



**REDE DE BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA DA AMAZÔNIA LEGAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO PPG-BIONORTE**

**Investigação de técnicas de biotecnologia vegetal na produção de calos *in vitro* como sistema para obtenção de metabólitos secundários e dos perfis metabólicos dos frutos de *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz (FABACEAE).**

SEIDEL FERREIRA DOS SANTOS

BELÉM  
2018

**SEIDEL FERREIRA DOS SANTOS**

**Investigação de técnicas de biotecnologia vegetal na produção de calos *in vitro* como sistema para obtenção de metabólitos secundários e dos perfis metabólicos dos frutos de *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz (FABACEAE).**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Norte de Biotecnologia, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia

Orientador: Dr. Alberdan Silva Santos

BELÉM

2018


SEIDEL FERREIRA DOS SANTOS

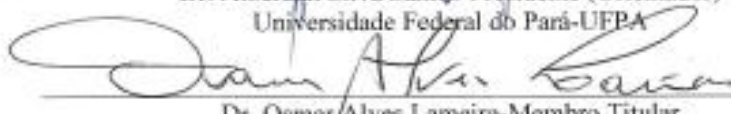
**Investigação de técnicas de biotecnologia vegetal na produção de calos *in vitro* como sistema para obtenção de metabólitos secundários e dos perfis metabólicos dos frutos de *Libidibia ferrea* (Mart. Ex Tul.) L.P. Queiroz (FABACEAE).**

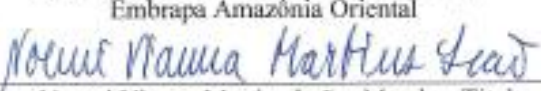
Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Norte de Biotecnologia, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia

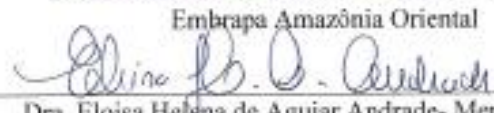
Aprovado:

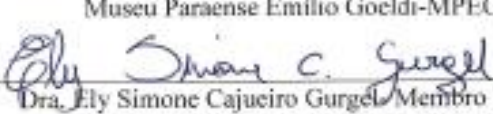
BANCA EXAMINADORA

  
Dr. Alberdan Silva Santos-Presidente (Orientador)  
Universidade Federal do Pará-UFPA

  
Dr. Osmar Alves Lameira-Membro Titular  
Embrapa Amazônia Oriental

  
Dra. Noemi Vianna Martins Leão- Membro Titular  
Embrapa Amazônia Oriental

  
Dra. Eloisa Helena de Aguiar Andrade- Membro Titular  
Museu Paraense Emilio Goeldi-MPEG

  
Dra. Ely Simone Cajueiro Gurgel- Membro Titular  
Museu Paraense Emilio Goeldi-MPEG

Belém

2018

Santos, Seidel Ferreira dos

Investigação de técnicas de biotecnologia vegetal na produção de calos in vitro como sistema para obtenção de metabólitos secundários e dos perfis metabólicos dos frutos de *Libidibia férrea* (Mart ex Tul) L. P. Queiroz (FABACEAE). / Seidel Ferreira dos Santos; Orientação de Alberdan Silva Santos – Belém, 2018.

143 f.: il.

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte, com área de concentração em Biotecnologia da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

1. Biotecnologia. 2. Biometria. 3. Leguminosas. 4. Fabaceae. I. Santos, Alberdan Silva, Orient. II. Universidade Federal do Pará. III. Título.

CDD 660.6

## Dedicatória

*Dedico este trabalho aos meus pais (José e Joaquina), por todo amor dedicado a mim ao longo de toda minha vida.*

*“Dedico à Dra. Raimunda Vilhena Potiguara (in memoriam), grande amiga e incentivadora que me ensinou a ter amor pelas plantas e pela Amazônia”.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus conforto e fortaleza que tornou possível a conclusão desta jornada.

Ao Prof. Dr. Alberdan Silva Santos, pela amizade e orientação ao longo desta trajetória, seus ensinamentos foram fundamentais para a realização desta obra.

Aos meus pais, irmãos e sobrinhos por todo apoio ao longo destes quatro anos, meu porto seguro no final de cada jornada.

À Universidade Federal do Pará e ao Museu Paraense Emílio Goeldi pela oportunidade de realizar este curso.

A Universidade do Estado do Pará pelo apoio e liberação para cursar estudos de pós-graduação.

Aos amigos do Labisisbio/UFPa, Ivoneide Menezes, Rosana Corpes, Ricardo Alexandre, Rubens Gobira, Patrícia Suelene, Edinaldo Silva, André Ramos, Jaisielle França, Kyouk Portilho, Júlio Santos e Karen Albuquerque.

Um agradecimento aos amigos do Museu Paraense Emílio Goeldi, Alba Lins, Lourdes Ruivo, Léa Carreira, Ivone Bermegui e Ely Simone Gurgel.

Aos amigos do Laboratório de Sementes Florestais da Embrapa, Elizabeth Shimizu, Noemi Vianna Leão e Vitor Campos.

Aos amigos especiais Erison Rodrigues, Rosecélia Moreira e Nilda Santos pela amizade incondicional.

A todas as pessoas que de uma forma ou outra contribuíram para a finalização desta obra.

Obrigado!

## Epígrafe

*A Amazônia não nasce direta e limpidamente brasileira. Começa por ser principalmente indígena nativa. Aos poucos se revela portuguesa, colonial. Em seguida afirma-se cabana, revolucionária. Depois é definida como brasileira e nacional. Situa-se no mapa como imensa geografia e surpreendente história. Mas continuará sendo simultaneamente indígena, portuguesa cabana e brasileira; assim como um momento da sociedade mundial. (LANNI, 1995).*

## SUMÁRIO

RESUMO .....	12
ABSTRACT.....	13
1 - INTRODUÇÃO .....	14
Hipótese.....	15
Objetivos .....	15
Objetivo Geral .....	15
Objetivos Específicos.....	15
Contextualização e apresentação dos capítulos.....	15
2 - REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
2.1 - Aspectos botânicos de <i>Libidibia ferrea</i> (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz. ....	17
2.2 - Aspectos etnofarmacológicos de <i>Libidibia ferrea</i> (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz .....	19
2.3 - Metabólitos secundários ou metabólitos especiais.....	24
2.4 -Cultivo in vitro e a produção de células vegetais para acúmulo de metabólitos.....	28
3 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30
<i>CAPÍTULO I-</i> Aspectos botânicos e caracterização morfológica de <i>Libidibia ferrea</i> (Mart. Ex Tul.) L.P. Queiroz.....	35
1 - INTRODUÇÃO .....	36
2 - MATERIAL E MÉTODOS .....	39
3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	41
3.1 - Aspectos da morfologia de sementes e frutos de <i>Libidibia ferrea</i> (Mart. Ex Tul.) L.P. Queiroz.....	41
3.2 - Aspectos biométricos de <i>Libidibia ferrea</i> (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz.....	45
4 - CONCLUSÃO .....	55
5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
<i>CAPÍTULO II-</i> Análise da distribuição de substâncias fenólicas e localização <i>in situ</i> em plântulas de <i>Libidibia ferrea</i> (M. Ex Tul.) L.P. Queiroz (Leguminosae-Caesalpinioideae).....	61

RESUMO .....	62
ABSTRACT.....	63
1 - INTRODUÇÃO .....	64
2 - MATERIAL E MÉTODOS .....	66
2.1 - Coleta do material botânico .....	66
2.2 - Obtenção de plântulas e extratos.....	67
2.3 - Obtenção do perfil químico do extrato hidroalcolico de folíolos e raízes de plântulas de <i>Libidibia ferrea</i> (Mart. Ex Tul.) L.P. Queiroz.....	67
2.4 - Hidrólise e extração dos compostos fenólicos .....	68
2.5 - Método de derivatização .....	68
2.6 - Análise de compostos fenólicos por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa (CG-EM). .....	68
2.7 - Caracterização histoquímica e identificação de compostos fenólicos .....	69
3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	70
3.1 - Perfil químico do extrato hidroalcolico de folíolos e raízes de plântulas de <i>Libidibia ferrea</i> (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa (CG-EM).....	70
3.2 - Histoquímica e identificação de compostos fenólicos .....	77
4 - CONCLUSÃO .....	82
5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	83
<i>CAPÍTULO III- Desenvolvimento de Calogênese e estudo do perfil metabólico de Libidibia ferrea</i> (Mart. Ex Tul.) L.P. Queiroz (Leguminosae-Caesalpinioideae) .....	88
RESUMO .....	89
ABSTRACT.....	90
1 - INTRODUÇÃO .....	91
2 - MATERIAL E MÉTODOS .....	96
2.1 - Material vegetal .....	96
2.2 - Assepsia e desinfecção das sementes.....	96
2.3 - Germinação de sementes e estabelecimento de plantas axênicas .....	96

2.4 - Indução e morfogênese de calos de <i>Libidibia ferrea</i> (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz em diferentes condições de cultura. ....	97
2.5 - Avaliação da curva de crescimento e produção de biomassa e análise de compostos fenólicos. ....	97
3-RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	98
3.1-Indução e produção de calos .....	98
3.2-Characterização estrutural de calos.....	102
3.4 - Produção de biomassa, análise de compostos fenólicos e curva de crescimento.....	104
4 - CONCLUSÃO .....	108
5 - REFERÊNCIAS BIBLOGRÁFICAS .....	109
<i>CAPÍTULO IV-</i> Perfil metabólico e avaliação das atividades biológicas de frutos de <i>Libidibia ferrea</i> (Mart. Ex Tul.) L.P. Queiroz (FABACEAE) .....	115
1 - INTRODUÇÃO .....	116
2 - MATERIAL E MÉTODOS .....	121
2.1 - Coleta do material botânico e obtenção de extratos.....	121
2.2 - Análise do perfil fenólico dos frutos (pericarpo) por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA). ....	122
2.3 - Avaliação do perfil químico do extrato hidroalcolico de frutos (pericarpo) de <i>Libidibia ferrea</i> (Mart. Ex Tul.) L.P. Queiroz por CG-EM.....	122
2.4 - Hidrólise e extração dos compostos fenólicos .....	122
2.5 - Método de derivatização .....	123
2.6 - Análise de compostos fenólicos por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa (CG-EM). ....	123
2.7 - Avaliação do processo de cicatrização em feridas limpas induzidas cirurgicamente ...	123
3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	126
3.1 - Perfil do extrato hidroalcolico dos frutos (pericarpo) por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA). ....	126
3.2 - Perfil dos compostos fenólicos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas-CG/EM. ....	127
3.3 - Avaliação do processo de cicatrização em feridas limpas induzidas cirurgicamente ...	130

4 - CONCLUSÃO .....	133
5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	134

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### INTRODUÇÃO

Figura 01- <i>Libidibia ferrea</i> (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz. A e B- Aspecto geral da planta no período de floração, detalhe do caule; C e D- Aspecto geral de frutos e sementes; E- Mapa de distribuição e ocorrência de <i>L. ferrea</i> . ....	18
Quadro 01- Principais classes de compostos fenólicos de <i>Libidibia ferrea</i> (Mart. Ex Tul.) L.P. Queiroz, identificados em diferentes partes da planta. ....	21
Figura 02- Bens e serviços ecossistêmicos de <i>Libidibia ferrea</i> (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz, que justificam a inclusão da espécie em sistemas de produção. ....	23
Figura 03 - Detalhe do APG IV, evidenciando a presença do ácido gálico e ácido elágico no clado da ordem Fabales (Leguminosas).....	26

### CAPÍTULO 1

Figura 01 - <i>Libidibia ferrea</i> (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz. A e B- Aspecto geral da árvore; C- Detalhe do caule de <i>L. ferrea</i> ; D e E- Aspecto geral de botões florais e flores; F-Detalhe dos frutos. ....	38
Figura 02 - Mapa de tipologia climática da Amazônia .....	39
Figura 03- <i>Libidibia ferrea</i> (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz. A- Vista geral da morfologia dos frutos; B- Superfície do epicarpo em MEV (evidenciando cera epicuticular e estômatos), C e D-Tricomas na superfície do epicarpo e detalhe do tricoma glandular em MEV. ....	43
Figura 04 - <i>Libidibia ferrea</i> (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz. A-Detalhes da morfologia da semente (semente inteira, semente escarificada, semente em secção longitudinal), B- Vista geral dos tegumentos em MEV, C –Detalhe da camada de paliçada em MEV, D- Camada de paliçada após escarificação com lixa em MEV. ....	44
Figura 05 - Médias de Comprimento (A), Largura (B), Espessura (C), Massa Fresca (D) de frutos de diferentes procedências de <i>Libidibia ferrea</i> (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz. ....	48
Figura 06 - Médias de comprimento (A), espessura (B), largura (C), massa fresca (D) de sementes de diferentes procedências de <i>Libidibia ferrea</i> (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz. ....	49
Figura 07 - Gráficos dos escores das variáveis biométricas marcadoras das amostras de sementes de <i>Libidibia ferrea</i> (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz. ....	51

