotropiifolius* pode ser explicada principalmente pela presença dos alcanos C22, C32 e C33 e dos ácidos graxos C16:0 e C18:0.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- EIGENBRODE, S.D. **Plant surface and insect behaviour. In: Plant cuticles: an integrated functional approach.** Kerstiens, G. (ed.). Bios Scientific Publishers, Lancaster, p. 201-221. 1996.
- EIGENBRODE, S.D., JETTER, R. Attachment to Plant Surface Waxes by an Insect Predator. **Integrative and Comparative Biology** 42: 1091-1099. 2002.
- LICHSTON, J. E.; GODOY, S. A. P. Morfologia e teor de cera de folhas de café Após aplicação de fungicida. **Pesq. agropec. bras.** Brasília, v.41, n.6, p.919-926, 2006.
- MANI, M.S. 1964. *Ecology of plant galls.* W. Junk. The Hague. Netherlands. 434p.
- SHEPHERD, T., ROBERTSON, G. W., GRIFFITHS, D. W., BIRCH, A. N. E., and DUNCAN, G. 1995. Effects of environment on the composition of epicuticular wax from kale and swede. **Phytochemistry** 40:407Y417.