Figura 08-Dendrograma obtido a partir da análise hierárquica de cluster para amostras de 300 sementes de <i>Libidibia ferrea</i> (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz de três procedências (Pará, Amazonas e Maranhão). .....	52
Figura 09 - Gráficos dos escores das variáveis biométricas das amostras de 300 frutos de <i>Libidibia ferrea</i> (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz.....	53
Figura 10 - Dendrograma obtido a partir da análise hierárquica de cluster para 300 amostras de frutos de <i>Libidibia ferrea</i> (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz de três procedências (Pará, Amazonas e Maranhão). .....	54

## CAPÍTULO 2

Figura 01 - Mapa de tipologia climática da Amazônia .....	66
Figura 02 - Perfil cromatográfico em CG/EM do extrato hidroalcóolico de folíolos de <i>Libidibia ferrea</i> (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz, procedência do Amazonas. ....	70
Figura 03 - Perfil cromatográfico em CG/EM do extrato hidroalcóolico de folhas de <i>Libidibia ferrea</i> (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz procedência do Maranhão. ....	71
Figura 04 - Perfil cromatográfico em CG/EM do extrato hidroalcóolico de folhas de <i>Libidibia ferrea</i> (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz, procedência do Pará. ....	71
Figura 05 - Resultados positivos dos testes aplicados em <i>Libidibia ferrea</i> (Mart. Ex Tul.) L.P. Queiroz. <b>A-C.</b> tricomas glândulares foliolares; <b>D-G.</b> raízes. <b>A e E, (inset).</b> azul de toluidina, fenólicos não estruturais em tricomas (cabeça de seta) e raízes (seta); <b>B e F.</b> sulfato ferroso em formalina, fenólicos totais em tricomas (cabeça de seta) e raízes (seta); <b>D.</b> vanilina clorídrica, taninos condensados em tricomas (cabeça de seta); <b>C e G.</b> cloreto de alumínio, flavonoides em tricomas (cabeça de seta) e raízes (seta). Barras: A-C e inset: 25µm; D-G: 75µm. ....	78

## CAPÍTULO 3

Figura 01 - Diagrama ilustrando o processo de indução de calos a partir de raízes de embriões zigóticos. A- Fruto de <i>Libidibia ferrea</i> , B-Semente em secção longitudinal (detalhe do eixo hipocótilo-radícula), C-embrião zigóticos cultivado em meio nutritivo, D-Calos originados de raiz de embriões zigóticos em meio nutritivo (T2) 0,5 mg. L <sup>-1</sup> de 2,4-D e 0,1 mg.L <sup>-1</sup> de BAP.....	100
Figura 02 - Diagrama ilustrando o processo de indução de calos a partir de segmentos nodais. A-Semente de <i>Libidibia ferrea</i> , B-plântula obtida por germinação <i>in vitro</i> , C-	

segmento nodal, D-Calos originados segmento nodal em meio nutritivo (T3) 0,2 mg.L <sup>-1</sup> de 2,4-D e 0,1 mg.L <sup>-1</sup> de BAP.....	101
Figura 03 - <i>Libidibia ferrea</i> (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz. Diferentes morfologias de calos após a adição dos reguladores de crescimento 2,4-D e BAP cultivados em meio MS. A, B e C ilustram calos obtidos de raízes de embriões zigóticos com predominância de células friáveis; D- Calo obtido de segmento nodal com células clorofiladas com predominância de células compactadas; E e F- Calos originados de segmentos nodais com células compactadas e células friáveis.....	103
Figura 04 - Curva de crescimento de Calos de <i>Libidibia ferrea</i> (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz, cultivada em meio MS. T2 (0,5 mg. L <sup>-1</sup> de 2,4-D e 0,1 mg.L <sup>-1</sup> de BAP). Massa fresca (MF) e Massa seca (MS) medido durante 80 dias por amostragem de sacrifício. Fase de adaptação (FA), Fase exponencial (FE), Tendência a fase estacionária (TFE). .....	105
Figura 05 - Perfil cromatográfico em CG/EM de calos de <i>Libidibia ferrea</i> (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz, Tratamento (T2) 0,5 mg. L <sup>-1</sup> de 2,4-D e 0,1 mg.L <sup>-1</sup> de BAP .....	107
<b>CAPÍTULO 4</b>	
Figura 01 - A-Aspecto da área cirúrgica no dorso do animal (indução da lesão), B-Fragmento de tecido para análise microscópica. ....	125
Figura 02 - Cromatoplaça do Extrato hidroalcoólico bruto (Ext. HAB.) e padrão de ácido gálico (Ác. Gálico) após a aplicação do reagente FeCl <sub>3</sub> (Cloroeto férrico).....	126
Figura 03 - Perfil químico em CG-EM, do extrato hidroalcoólico de frutos (epicarpo) de <i>Libidibia ferrea</i> (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz .....	128
Figura 04 - Análises microscópicas de tecidos animais e avaliação pelo método de <i>Picrosirius</i> (7 dias). A-Controle negativo, B-Controle positivo, C-tecido tratado com ácido elágico, D- tecido tratado com ácido gálico, E- tecido tratado com extrato bruto de <i>Libidibia ferrea</i> .....	131
Figura 05 - Análises microscópicas de tecidos animais e avaliação pelo método de <i>Picrosirius</i> (14 dias). A-Controle negativo, B-Controle positivo, C-tecido tratado com ácido elágico, D- tecido tratado com ácido gálico, E- tecido tratado com extrato bruto de <i>Libidibia ferrea</i> .....	132

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

Tabela 01 - Parâmetros relacionados às características biofísicas de frutos e sementes de *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz para as procedências dos estados do Pará, Maranhão e Amazonas. .... 47

### CAPÍTULO 2

Tabela 01 - Perfil químico do extrato hidroalcoólico de folhas de *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz provenientes dos estados do Amazonas, Pará e Maranhão, identificado por CG-EM após processo de derivatização. .... 74

Tabela 02. Perfil químico do extrato hidroalcoólico de raízes de *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz provenientes de localidades do Amazonas, Pará e Maranhão, identificado por CG-EM após processo de derivatização. .... 75

Tabela 03 - Resultados dos testes histoquímicos para compostos fenólicos aplicados na secreção presente em plântulas *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz. .... 77

### CAPÍTULO 3

Tabela 01 - Efeito da concentração de 2,4D e BAP, tipo de explantes sobre a indução e morfogênese de calos de *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz com 40 dias de cultivo em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido. .... 98

Tabela 02 - Perfil químico de calos de *Libidibia ferrea*, tratamento T2 (0,5 mg. L<sup>-1</sup>de 2,4-D e 0,1 mg.L<sup>-1</sup>de BAP). .... 106

### CAPÍTULO 4

Tabela 01 - Principais substâncias identificadas do extrato hidroalcoólico de frutos (epicarpo) de *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz ..... 129

Tabela 02 - Avaliação histopatológica para avaliação de formação de colágenos..... 130

## RESUMO

*Libidibia ferrea* é uma leguminosa arbórea conhecida como jucá ou pau-ferro, tem sido utilizada na medicina popular em função dos seus frutos apresentarem atividades biológicas. Registros etnobotânicos e etnofarmacológicos apontam o potencial desta espécie para atividades antiinflamatória e cicatrizante, portanto, devem apresentar classes de substâncias com propriedades farmacológicas de interesse, tais como, alcalóides, flavonóides, xantonas, antraquinonas, diterpenos, esteróides, taninos entre outras; as quais ainda não foram caracterizadas e relacionadas com estas atividades. Com o objetivo de fortalecer as bases do conhecimento da espécie para fomentar a produção sustentável, foram realizados estudos biométricos de frutos e sementes, histoquímica vegetal de plântulas, também foram aplicadas técnicas avançadas da biotecnologia vegetal para verificar a eficiência de produção de calos embriogênicos com vistas a produção de metabólitos *in vitro* e técnicas de metabolômica e separações cromatográficas para descrever o perfil químico dos frutos e suas atividades biológicas em especial a atividade cicatrizante. Foram analisados frutos de três tipologias climáticas diferentes que não apresentaram diferenças morfométricas que possa estabelecer um padrão morfológico para qualidade da matéria prima, o perfil químico indica a presença de ácido gálico, ácido elágico e outros compostos fenólicos. Para a cultura de células foi estabelecido um protocolo para calogênese e produção de biomassa que permitirá o desenvolvimento de estratégias para o acúmulo e produção de metabólitos *in vitro* como alternativa de produção em escala de interesse tecnológico.

Palavras-chaves: Metabolômica, *Libidibia*, frutos, fenólicos, cicatrização

## ABSTRACT

*Libidibia ferrea* is a tree leguminous known as jucá or pau-ferro, in folk medicine is known to present itself in biological activities already described. Ethnobotanical and ethno-pharmacological records point to the potential of *L. ferrea* fruits for anti-inflammatory and healing activities, therefore, they should present classes of substances with pharmacological characteristics of medical interest, such as alkaloids, flavonoids, xanthenes, anthraquinones, diterpenes, steroids, others; The compounds have not yet been characterized and related to these activities. With the aid of databases for the knowledge of sustainable production, biometric fruit and seed studies, plant histochemistry of seedlings were selected, and at the same time biotechnology techniques were used to verify the efficiency of the production of embryogenic calli of metabolites *in vitro* and techniques of metabolism and chromatographic separations to describe the chemical profile of the fruits and their biological activities, especially a cicatrizant activity. The fruits of three typologies were selected for the different types of parameters primarily modifiable, such as the clinical standard for the presence of gastric acid, elastic acid and other phenolic compounds. To a culture of cells was planned to protocol to callusogenesis and production of biomass that hesitating the development of strategies for the accumulatory and metabolism *in vitro* which alternative product in a high of interest technology.

Key words: Metabolomics, *Libidibia*, fruits, phenolics, healing

## 1 - INTRODUÇÃO

*Libidibia ferrea* (Mart. Ex Tul.) L.P. Queiroz é uma leguminosa arbórea conhecida como jucá ou pau-ferro, tem ocorrência natural nas florestas estacionais secas da caatinga podendo ser encontrada em outras regiões do Brasil. Sua importância se deve aos diferentes usos relacionados a utilização de sua madeira que por ser de alta densidade é utilizada na produção de carvão, lenha, moirões e estacas para cercas. *L. ferrea* também possui potencial forrageiro sendo comum encontra-la dispersa em pastagens, recentemente teve seu uso intensificado na arborização urbana e paisagismo, também se enquadra como espécie de usos múltiplos, apresenta forte relação cultural com as populações da caatinga, sobretudo, no aspecto medicinal quando seus frutos, caules e folhas são utilizados para tratamento de diferentes doenças e sintomas (GALDINO et al, 2007; LORENZI, 2008; QUEIROZ, 2009).

Diante disto o Ministério da Saúde brasileiro incluiu esta espécie na Lista Nacional de Plantas Medicinais importantes para o Sistema de Saúde. Na literatura *Libidibia ferrea* (jucá) apresenta muitos registros sobre suas atividades antifúngicas, antibacterianas, antiulcerogênicas, analgésicas e antiinflamatórias (CARVALHO et al.,1996; LIMA et al., 2011 e FERREIRA et al, 2015), no entanto, ainda existe uma lacuna referente a sua caracterização farmacognóstica e de seu perfil químico, fato que levou a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) no ano de 2015 abrir consulta pública para Farmacopéia Brasileira com objetivo de receber contribuições e atualizações sobre a monografia de Jucá enquanto droga vegetal.

*Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz faz parte do antigo grupo *Caesalpinia* onde seus componentes apresentam diversas classes de metabólitos com predomínio de esteróides, triterpenóides, flavonóides, saponinas, taninos, cumarinas como possíveis classes de metabólitos responsáveis por suas atividades biológicas (DI STASI, 2002; COSTA e SOUZA, 2015; FERREIRA et al, 2015).

A forma de obtenção dos insumos de *Libidibia ferrea* para fins medicinais ainda é a forma extrativista com a coleta dos frutos, cascas do caule e folhas. Esta forma de obtenção de matéria prima ainda não representa ameaça a conservação desta espécie, no entanto, em função do número crescente de pesquisas com *L. ferrea* que apontam seu

potencial para indústrias de cosméticos e farmacêuticos é necessário que se pense em estratégias para melhor aproveitamento deste recurso e sua produção sustentável.

Estas informações são importantes para programas de conservação e seleção de genótipos superiores da matéria-prima, bem como o desenvolvimento de tecnologia avançada que aperfeiçoe a produção e o acúmulo de metabólitos secundários através da cultura de células vegetais, visando o desenvolvimento de estratégias com uma alternativa para desenvolvimento tecnológico com culturas *in vitro* em um futuro próximo.

### **Hipótese**

É possível caracterizar as classes de metabólitos presentes no fruto de *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz que estão relacionadas à atividade cicatrizante e que possam ser produzidas em cultivo de células *in vitro*.

### **Objetivos**

#### **Objetivo Geral**

Investigar o perfil químico de frutos, plântulas e calos de *Libidibia ferrea* aplicando técnicas de metabolômica para relacionar com atividade cicatrizante.

#### **Objetivos Específicos**

1. Caracterizar morfometricamente frutos e sementes de *Libidibia ferrea*
2. Determinar os compostos fenólicos em plântulas de *Libidibia ferrea*
3. Gerar calos a partir de técnicas de biotecnologia vegetal com vistas à produção de metabólitos;
4. Avaliar atividade cicatrizante com base no perfil metabólico estudado.

### **Contextualização e apresentação dos capítulos**

A ideia central desta tese é a cultura de células *in vitro* de *Libidibia ferrea* (Jucá) com vistas à produção de metabólitos com potencial farmacológico. Com objetivo de traçar uma linha de pensamento à luz da produção sustentável, abordando desde estudos fundamentais da biologia dos frutos até a aplicação de técnicas avançadas de cromatografia e biotecnologia vegetal. Este estudo foi dividido em quatro capítulos descritos abaixo:

Capítulo I-Aspectos botânicos e caracterização morfológica de *Libidibia ferrea* (Mart. Ex Tul.) L.P. Queiroz. Constitui a primeira etapa do trabalho com os resultados dos testes iniciais sobre a tecnologia de frutos e sementes, caracterização biofísica e informações que irão subsidiar a produção de matérias primas com qualidade.

Capítulo II-Análise da distribuição de substâncias fenólicas e localização *in situ* em plântulas de *Libidibia ferrea* (M. Ex Tul.) L.P. Queiroz (Leguminosae-Caesalpinioideae). Nesta etapa foi avaliada a distribuição de compostos fenólicos em plântulas de *Libidibia ferrea* para verificar possíveis locais de síntese e armazenamento.

Capítulo III-Desenvolvimento de calogênese e estudo do perfil metabólico de *Libidibia ferrea* (Mart. Ex Tul.) L.P. Queiroz (Leguminosae-Caesalpinioideae). Neste capítulo são apresentados resultados da calogênese de *Libidibia ferrea*, também são descritas etapas importantes como a seleção de explantes, estabelecimento *in vitro* e o perfil metabólico.

Capítulo IV-Perfil metabólico e avaliação das atividades biológicas de frutos de *Libidibia ferrea* (Mart. Ex Tul.) L.P. Queiroz (Fabaceae). São apresentados resultados do perfil químico dos frutos de *Libidibia ferrea* com ênfase no ácido gálico e ácido elágico e sua relação com processo de cicatrização.

## 2 - REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 - Aspectos botânicos de *Libidibia ferrea*

Com aproximadamente 727 gêneros e 19.327 espécies, a família Leguminosae encontra-se, atualmente, classificada em 36 tribos (LEWIS, 2004). Distribui-se nas regiões tropicais, estando presente em menor número nas regiões temperadas (POLHILL & VIDAL, 1981; POLHILL, 1994), tendo registro de 212 gêneros nativos no Brasil (LEWIS et al, 2005; CÓRDULA et al, 2014). Leguminosae destacam-se por representar um grupo de plantas que abriga um número significativo de espécies de importância econômica e ecológica nos mais diversos ecossistemas.

*Libidibia* é um gênero que foi segregado de *Caesalpinia* por Lewis et al, (2005), inclui 6-8 espécies entre estas *Caesalpinia ferrea* que foi subordinada ao gênero *Libidibia* por Queiroz (2009) e pode ser diferenciado dos demais gêneros pela combinação de folhas bipinadas, folíolos opostos e simétricos, flores zigomorfas com pétalas amarelas organizadas em panículas e frutos indeiscentes, inflados, com secção ± tetragonal QUEIROZ (2009). Quanto a sua distribuição Lewis (2005) destaca que espécies de *Libidibia* ocorrem em áreas disjuntas de floresta tropical seca, em todo o neotrópico do México e das Antilhas para a Colômbia, Venezuela, Equador, Peru, Paraguai, Brasil, Bolívia e Argentina.

*Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz, é uma árvore de grande porte, com tronco liso e cerne duro, podendo chegar a 15 m de altura; folhas bipinadas com folíolos oblongos, ovalados ou obovados; possui flores amarelas diclamídeas, hermafroditas, com corola de quatro pétalas subiguais e outra superior, sésil, ultrapassando o cálice gamossépalo; dez estames, ovário sésil e pubescente com 10 a 12 óvulos. O fruto é um legume bacóide, 9-10 x 3-3,5 cm, oblongo, ápice acuminado, base atenuada, margem inteira, irregularmente constrita, superfície lisa, pubérula; mesocarpo pulposo, rico em tanino; endocarpo lenhoso, individualizado em câmaras monospermicas. Sementes 9-13, 10-12 x 7-8mm, obovado-elípticas, marrons, funículo filiforme, longo. Embrião com plúmula diferenciada em eófilos, emergências glandulares presentes (CÓRDULA et al, 2014; QUEIROZ, 2009).

Planta perenifólia ou semidecíduas, heliófita higrófila, característica da mata pluvial atlântica. Apresenta ampla dispersão, porém geralmente em baixa densidade

populacional. É encontrada preferencialmente em várzeas úmidas e fundo de vales, tanto no interior da mata primária densa como em formações abertas. Produz anualmente moderada quantidade de sementes viáveis. Floresce a partir do final de novembro, prolongando-se até janeiro. Os frutos amadurecem em julho-agosto (LORENZI, 2002). É denominada na região amazônica de Jucá, mas conhecida em todo o Brasil como Pau-ferro ou Pau-ferro verdadeiro, além dos nomes indígenas Ibirá-obi, Imirá-itá, Muirá-obi e Muiré-itá com ocorrência no Piauí, Alagoas, Bahia, Espírito Santo e Rio de Janeiro, na floresta pluvial atlântica (LORENZI, 2008).

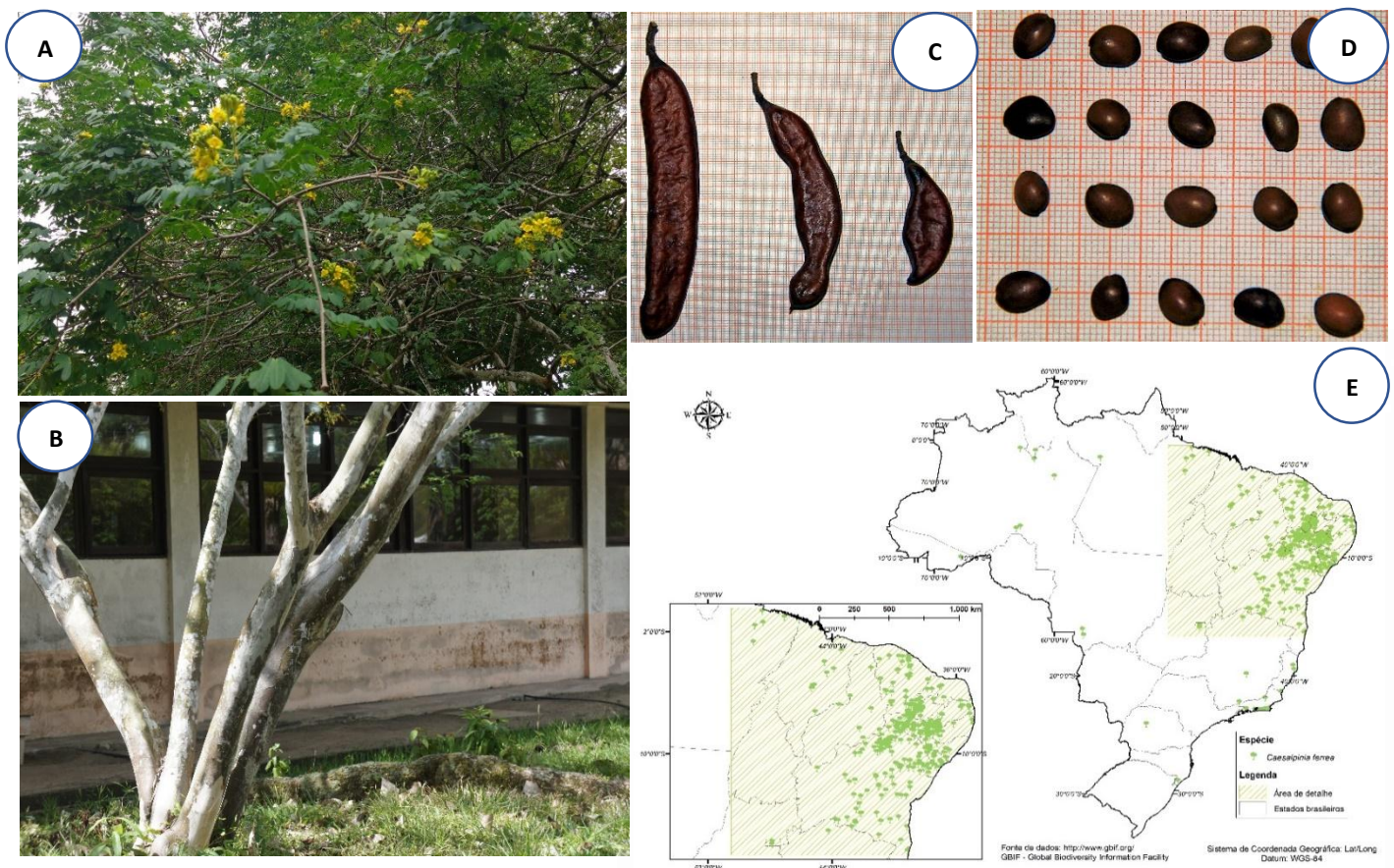


Figura 01-A e B- Aspecto geral da planta no período de floração, detalhe do caule; C e D- Aspecto geral de frutos e sementes; E- Mapa de distribuição e ocorrência de *L. ferrea*. (Fonte: Santos, 2018).

## 2.2 - Aspectos etnofarmacológicos de *Libidibia ferrea*

*L. ferrea* apresenta diversidade de compostos ricos em taninos, esteroides e fenóis, podendo ser considerada uma espécie potencial para o desenvolvimento de produtos com ações anti-inflamatórias, adstringentes e hemostáticas. O uso de diversas partes da planta é relatado na literatura, principalmente de material proveniente do Nordeste das florestas secas da Caatinga onde esta espécie tem ocorrência natural.

Dentre os vários grupos químicos relacionados à *L. ferrea*, os polifenóis destacam-se, sendo os ácidos gálico e elágico as possíveis substâncias químicas responsáveis por parte das atividades biológicas dos frutos desta espécie além de atuarem como marcadores químicos para fins de quantificação e padronização da droga (UEDA et al., 2001). Além disso, algumas pesquisas mostram que o *L. ferrea* possui ação antifúngica e antibacteriana (LIMA et al., 2011; CARVALHO et al., 1996), antiulcerogênicas (BACCHI et al., 1995; BACCHI; 1994), anti-inflamatória, propriedades analgésicas (CARVALHO et al., 1996; FREITAS et al., 2012).

O extrato aquoso de seus frutos é utilizado no tratamento de diabetes, com o ácido elágico relacionado à inibição da aldose redutase, uma enzima envolvida nas complicações do diabetes sugerindo o efeito antidiabético (UEDA et al., 2001) e na prevenção do câncer (NAKAMURA et al., 2002a; NOZAKI et al., 2007).

Ácido gálico e gálico de metila foram identificados como componentes importantes dos frutos de *L. ferrea*. Estudos do extrato dos caules fazem referência às propriedades cicatrizantes de taninos e revelou uma proporção de 4,7% (saponinas) e 9,2% (taninos) e foram consideradas prováveis responsáveis pela ação antiúlcera (DI STASI & HIRUMI-LIMA, 2002).

*L. ferrea* é uma planta muito utilizada popularmente para acelerar processos de cicatrização de feridas cutâneas. Em trabalho realizado por Kobayashi et al., (2015) a composição química e o potencial cicatrizante do extrato etanólico dos frutos foi testado em ratos. Este autor avaliou o processo de cicatrização com medidas macro e microscópicas, revelando que a cicatrização foi mais significativa com uso de extrato etanólico dos frutos de *L. ferrea* a 12,5%, neste trabalho a triagem fitoquímica mostra a presença de saponinas, ácidos orgânicos, açúcares redutores, fenóis e taninos.

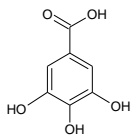
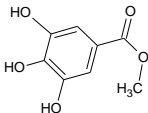
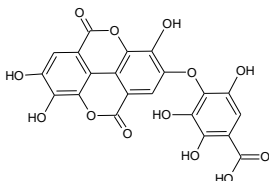
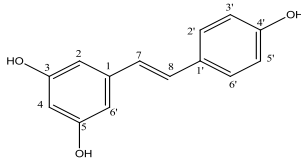
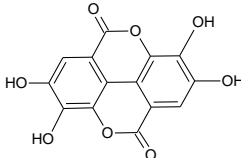
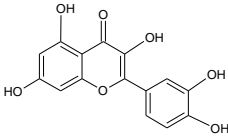
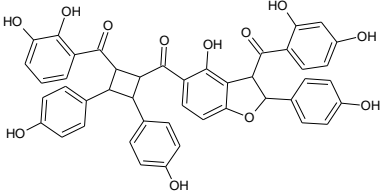
Outras atividades revelaram que o uso tópico de pomada à base de *Libidibia ferrea* apresenta efeito significativo na cicatrização da pele de caprinos. No entanto, há a necessidade de ampliação do estudo com diferentes dosagens e formulações. (OLIVEIRA, 2008). Quando usado em associação com a babosa (*Aloe vera*) em lesões cutâneas totais em ratos *L. ferrea* apresentou resultado satisfatório não havendo diferença estatística significativa (SOARES et al., 2013; KOBAYASHI et al, 2015).

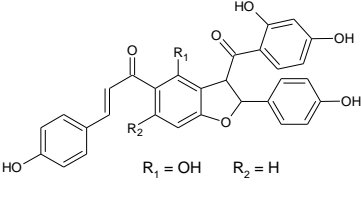
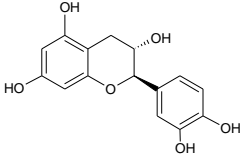
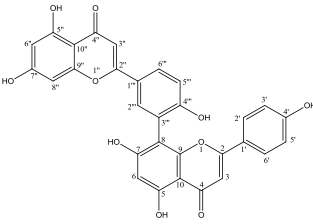
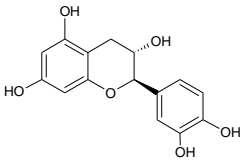
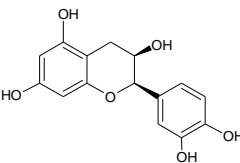
Os constituintes obtidos dos extratos alcoólicos já foram avaliados *in vitro* e *in vivo* quanto ao seu efeito antitumoral e quimiopreventivo, utilizando o ensaio de ativação do antígeno do vírus Epstein-Barr e processos carcinogênicos de pele, no segundo estágio, respectivamente (NAKAMURA et al., 2002a; NAKAMURA et al., 2002b).

Um trímero de chalcona, denominado de Pauferrol A, encontrado no extrato etanólico obtido do caule de *L. ferrea*, mostrou uma potente atividade inibidora contra a topoisomerase II humana, e uma ação inibidora da proliferação celular por indução de apoptoses nas células HL60 leucêmicas mielóides agudas, similar ao efeito das drogas anticâncer contra topoisomerase tipo II (HIROSHI et al., 2007).

Estudos realizados por Magalhães et al (2014), utilizando frutos e tecidos do caule de *L. ferrea*, demonstraram a aplicação prática de técnicas de espectroscopia na identificação de classes de metabólitos. Com uso de Espectrometria de Massa (EM) de alta resolução estes autores identificaram os ácidos gálico e elágico e o primeiro registro para um biflavonoide e uma fitoalexina. Os estudos relacionados as atividades cicatrizantes e outras atividades tópicas ainda necessitam de aprofundamento para esclarecimento das substâncias relacionadas aos benefícios da pele, existe uma tendência de direcionar os compostos fenólicos (ácidos fenólicos) e taninos como possíveis agentes promotores destas ações. Apresenta-se a seguir um quadro com os principais compostos fenólicos identificados em diferentes partes de *Libidibia ferrea*.

Quadro 01 - Principais classes de compostos fenólicos de *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.)  
L.P. Queiroz, identificados em diferentes partes da planta.

Composto	Estrutura	Órgão	Autor
Ácido gálico		Frutos	Ferreira et al, 2016
		Caule	Pedrosa et al, 2017
			Dias et al, 2013
Metil galato		Frutos	Nakamura et al, 2002 Vasconcelos et al, 2011
2-(2,3,6-trihidroxifenil)-4-carboxifenil)-ácido elágico		Frutos	Ueda et al, 2004
Resveratrol		Caule	Magalhães et al, 2014
Ácido elágico		Caule	Wyrepkowski et al; 2014
		Frutos	Ferreira et al, 2016
			Pedrosa et al, 2017 Ueda et al, 2001
Quercetina		Frutos	Pedrosa et al, 2017
Paufferol A		Caule	Nozaki et al, 2007

<p><b>Paufferol B</b></p>  <p><math>R_1 = OH</math>   <math>R_2 = H</math></p>	Caule	Ohira et al, 2013
<p><b>Paufferol C</b></p> 	Caule	Ohira et al, 2013
<p><b>Biflavonoide</b></p> 	Frutos	Magalhães et al, 2014
<p><b>Catequina</b></p> 	Caule	Araújo et al, 2014 Vasconcelos, 2011
<p><b>Epicatequina</b></p> 	Caule	Pedrosa et al, 2017
Frutos		

Fonte: Autor, 2018.



Figura 02 - Bens e serviços ecossistêmicos de *Libidibia ferrea* que justificam a inclusão da espécie em sistemas de produção.

### **2.3 - Metabólitos secundários ou metabólitos especiais.**

O processo de transição de saída das plantas do ambiente aquático para o ambiente terrestre foi marcado por uma série de transformações anatômicas e fisiológicas, que culminou com a conquista dos mais diversos ambientes terrestres pelos vegetais. No entanto, para que sua adaptação se desse de forma eficaz estes organismos desenvolveram um arsenal de compostos químicos que foram fundamentais nesse processo, estas substâncias podemos denominar de metabólitos secundários e sua ocorrência é relacionada diretamente aos estímulos externos e fatores de estresse aos quais esses vegetais são submetidos (WINK, 2013).

De acordo com Hartmann (1995), a ocorrência de um número elevado de compostos químicos nas plantas não é um evento casual e sim ações específicas organizadas por rotas biossintéticas integradas ao metabolismo. Algumas características são peculiares aos metabólitos secundários como a diversidade estrutural, ocorrência restrita e alta variabilidade intraespecífica. Este autor faz algumas considerações em relação aos metabólitos secundários e mecanismos de defesa: Indução e informação sobre o início da defesa em resposta aos ataques microbianos e herbivoria, produção de pró-toxinas que para o metabolismo das plantas são seguros, mas se tornam tóxicos após ataque (glicosídeos cianogênicos), acumulação constitutiva de compostos de defesa (isto é, compostos que estão sempre presentes no tecido-alvo em concentrações necessárias para satisfazer as funções).

Os metabólitos secundários atuam significativamente no crescimento e sobrevivência das plantas sob diferentes estresses ambientais. Existem três grupos principais de metabólitos secundários com base em sua rota biossintética. Esses grupos incluem compostos contendo nitrogênio (glicosídeos cianogênicos, alcalóides e glucosinolatos), compostos fenólicos (flavonóides e fenilpropanóides) e terpenos isoprenóides (VERMA e SHUKLA, 2015).

Uma das principais funções atribuídas aos metabólitos secundários está relacionada ao estabelecimento das plantas no ambiente terrestre o chamado “*Plant Fitness*”, que inclui defesa contra herbívoros e microorganismos. Estes também atuam na competição por luz, água e nutrientes e como compostos de sinalização para atrair animais polinizadores e dispersores de frutos.

A diversidade de metabólitos e estruturas químicas presentes nas leguminosas tem sido usada na definição de marcadores químicos e na delimitação sistemática de determinados grupos. A complexidade química desta família tem sido expressa pelo grande número de metabólitos descritos pertencentes às classes de alcalóides, aminas, flavonóides, isoflavonas, cumarinas, antraquinonas, terpenóides, glicosídeos cianogênicos, compostos fenólicos, inibidores de protease e lectinas (WINK, 2013; QUEIROZ, 2009).

A identificação de metabólitos secundários em espécies de Leguminosae é importante na definição de marcadores químicos para delimitação sistemática de determinados grupos. A diversidade de metabólitos e estruturas químicas presentes nas leguminosas pode ter relação com o sucesso na colonização de ambientes por estas plantas, principalmente no clado fixador de nitrogênio (FIGURA 03) observado no sistema de classificação APG IV (QUEIROZ, 2009).

Embora, grande parte destes compostos tenham sido relacionados pela literatura como produtos químicos de defesa ou como compostos de sinalização e atração de polinizadores e dispersores de sementes (POLHILL et al., 1981; WINK, 2013) é possível que muitos metabólitos possam influenciar no estabelecimento de determinadas espécies em ambientes antropizados (QUEIROZ, 2009; LEWIS *et al.*, 2005).

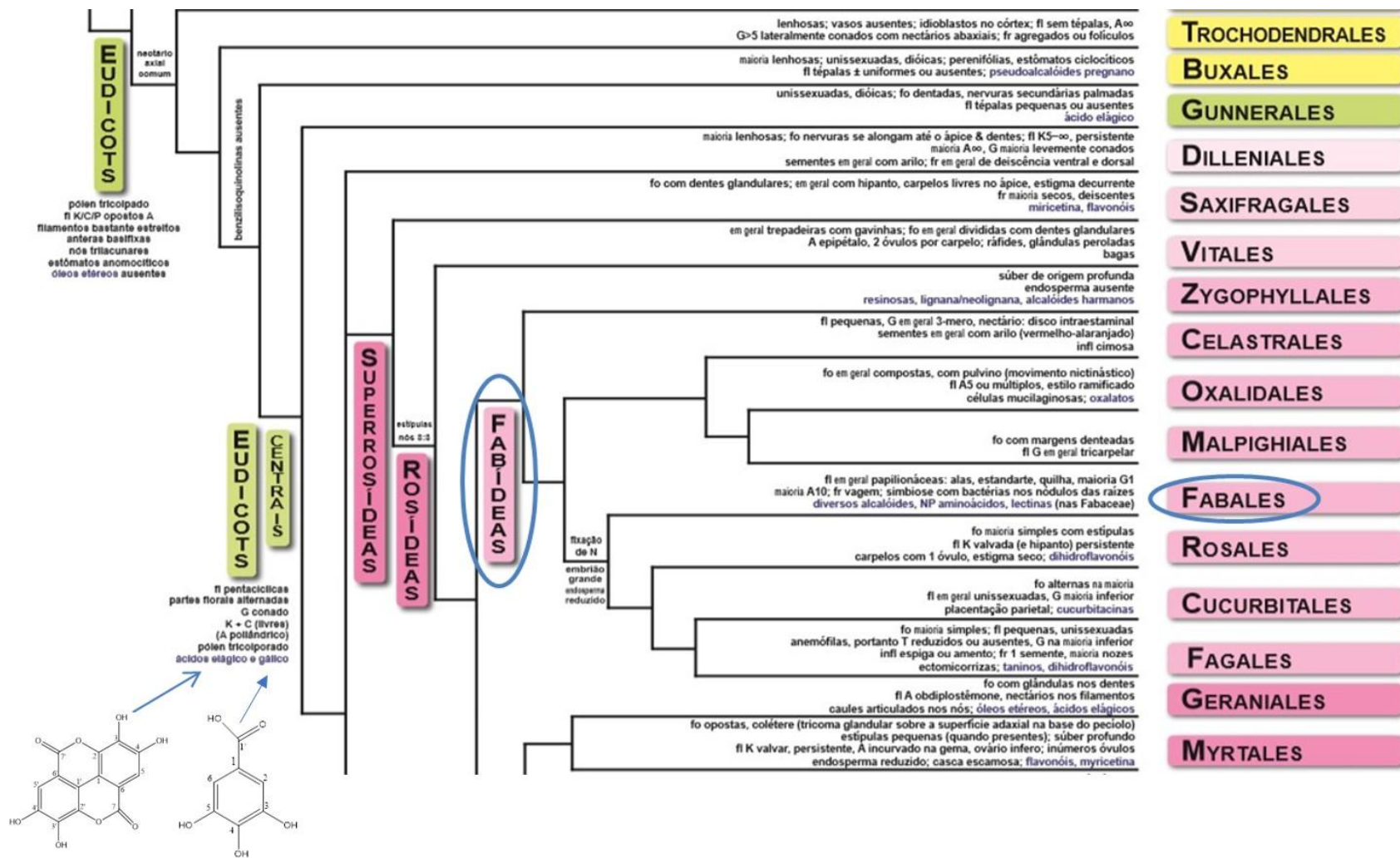


Figura 03 - Detalhe do APG IV, evidenciando a presença do ácido gálico e ácido elágico no clado da ordem Fabales (Leguminosas)

Fonte: APG IV (2014)

Os compostos fenólicos representam uma das classes mais importantes de metabólitos secundários com aproximadamente 10.000 substâncias solúveis em água e solventes orgânicos. Sabe-se que os fenólicos desempenham diferentes processos nas plantas como crescimento, reprodução e tolerância contra vários estresses abióticos e bióticos além da atividade alelopática suprimindo o crescimento de plantas vizinhas (WINK, 2013). Os compostos fenólicos são amplamente distribuídos no reino vegetal, não são comuns em bactérias, fungos e algas e ocorrem em briófitas de forma não regular.

A diversificação destes compostos ocorreu provavelmente por volta de 480 e 360 milhões de anos atrás quando as plantas iniciaram o processo de colonização dos ambientes terrestres. A capacidade de sintetizar compostos fenólicos foi selecionada ao longo do curso de evolução em diferentes linhagens vegetais quando tais compostos passaram a atender necessidades específicas (VERMA e SHUKLA, 2015).

Uma das características que são observadas nesse vasto grupo de substâncias é que possuem ocorrência restrita a determinados grupos taxonômicos, são biossintetizados por um número delimitado de vias metabólicas, e mesmo não sendo essenciais para a vida celular desempenham papel fundamental nos processos de regulação e proteção, assegurando o estabelecimento dos organismos nos mais diversos ambientes.

A diversidade de metabólitos secundários e sua distribuição natural não são totalmente conhecidos sendo, necessários esforços para o mapeamento destas substâncias, principalmente nas áreas de florestas tropicais. Neste sentido, Kubitzki e Gottlieb (1984), reforçam a importância do conhecimento destes metabólitos em grupos de plantas evoluídos ou derivados e destacam sua importância como marcadores de evolução filogenética e de diversidade ecogeográfica das espécies. Esta abordagem quando alinhada a métodos eficientes de análises e detecção fornece informações estratégicas para o entendimento das interações ecológicas, história espacial de linhagens e seus centros de irradiações possibilitando o planejamento e execução de programas de conservação (WINK, 2013).

#### **2.4-Cultivo *in vitro* e a produção de células vegetais para acúmulo de metabólitos.**

Albuquerque (2006), Zanin et al (2012) destacam a importância das pesquisas com plantas medicinais e substâncias oriundas de informações geradas em registros etnobotânicos e etnofarmacológicos. Estes estudos possibilitam a expansão do conhecimento sobre o potencial medicinal da flora nativa além de estabelecer uma base racional para o uso medicinal de determinada espécie de planta visando o desenvolvimento de medicamentos à base de matérias primas de baixo custo e atividade biológica relevante.

O termo cultura de tecidos vegetais tem sido bastante utilizado para definir a cultura asséptica *in vitro* de células, tecidos, órgãos e seus componentes sob condições físicas e químicas definidas. A cultura de tecidos constitui uma importante ferramenta para estudos básicos, como a compreensão dos fatores responsáveis pelo crescimento, metabolismo, diferenciação e morfogênese das células vegetais, bem como para estudos aplicados, como micropropagação, manutenção de germoplasma *in vitro*, limpeza clonal e produção de metabólitos (SILVA-NETO e ANDRADE, 2011).

A cultura de tecidos vegetais é uma potente ferramenta e tem papel relevante em várias linhas de pesquisa de natureza básica e aplicada, e seu uso tem sido largamente empregado na indústria da propagação de plantas. Isso confere ao sistema produtivo de muitas espécies agrícolas e florestais vantagens qualitativas do ponto de vista genético e fitopatológico, resultando em maior produtividade com menor demanda por defensivos agrícolas refletindo nos custos e na sustentabilidade econômica e ambiental do sistema produtivo. A intensificação das pesquisas no campo da cultura de tecidos possibilita a aplicação dos benefícios acima mencionados em um número maior de espécies vegetais, incluindo muitas espécies nativas da nossa flora que ainda não foram investigadas (SILVA-NETO e ANDRADE, 2011).

Os avanços nas técnicas de biotecnologia vegetal e na produção de metabólitos *in vitro* de alto valor agregado em cultura de células, deixa evidente que esses processos são uma alternativa viável para a produção sustentável de compostos bioativos e utilização racional de plantas reduzindo o impacto da exploração sobre os recursos genéticos (FRANÇA, 2017).

Diversos metabólitos secundários têm sido validados quanto à eficácia biológica e farmacológica e à segurança de uso como compostos bioativos no desenvolvimento de

novos produtos de interesse agroindustrial e farmacêutico. No entanto, a baixa produtividade em plantas nativas ou cultivadas é fator limitante à produção sustentável e um obstáculo à comercialização desses compostos (MAGALHÃES, 2017).

Muitos desafios são apresentados para a produção sustentável de metabólitos secundários, a presença destas moléculas em quantidades muito reduzidas e em diferentes órgãos das plantas exige a aplicação de bioprocessos inovadores (WINK, 2010).

A cultura de tecidos vegetais compreende um conjunto de técnicas onde um explante (célula, tecido ou um órgão) é isolado e cultivado em condições assépticas em um meio artificial e que com o uso de indutores apropriados e escolha de variedades químicas de elevado rendimento, tem proporcionando obter um peso de massa celular seca dez vezes superior à que é obtida a partir da própria planta (TORRES et al 1998).

A cultura de células vegetais aponta como uma alternativa para as indústrias farmacêuticas, uma vez que estas ainda dependem de matérias-primas provenientes de plantas nativas ou cultivadas, para obtenção de determinados compostos ativos (CUNHA, 2014). Com o avanço da cultura de células vegetais, a indústria pode resolver o problema da sazonalidade, obter culturas mais uniformes e com concentrações em maior quantidade, mas principalmente buscar alternativas sustentáveis de produção evitando a erosão genética dos recursos.

### 3 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, U. P. Re-examining hypotheses concerning use and knowledge of medicinal plants: a study in the Caatinga vegetation of NE Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 2, n. 1, p. 30, jul. 2006.

BACCHI, E. M.; SERTIE, J. A.; VILLA, N.; KATZ, H. Antiulcer action and toxicity of *Styrax camporum* and *Caesalpinia ferrea*. **Planta Medica**, v. 61, n. 3, p. 204-207, 1995.

BAHIA, M. V.; SANTOS, J. B., DAVID J. P.; DAVID, J. M. Biflavonoids and other phenolics from *Caesalpinia pyramidalis* (Fabaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6B, p. 1402-1405, nov./dez. 2005.

BARROS, A. O.; SOUZA, R. S.; ARANHA, E. S. P.; COSTA, L. M.; SOUZA, T. P.; VASCONCELLOS, M. C.; LIMA, E. S. Antioxidant and hepatoprotective activities of *Libidibia ferrea* bark and fruit extracts. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 11, p. 71-76, 2014.

CARVALHO, J. C.; TEIXEIRA, J. R.; SOUZA, P. J.; BASTOS, J. K.; SANTOS FILHO, D.; SARTI, S. J. Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 53, n. 3, p. 175-178, set. 1996.

CAVALHEIRO, M. G.; FARIAS, D. F.; FERNANDES, G. S.; NUNES, E. P.; CAVALCANTI, F. S.; VASCONCELOS, I. M.; MELO, V. M. M.; CARVALHO, A. F. U. Atividades biológicas e enzimáticas do extrato aquoso de sementes de *Caesalpinia ferrea* Mart., Leguminosae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 19, n. 2B, p. 586-591, mai. 2009.

COSTA, L. M.; GUILHON-SIMPLICIO, F.; SOUZA, T. P. *Libidibia ferrea* (Mart. Ex TUL) L. P Queiroz var. *ferrea*: Pharmacological, Phytochemical and Botanical Aspects. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, p. 48-53, jan. 2015.

CUNHA, A. P. da. **Farmacognosia e Fitoquímica**. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 2014.

CÓRDULA, E; MORIM, M; ALVES, M. Morfologia de frutos e sementes de Fabaceae ocorrentes em uma área prioritária para a conservação da Caatinga em Pernambuco, Brasil. **Rodriguésia**. 65. 505-516. 2014.

DIAS, A.M.A; RE-RICO, A; OLIVEIRA, R.A, MARCENEIRO, S; ALVAREZ, L.C; CONCHEIRO, A, et al. Wound dressings loaded with an anti-inflammatory juca (*Libidibia ferrea*) extract using supercritical carbon dioxide technology. **J Supercrit Fluids**, 74: 34-45.2013.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. São Paulo: UNESP, 2002. 604 p.

FERREIRA, M. R. A.; SOARES, L. A. L. *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul) L. P Queiroz : A review of the biological activities and phytochemical composition. **Journal of medicinal plants**, v. 9, n. 2, p. 140–150, 2015.

FERREIRA, M. R.; FERNANDES, M. T.; SILVA, W. A.; BEZERRA, I. C.; SOUZA, T. P., PIMENTEL, M. F.; SOARES, L. A. L. Chromatographic and spectrophotometric analysis of phenolic compounds from fruits of *Libidibia ferrea* Martius. **Pharmacognosy magazine**, v. 12, n. Suppl 2, p. S285-S291, mai. 2016.

FREITAS, A. C. C.; XIMENES, N. C. A.; AGUIAR, J. S.; NASCIMENTO, S. C.; LINS, T.U. L.; MAGALHÃES, L. R.; COELHO, L. C. B. B.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G.; GONÇALVES-SILVA, T.; CORREIA, M. T. S. Biological Activities of *Libidibia (Caesalpinia) ferrea* var. *parvifolia* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz Pod Preparations. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, mar. 2012.

KOBAYASHI, Y. T. S.; ALMEIDA, V. T.; BANDEIRA, T.; ALCÂNTARA, B. N.; SILVA, A. S. B.; BARBOSA, W. L. R.; SILVA, P. B.; MONTEIRO, M. V. B.; ALMEIDA, M. B. Avaliação fitoquímica e potencial cicatrizante do extrato etanólico dos

frutos de Jucá (*Libidibia ferrea*) em ratos Wistar. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 52, n. 1, p. 34-40, abr. 2015.

LEWIS, G. P. *Caesalpinia: a revision of the Poincianella-Erythrostemon group*. 1 ed. Richmond: Royal Botanic Gardens (K-RBG), 1998. 233p.

LEWIS, G. P. Tribe Caesalpinieae. In: LEWIS, G.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. (Ed.) **Legumes of the World**. Kew, Royal Botanic Gardens, p. 127-161, 2005.

LIMA, S. M. A.; ARAÚJO, L. C. C.; SITÔNIO, M. M.; FREITAS, A. C.; MOURA, S. L.; CORREIA, M. T. S.; MALTA, J. N.; GONÇALVES-SILVA, T. Potencial anti-inflamatório e analgésico da *Caesalpinia ferrea*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v, 22, p. 169-175, 2011.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Editora Plantarum, 2008

MAGALHÃES, P.M. Variabilidade química em plantas medicinais e aspectos da produção. In: JACOMETTI, N.A; CARDOSO, R.F; VENEZIANI, R.C.S; AMBRÓSIO, (Org.). **Farmacognosia**. 1ed.São Paulo: Atheneu, v. 1, p. 423-439. 2017.

NAKAMURA E. S.; KUROSAKI, F.; ARISAWA, M.; MUKAINAKA, T.; TAKAYASU, J.; OKUDA, M.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; PASTORE, F. Cancer chemopreventive effects of a Brazilian folk medicine, Juca, on in vivo two-stage skin carcinogenesis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, n. 1, p. 135-137, jun. 2002a.

NAKAMURA, E. S.; KUROSAKI, F.; ARISAWA, M.; MUKAINAKA, T.; OKUDA, M.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; PASTORE, F. Cancer chemopreventive effects of constituents of *Caesalpinia ferrea* and related compounds. **Cancer Letters**, v. 177, p. 119-124, 2002b.

NOZAKI, H.; HAYASHI, K.; KIDO, M.; KAKUMOTO, K.; IKEDA, S.; MATSUURA N.; TANI, H.; TAKAOKA, D.; IINUMA, M.; AKAO, Y. Pauferrol A, a novel chalcone trimer with a cyclobutane ring from *Caesalpinia ferrea* Mart exhibiting DNA topoisomerase II inhibition and apoptosis-inducing activity. **Tetrahedron Letters**, v. 48, n. 47, p. 8290-8292, nov. 2007.

OLIVEIRA, A.F.; BATISTA, J.S.; PAIVA, E.S.; SILVA, A.E.; FARIAS, Y.J.M.D.; DAMASCENO, C.A.R.; BRITO, P.D.; QUEIROZ, S.A.C.; RODRIGUES, C.M.F.; FREITAS, C. I. A. Avaliação da atividade cicatrizante do jucá (*Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. var. *ferrea*) em lesões cutâneas de caprinos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 3, p. 302-310, mar. 2010.

OLIVEIRA, I. V. P. DE M. Avaliação cicatricial macroscópica da vagem e da casca do jucá (*Caesalpinia ferrea* MART. EX TUL. VAR. *ferrea*) em lesões cutâneas em asininos (*Equus asinus*). **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 8, n. 2, p. 129-135, 2014.

PEDROSA, T. N.; BARROS, A. O.; NOGUEIRA, J. R.; FRUET, A. C.; RODRIGUES, I. C.; CALCAGNO, D. Q.; SMITH, M. A. C.; SOUZA, T. P.; BARROS, S. B. M.; VASCONCELOS, M. C.; SILVA, F. M. A.; KOOLEN, H. H. F.; MARIA-ENGLER, S. S.; LIMA, E.S. Anti-wrinkle and anti-whitening effects of jucá (*Libidibia ferrea* Mart.) extracts. **Archives of Dermatological Research**, v. 308, n. 9, p. 643-654, nov. 2016.

OHIRA, S; TAKAYA, K; MITSUI, T; KIDO, M; KAKUMOTO, K; HAYASHI, K, et al. New chalcone dimers (I) from *Caesalpinia ferrea* Mart act as potent inhibitors of DNA topoisomerase II. **Tetrahedron Lett**; 54(37): 5052-5,2013

POLHILL, R. M.; VIDAL, J. E. *Caesalpinieae*. In: POLHILL, R. M.; RAVEN, P. H. (Eds.). **Advances in Legume Systematics 1**. Kew: Royal Botanic Gardens, 1981.

QUEIROZ, L. P. **Leguminosas da Caatinga**. 2. ed. Feira de Santana: Universidade Estadual de Feira de Santana, 2009. 443 p.

SILVA-NETO, S.P & ANDRADE, S. R. M. Cultura de tecidos vegetais: princípios e aplicações. *In*: Faleiro, F.G.; Andrade, S.R.M. de. (Org.). **Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária**. 1ed. Planaltina DF: Embrapa Cerrados, v. 1, p. 410-434. 2011.

SAWADA, L. A.; MONTEIRO, V. S. C.; RABELO, G. R.; DIAS, G. B.; CUNHA, M.; NASCIMENTO, J. L. M.; BASTOS, G. N. T. *Libidibia ferrea* mature seeds promote antinociceptive effect by peripheral and central pathway: possible involvement of opioid and cholinergic receptors. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

SOARES, J. A.; BARROS, M.; GONÇALEZ, W.P; CRISCI, A.N; JORGE, M.H.S Avaliação da atividade cicatrizante da *Caesalpinia ferrea* ex . TUL . var *ferrea* e da *Aloe vera* (L.) Burm. f. em lesões cutâneas totais em ratos. **Perspectiva online: biologia & saúde**, p. 33-42, 2013.

UEDA, H.; TACHIBANA, Y.; MORIYASU, M.; KAWANISHI, K.; ALVES, S. M. Aldose reductase inhibitors from the fruits of *Caesalpinia ferrea* Mart. **Phitomed**. v. 8, n. 5, p. 377-381, 2001

VERMA, N.; SHUKLA, S. Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 2, n. 4, p. 105-113, 2015

WINK, M. Evolution of secondary metabolites in legumes (Fabaceae). **South African Journal of Botany**, v. 89, p. 164-175, 2013.

ZANIN, J. L. B.; CARVALHO, B. A.; MARTINELLI, P. S.; SANTOS, M. H; LAGO, J. H. G.; SARTORELLI, P.; VIEGAS JR, C.; SOARES, M. G. The genus *Caesalpinia* L. (Caesalpinaceae): phytochemical and pharmacological characteristics. **Molecules**, v. 17, n. 7, p. 7887-7902, jun. 2012.

# ***CAPÍTULO I***

**Aspectos botânicos e caracterização morfométrica de *Libidibia ferrea*  
(Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz.**

## 1 - INTRODUÇÃO

*Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz, conhecida como Jucá ou pau-ferro, é uma Fabaceae arbórea, com ampla distribuição no nordeste do Brasil e presente com frequência nas formações vegetais das florestas estacionais secas e semidecíduas da Caatinga. É heliófita com ampla dispersão, porém geralmente em baixa densidade populacional. Floresce a partir do final de novembro, prolongando-se até janeiro, seus frutos amadurecem em julho-agosto e produz anualmente moderada quantidade de sementes viáveis (Figura 01 pag. 41). Para obtenção de sementes, os frutos devem ser colhidos diretamente da árvore quando adquirem coloração escura e iniciam a queda espontânea, um quilograma contém aproximadamente 5.200 sementes cuja viabilidade dura mais de oito meses (LORENZI, 2002).

Na Amazônia é encontrada nos ambientes domésticos e quintais florestais, sua introdução na região provavelmente ocorreu durante os processos migratórios com os nordestinos no período dos grandes ciclos econômicos (PRANCE e SILVA, 1975). Esta espécie possui forte valor cultural no seu centro de diversificação e nas áreas onde foi introduzida, pois seus frutos, folhas e caules costumam ser extraídos para fins medicinais no tratamento de diversas moléstias, além disso, sua plasticidade e tolerância em ambientes degradados justificam sua inclusão em programas de restauração florestal e restauração produtiva (QUEIROZ, 2009; LORENZI, 2002; FERREIRA et al, 2015).

Diante da importância e uso de *Libidibia ferrea*, seus frutos podem ser classificados como matéria prima e enquadram-se como insumos farmacêuticos ativos de origem natural (IFAN), também são Produtos Florestais não Madeiros (PFNMs), que são recursos biológicos oriundos de florestas naturais, plantadas ou de sistemas agroflorestais e podem representar importante papel na vida de comunidades rurais e compor uma rede de mercado local e internacional (FERREIRA et al, 2016, MAGALHÃES, 2017).

Para que a utilização deste recurso possa atender os princípios da produção sustentável é necessário que pesquisas sejam realizadas com o objetivo de caracterizar populações de diferentes origens e procedências, a fim de estabelecer padrões de variações fenotípicas ou marcadores morfológicos que possam ser utilizados na seleção de material genético mais produtivo.

Neste sentido pode-se afirmar que estudos sobre a biometria de frutos e sementes inferem sobre a variabilidade fenotípica entre indivíduos da mesma espécie, e a correlação entre esta variabilidade e os fatores ambientais (GONÇALVES et al., 2013).

Segundo Leão et al (2016) pesquisas com frutos e sementes de espécies florestais nativas são voltados principalmente para fatores fisiológicos, em detrimento aos aspectos biofísicos, como a biometria, embora, aspectos morfométricos de frutos e sementes possam evidenciar a presença de variabilidade entre diferentes procedências e subsidiar a maximização dos recursos por meio da propagação de sementes de espécies florestais.

Análises biométricas de sementes apresentam-se como importantes ferramentas para detectar a variabilidade dentro e entre populações, além de atuarem como instrumentos na definição da relação de fatores ambientais e a variabilidade genética (GUSMÃO et al, 2006). O tamanho e as características das sementes são de grande importância para o estudo de determinadas espécies e são parâmetros básicos para o entendimento da dispersão, sobrevivência e estabelecimento de plântulas (COELHO et al, 2013).

Diante da importância desta espécie e a ampla utilização dos frutos como matéria prima (droga vegetal), torna-se importante caracterizar os atributos físicos e/ou morfométricos para verificar a variabilidade fenotípica ou diversidade carpológica em diferentes procedências (Pará, Maranhão, Amazonas) com tipologias climáticas distintas para verificar a influência do clima e a possibilidade de determinação de um morfotipo mais produtivo.



Figura 01 - *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz. A e B- Aspecto geral da árvore; C- Detalhe do caule; D e E-Aspecto geral de botões florais e flores; F-Detalhe dos frutos.

Fonte: (Santos, 2018)

## 2- MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletados frutos maduros durante os meses de julho e agosto nos anos de 2014 e 2015, em Belém/Pará (1° 44' 2,4" S e 48° 31' 30" W), Manaus/Amazonas (3° 23' 45,6" S e 60° 02' 16,8" W) e Pinheiro/Maranhão (2° 48' 3,6" S e 45° 06' 14,4" W). Para caracterizar as áreas de coleta, foi gerado um mapa de tipologia climática (Figura 02), utilizando bases de classificação de Köppen adaptado por Martorano et al (1993). Os frutos foram acondicionados e transportados para o Laboratório de Sementes Florestais (LASF) da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA.

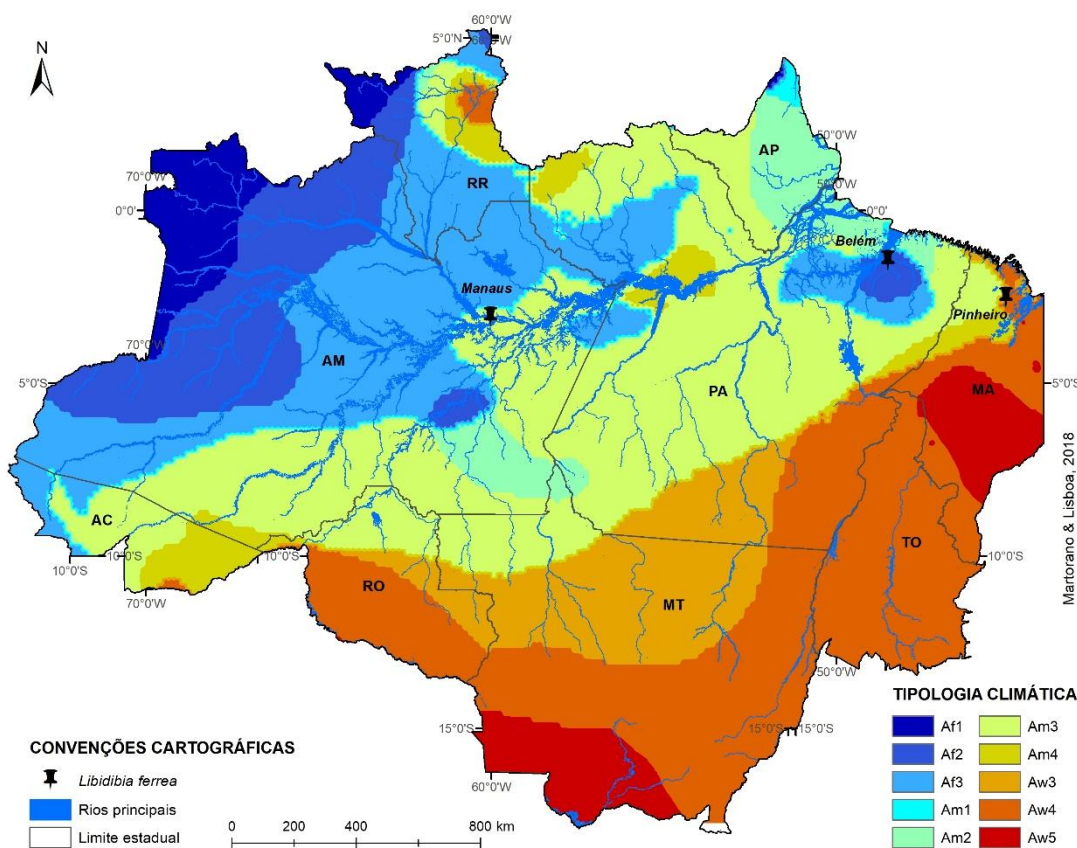


Figura 02 - Mapa de tipologia climática da Amazônia

Fonte: SIGClima- Embrapa Amazônia Oriental

Para a caracterização biométrica foram retiradas aleatoriamente 100 frutos, por procedência, para medição do comprimento, largura e espessura. Além disso, avaliou-se o número de sementes por fruto e a massa fresca. Para a biometria das sementes, foram utilizadas 100 unidades por procedência, considerando os mesmos parâmetros. Para as

medições de massa fresca utilizou-se balança analítica com precisão de 0,001 g, e, para as medições biométricas utilizou-se paquímetro digital, com 0,01 mm de precisão. Para a determinação do grau de umidade das sementes quiescentes foi determinado por meio do método de estufa a  $105 \pm 3$  °C durante 24 horas, conforme (BRASIL, 2009).

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5 % ( $p < 0,05$ ). As análises estatísticas foram realizadas através do *software* SISVAR 5.6 ®. Aos dados analíticos obtidos foram aplicados métodos de análise estatística exploratória, como análise de componentes principais (PCA) e análise de agrupamento hierárquico (HCA). A PCA tem a função de reduzir a dimensionalidade dos dados através da transformação das variáveis originais em novas variáveis denominadas componentes principais (PCs) que são geradas por meio de combinação lineares das variáveis originais e têm por característica a ortogonalidade e são geradas em ordem decrescente de máxima variância. Para o HCA foram calculadas as distâncias euclidianas, onde amostras mais próximas apresentam maior similaridade. As análises foram realizadas com o auxílio dos *softwares* PAST (Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis, Hammer, φ., Harper, D.A.T, Ryan, P.D. 2001), versão 3.14 e Minitab.Versão 17 (Minitab Inc., State College, PA, EUA).

### 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 - Aspectos da morfologia de sementes e frutos de *Libidibia ferrea*

A abordagem da variação fenotípica reúne ações que resultam na caracterização da diversidade morfológica e avaliação de características de produção como qualidade/resistência e tolerância a fatores bióticos e abióticos, neste sentido informações sobre morfologia de sementes e frutos podem fornecer subsídios para melhor entendimento dos processos relacionados ao manejo das espécies.

A morfologia dos frutos das procedências (Am, Af e Aw) figura 03, segue o padrão descrito para *Libidibia*, são legumes bacóides, 9-10 x 3-3,5 cm, oblongos, ápice acuminado, base atenuada, margem inteira, irregularmente constricta. A superfície dos frutos apresenta vários tricomas do tipo glandular quando observados em MEV, ressalta-se que esta característica ainda não havia sido registrada para frutos de *Libidibia ferrea*. O mesocarpo é pulposo, rico em tanino; endocarpo lenhoso, individualizado em câmaras monospermicas. Sementes 9-13, 10-12 x 7-8mm, obovado-elípticas, marrons, funículo filiforme, longo. Embrião com plúmula diferenciada em eófilos, emergências glandulares. As descrições seguiram os trabalhos realizados por (CÓRDULA et al, 2014; QUEIROZ, 2009).

As sementes de *Libidibia ferrea*, (Figura 04) são morfológicamente caracterizadas com tamanho médio de 0,9 x 0,5 x 0,5cm de coloração marrom a amarelado, opaca, de consistência firme e tegumento levemente rugoso. Formato ovóide a discóide, na base achatada e ápice arredondado. Hilo punctiforme e micrópila visível. Funículo branco filiforme (QUEIROZ, 2009; CÓRDULA, 2014).

Morfológicamente esta espécie apresenta algumas características que remetem ao seu centro de diversidade e ocorrência natural. São as características especiais de plantas de florestas secas como muitos estômatos pequenos por unidade de superfície, células epidérmicas pequenas, revestimento por tricomas e taninos. Seria possível afirmar que no material analisado das três tipologias climáticas, sendo que em duas delas as plantas eram cultivadas, a espécie preserva estas informações e talvez os morfotipos sejam semelhantes ao que ocorre na Caatinga.

Com relação aos frutos de *Libidibia ferrea*, estes apresentam características de espécies xerofíticas, de plantas que colonizam ambientes com restrição de água. A ocorrência de tricomas e cera epicuticular na superfície do epicarpo, além de poder ser usada na caracterização farmacognóstica também é um indicativo de adaptação evolutiva como sugerido por Barthlott (1981), onde o autor relaciona as protuberâncias e ornamentações na superfície de frutos e sementes com redução na contaminação por patógenos e pequenas partículas além de poder ajudar no controle da temperatura protegendo contra a luz solar.

Matos et al (2015), descreveram a dormência física em *Libidibia ferrea*, se referindo como um fator limitante que afeta a distribuição da espécie, retardando a germinação e dificultando a produção de mudas. De acordo com o autor muitas sementes de espécies florestais da família Fabaceae apresentam dormência física causada pela impermeabilidade do tegumento da semente à água. Estes autores evidenciaram em seus trabalhos as alterações morfo-anatômicas no tegumento da semente de *Libidibia ferrea* após escarificação química com uso de ácido sulfúrico. Com uso de MEV estes autores mostrou que a camada de células esclerificadas em paliçada sofreu alterações após exposição ao agente químico e pode ser comparado ao que ocorre neste trabalho, onde o uso de escarificação mecânica com lixa permitiu a redução da impermeabilidade facilitando o processo de embebição e consequente germinação, as imagens em MEV evidenciando as alterações na camada de paliçada no tegumento podem ser observadas na Figura 05.

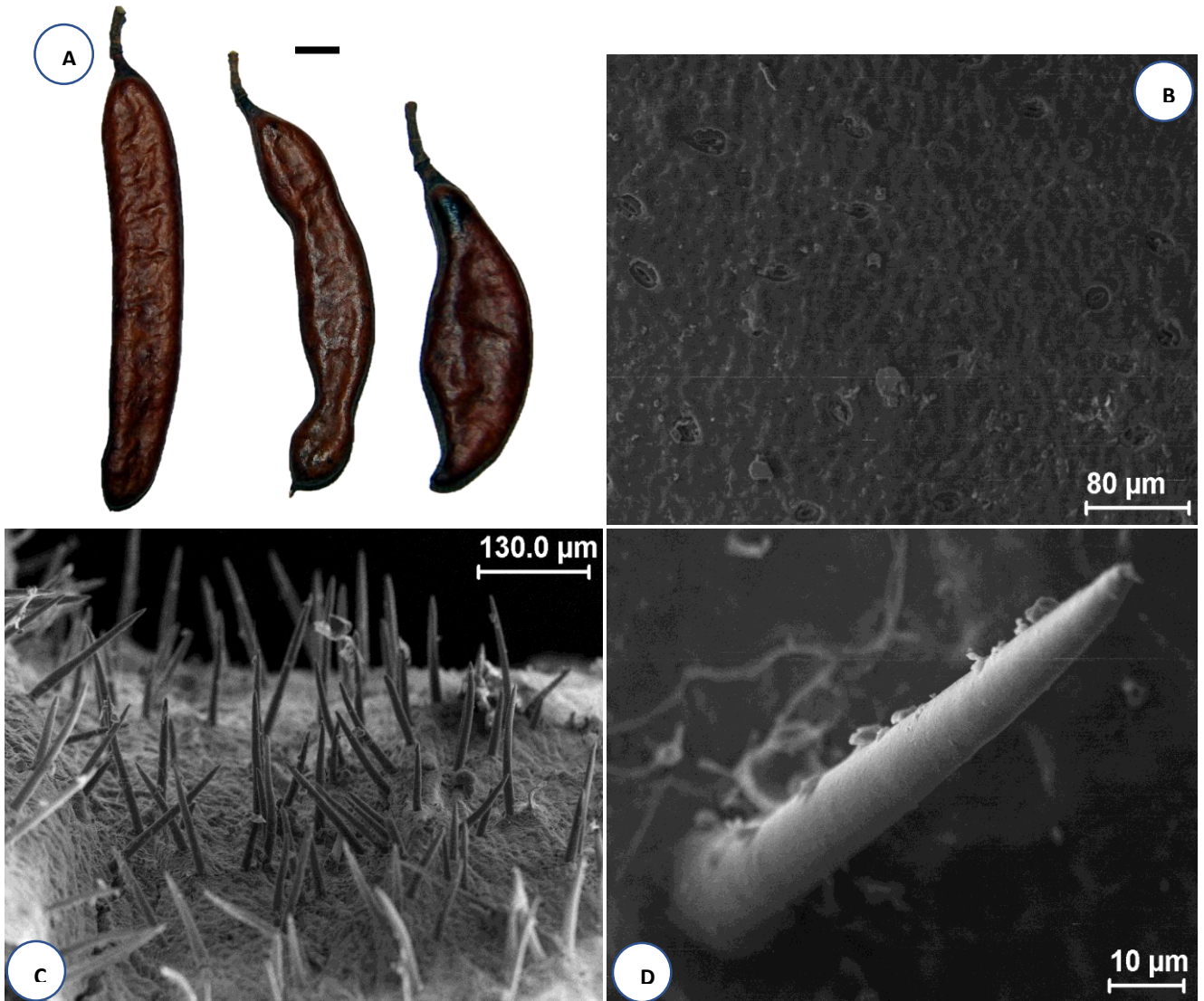


Figura 03- *Libidibia ferrea* A-Vista geral da morfologia dos frutos; B- Superfície do epicarpo em MEV (evidenciando cera epicuticular e estômatos), C e D-Tricomas na superfície do epicarpo e detalhe do tricoma glandular em MEV.

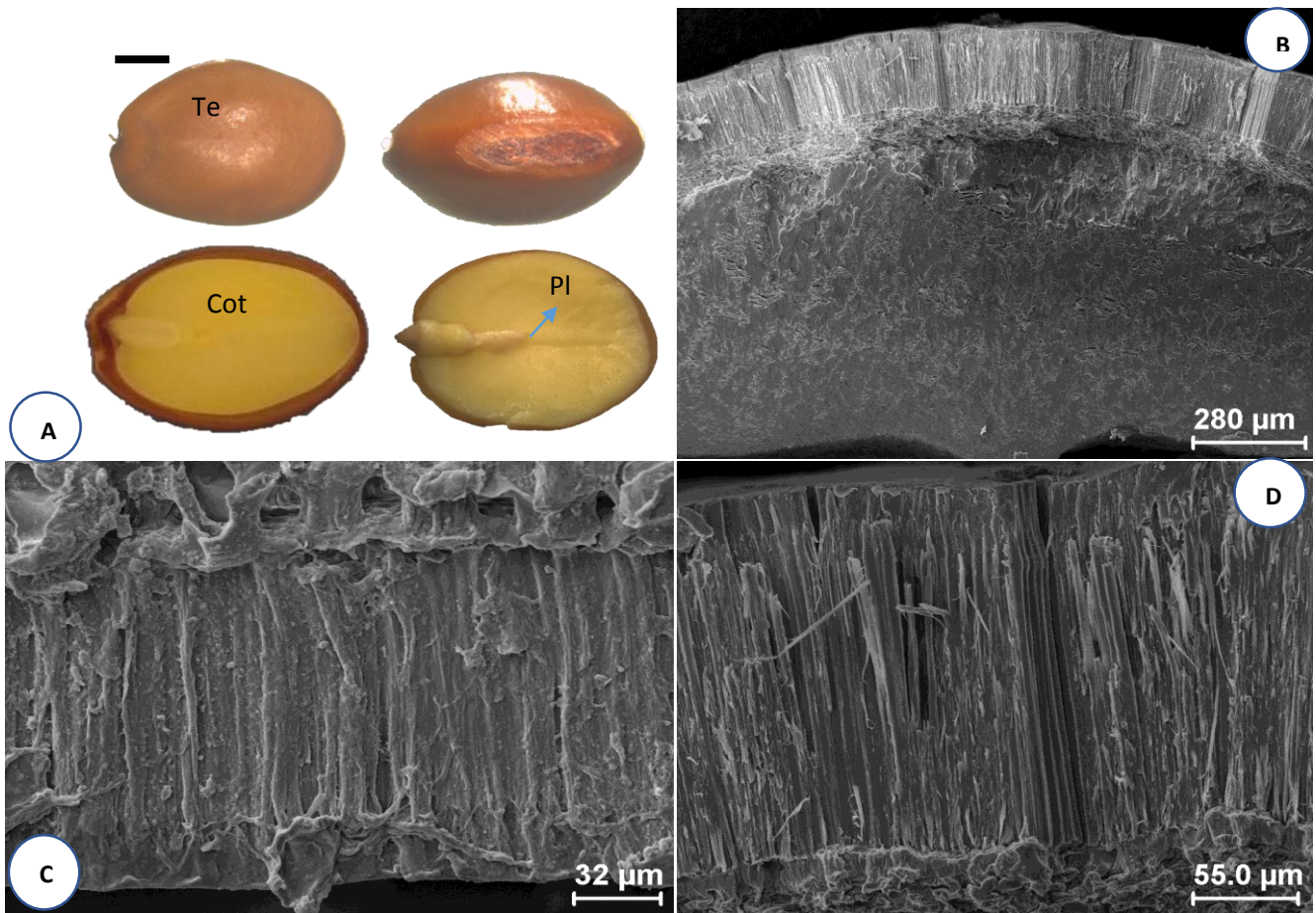


Figura 04 - *Libidibia ferrea* A- Detalhes da morfologia da semente (semente inteira, semente escarificada, semente em secção longitudinal), B-Vista geral dos tegumentos em MEV, C-Detalhe da camada de paliçada em MEV, D-Camada de paliçada após escarificação com lixa em MEV.

### 3.2 - Aspectos biométricos de *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz.

Trabalhos de caracterização morfológica e biométrica de frutos e sementes em Fabaceae, foram realizados por Duarte et al (2016), estes autores destacam que os estudos biométricos representam uma importante ferramenta de informação para o conhecimento da dispersão e estabelecimento de plântulas em florestas nativas, além de possibilitar a identificação de variabilidade genética dentro de populações da mesma espécie.

Silva et al (2017), ressaltam a importância de se obter o máximo de informações sobre os aspectos biométricos e comportamental de *Libidibia ferrea* de diferentes procedências, uma vez que as variações nos padrões morfológicos de um indivíduo estão relacionadas aos fatores genéticos e à influência das condições ambientais em que este se encontra.

A caracterização biométrica de sementes possibilita a análise de desvios na simetria de suas dimensões lineares e juntamente com outras técnicas de anatomia e morfologia e/ou fisiologia, constituem-se como informações importantes para ampliar o conhecimento sobre a biologia das espécies possibilitando seu uso em projetos de reposição vegetal (SANTIAGO; PAOLI, 2007).

Os valores médios para o teor de umidade de sementes das procedências dos estados do Pará, Maranhão e Amazonas iguais a 13,63%, 7,75% e 9,01%, respectivamente. Segundo Lima et al. (2017), o grau de umidade das sementes pode influenciar negativamente na germinação das mesmas, uma vez que baixos teores, em determinados casos, podem causar a morte do embrião. Além disso, é uma variável imprescindível em testes de laboratórios podendo influenciar diretamente no número de sementes por quilograma (SARMENTO et al., 2015). A tipologia climática estabelecida por Martorano et al, (1993) resultou em 10 divisões climáticas para a Amazônia, classificadas em Af (Af1, Af2, Af3), Am (Am1, Am2, Am3, Am4) e Aw (Aw3, Aw4 e Aw5), onde cada unidade apresenta condições específicas de precipitação e estações secas. A área de coleta do material proveniente do estado do Pará se enquadra como tipologia Af (subtipos Af1), caracteriza-se por não apresentar estação seca com precipitação do mês menos chuvoso igual ou superior a 60 mm e precipitação anual maior que 3.000 mm. Quanto a região de coleta do material procedente do Amazonas é uma tipologia Am (subtipo Am3) que possui estação seca moderada (3 meses) ocorrendo

precipitação mensal inferior a 60 mm, é considerado um clima intermediário entre Af e Aw e possui precipitação anual de 2000 a 2500 mm. No estado do Maranhão, a região de coleta se classifica como Aw, com inverno seco bem definido (6 meses) e ocorrência de precipitação mensal inferior a 60mm e precipitação anual de 1000 a 15000 mm.

O número de sementes por quilograma foi igual a 6.605, 6.990 e 8.282 unidades para o estado do Pará, Maranhão e Amazonas, respectivamente. Essa informação pode ser utilizada para planejar e estimar o potencial número de mudas, após o conhecimento da porcentagem de germinação. Adicionalmente, esse conhecimento é aplicado diretamente no comércio de sementes (BRASIL, 2009).

As análises descritivas dos parâmetros avaliados nos frutos e sementes de *Libidibia ferrea* estão apresentadas na Tabela 1. As variáveis de comprimento e massa fresca do fruto apresentaram maiores valores de coeficiente de variação para as três procedências estudadas, o estado do Pará apresentou os maiores valores, iguais a 20,49% (comprimento) e 28,30% (massa fresca do fruto). As sementes de todas as procedências avaliadas apresentaram o coeficiente de variação menor que 20%, considerado um coeficiente baixo. As do Pará destacaram-se por apresentar o maior coeficiente de variação para todas as variáveis, sendo a massa fresca das sementes com o maior valor (18,24%).

A variação no peso dos frutos pode estar relacionada à disponibilidade hídrica e de nutrientes, durante a formação dos frutos (PAOLI; BIANCONI, 2009; ROCHA et al., 2016). Andrade et al. (2016), trabalhando com frutos e sementes de *Libidibia ferrea* na região do semiárido, Município de Mossoró-RN, também destacaram frutos com ampla variabilidade em relação as características biométricas, cuja massa do fruto apresentou o maior valor de coeficiente de variação igual a 38, 26%, corroborando com os dados do presente estudo.

Tabela 01 - Parâmetros relacionados às características biofísicas de frutos e sementes de *Libidibia ferrea* para as procedências dos estados do Pará, Maranhão e Amazonas.

Parâmetro		Mínimo	Média	Máximo	Desvio padrão	CV (%)
<b>FRUTO</b>						
Pará	Comprimento (mm)	30,14	64,96	101,57	13,31	20,49
	Largura (mm)	14,31	18,52	23,55	1,58	8,52
	Espessura (mm)	6,13	9,46	11,48	1,12	11,84
	Massa (g)	1,93	4,69	8,74	1,33	28,30
Maranhão	Comprimento (mm)	55,64	87,91	124,20	13,12	14,93
	Largura (mm)	13,89	17,34	20,22	1,17	6,74
	Espessura (mm)	5,81	7,68	9,55	0,65	8,41
	Massa (g)	3,00	6,23	11,03	1,49	23,89
Amazonas	Comprimento (mm)	53,76	78,35	107,61	10,48	13,38
	Largura (mm)	13,31	15,71	19,32	0,98	6,24
	Espessura (mm)	4,07	7,37	9,23	0,96	13,00
	Massa (g)	2,10	4,15	7,77	0,99	23,92
<b>SEMENTE</b>						
Pará	Comprimento (mm)	2,35	7,84	9,23	0,97	12,44
	Largura (mm)	3,24	6,14	9,07	0,97	15,80
	Espessura (mm)	2,06	4,01	7,30	0,68	17,00
	Massa (g)	0,08	0,15	0,20	0,03	18,24
Maranhão	Comprimento (mm)	5,44	8,06	9,28	0,62	7,75
	Largura (mm)	5,00	6,20	7,38	0,42	6,75
	Espessura (mm)	2,27	3,85	4,72	0,40	10,30
	Massa (g)	0,07	0,14	0,18	0,02	13,47
Amazonas	Comprimento (mm)	6,20	8,24	9,70	0,62	7,57
	Largura (mm)	4,05	5,32	6,55	0,44	8,35
	Espessura (mm)	3,06	4,25	5,33	0,45	10,47
	Massa (g)	0,07	0,13	0,26	0,02	17,72

As três procedências apresentaram diferenças significativas entre todas as características biofísicas analisadas ( $p < 0,05$ ) (Figuras 2 e 3). Para os frutos, o comprimento apresentou a maior média para os provenientes do Maranhão, diferindo das demais procedências (Figura 6A), bem como as do Pará apresentou a menor média. As amostras oriundas do Pará apresentaram maiores médias para as variáveis largura (Figura 6B) e espessura (Figura 6C) dos frutos, diferindo dos demais tratamentos. Em relação a massa fresca do fruto (Figura 6D), as médias para o Maranhão foram superiores, diferindo significativamente do Pará e Amazonas.

Estudos realizados com frutos de *Dipteryx alata* (ZUFFO et al., 2014) e *Hymenaea Courbaril* (CAMPOS et al., 2018) evidenciaram a variabilidade fenotípica entre as procedências estudadas, corroborando com os resultados do presente estudo. Segundo

Pereira et al. (2015) e Duarte et al. (2012), a procedência é um fator que influencia nas características biométricas de frutos e sementes, pois estas apresentam variabilidade em função das condições ambientais durante sua formação.

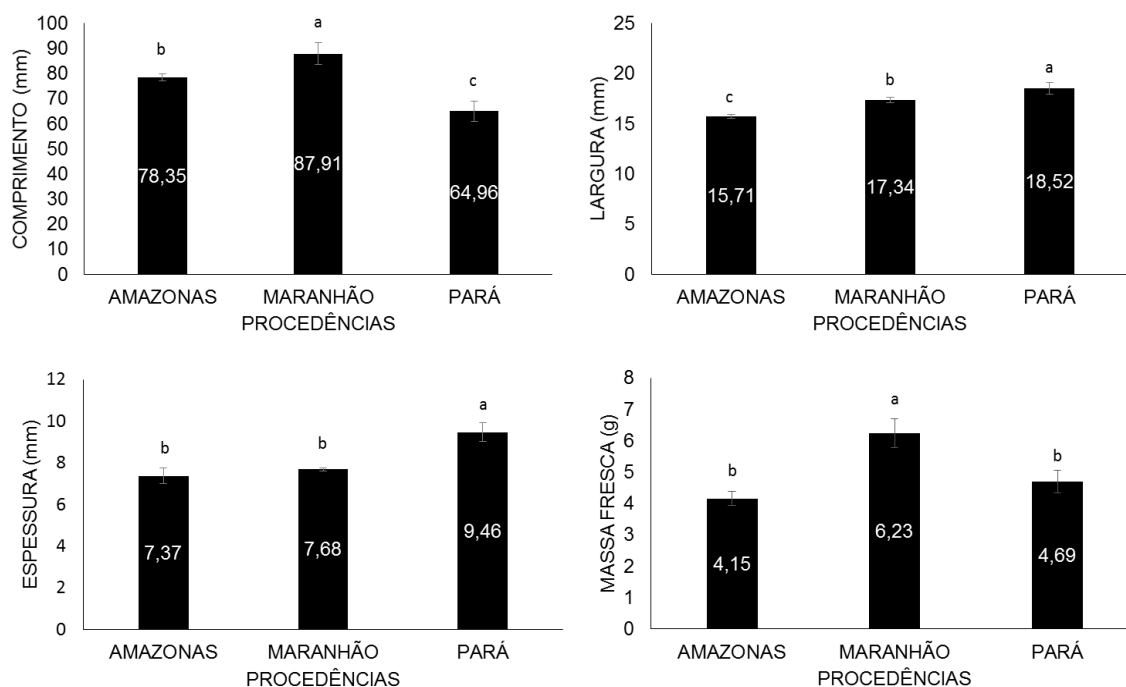


Figura 05 - Médias de Comprimento (A), Largura (B), Espessura (C), Massa Fresca (D) de frutos de diferentes procedências de *Libidibia ferrea*.

Para a biometria das sementes, o comprimento destacou maior média para a procedência do estado do Amazonas sendo esta não diferindo significativamente do estado do Maranhão, porém diferindo do estado do Pará, a qual apresentou menor média. Em relação à Largura das sementes, os estados do Maranhão e Pará não diferiram entre si, porém estes apresentaram diferença significativa em relação ao estado do Amazonas. Para a espessura, o estado do Amazonas se destacou com o maior valor, diferindo dos demais tratamentos. Quanto à massa fresca das sementes, a procedência do Pará apresentou a maior média diferindo dos demais estados.

Informações sobre a biometria de sementes fornecem informações sobre a dispersão e estabelecimento de mudas nas florestas nativas (RICKLI-HORST et al., 2017). Por outro lado, essas informações podem auxiliar na determinação de procedências com variabilidade genética necessária para produção de mudas com fins de recuperação de áreas degradadas.

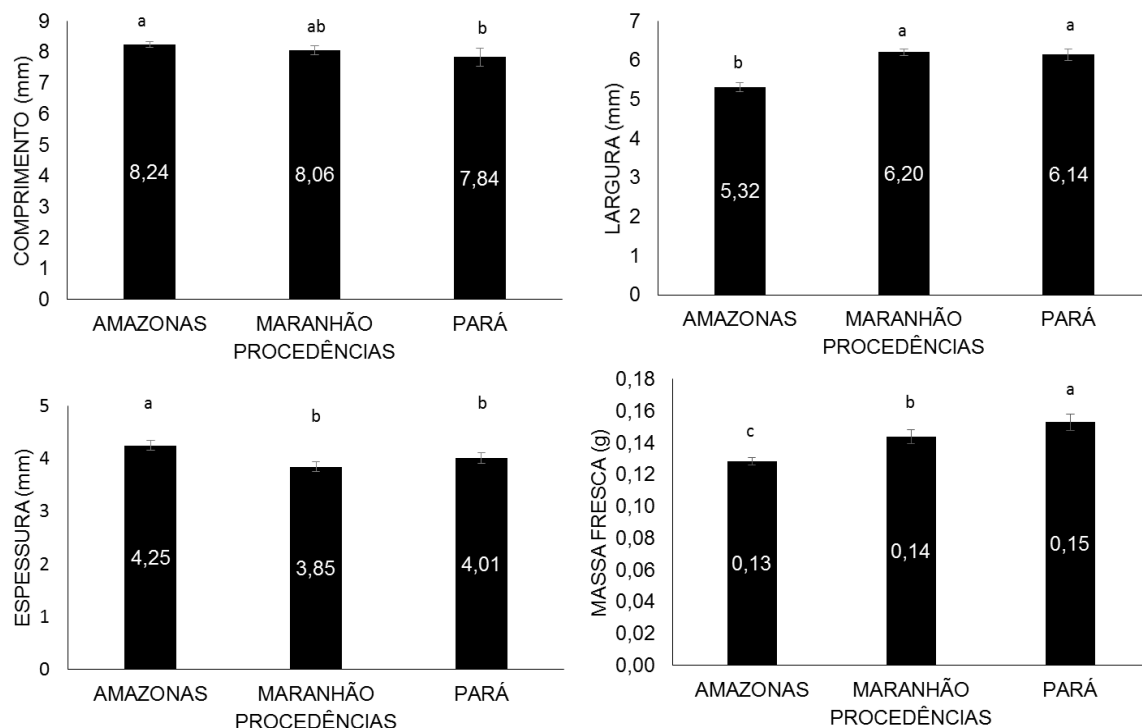


Figura 06 - Médias de comprimento (A), espessura (B), largura (C), massa fresca (D) de sementes de diferentes procedências de *Libidibia ferrea*.

Os resultados biométricos para frutos de *Libidibia ferrea*, coletados de matrizes dos três estados (Pará, Maranhão e Amazonas), mostrou que não existe diversidade carpológica entre os estados, os dados morfométricos não são suficientes para estabelecer diversidade fenotípica.

Características dos fenótipos de frutos e sementes são fundamentais não somente para estabelecer diferenças alométricas, mas também, para auxiliar na seleção de genótipos mais promissores. Lima et al, (2017); Ribeiro et al, (2009), com base nos trabalhos de Pennington et al, (2004), descreveram a ocorrência de um número significativo de espécies de leguminosas arbóreas em formações vegetais de ambientes com características de florestas estacionais secas e semidecíduas.

A variabilidade das características morfométricas dos frutos de *L. ferrea* pode ser interpretada com a utilização de técnicas de análise multivariada que permitam sintetizar as informações contidas em múltiplas características. A técnica de componentes principais permite reduzir a dimensionalidade contida nas variáveis originais a partir das

combinações lineares dos caracteres originais, representando o máximo da variação original (CRUZ et al, 2014; KRUALEE et al.,2013).

Para complementar a análise da discriminação de variabilidade fenotípica de *Libidibia ferrea* os resultados foram submetidos à PCA e HCA. As figuras (07 A e B) e (09 A e B) mostram a plotagem dos escores considerando as amostras de frutos e sementes das três procedências (Pará, Amazonas e Maranhão) e as variáveis utilizadas. A análise de componentes principais (PCA – Principal Component Analysis) consiste na aproximação de uma tabela de dados, ou seja, de uma matriz X, em termos da soma de várias matrizes  $M_i$  de posto 1, na qual posto significa um número que expressa a verdadeira dimensionalidade da matriz (MARTENS & NAES, 1989). De acordo com isto, uma matriz de dados foi construída usando-se os dados de biometria nas colunas e as amostras nas linhas. Esta avaliação foi realizada em dados auto escalonados devido às diferenças de grandeza e os principais objetivos desta técnica são o de encontrar relações entre objetos, e o de classificá-los de acordo com suas similaridades.

A HCA foi usada com o objetivo de verificar as semelhanças entre as amostras. Foi calculada a similaridade a partir da distância Euclidiana entre as amostras no espaço das variáveis. O resultado da HCA foi representado na forma de um gráfico bidimensional chamado de dendrograma, Figuras (08 e 10), onde se observa que não houve a formação de agrupamentos, não sendo possível separar grupos por afinidade de determinada característica.

A maioria das populações de plantas nativas não melhoradas é heterogênea e consiste em uma série de genótipos otimamente adaptados a diferentes aspectos do ambiente, podendo ser denominada de homeostase populacional (BORÉM e MIRANDA, 2013).

As características das plantas expressas pela sua morfologia ou composição química são decorrentes da evolução genética da espécie que na sua região de origem (centro de origem) sofreu processos de diversificação e de seleção ao longo do tempo. Os vegetais recebem influência pontual das condições climáticas que podem promover alguma variação, no entanto, em menor amplitude que as genéticas (MAGALHÃES, 2017).

As poucas variações observadas em *Libidibia ferrea* nas três tipologias climáticas (Am, Af e Aw) que levam em consideração a quantidade de chuvas, pode ter relação com a origem do material, pois o material do Pará e Amazonas são introduzidos e possivelmente veio da região nordeste e expressam o morfotipo característico daquela região.

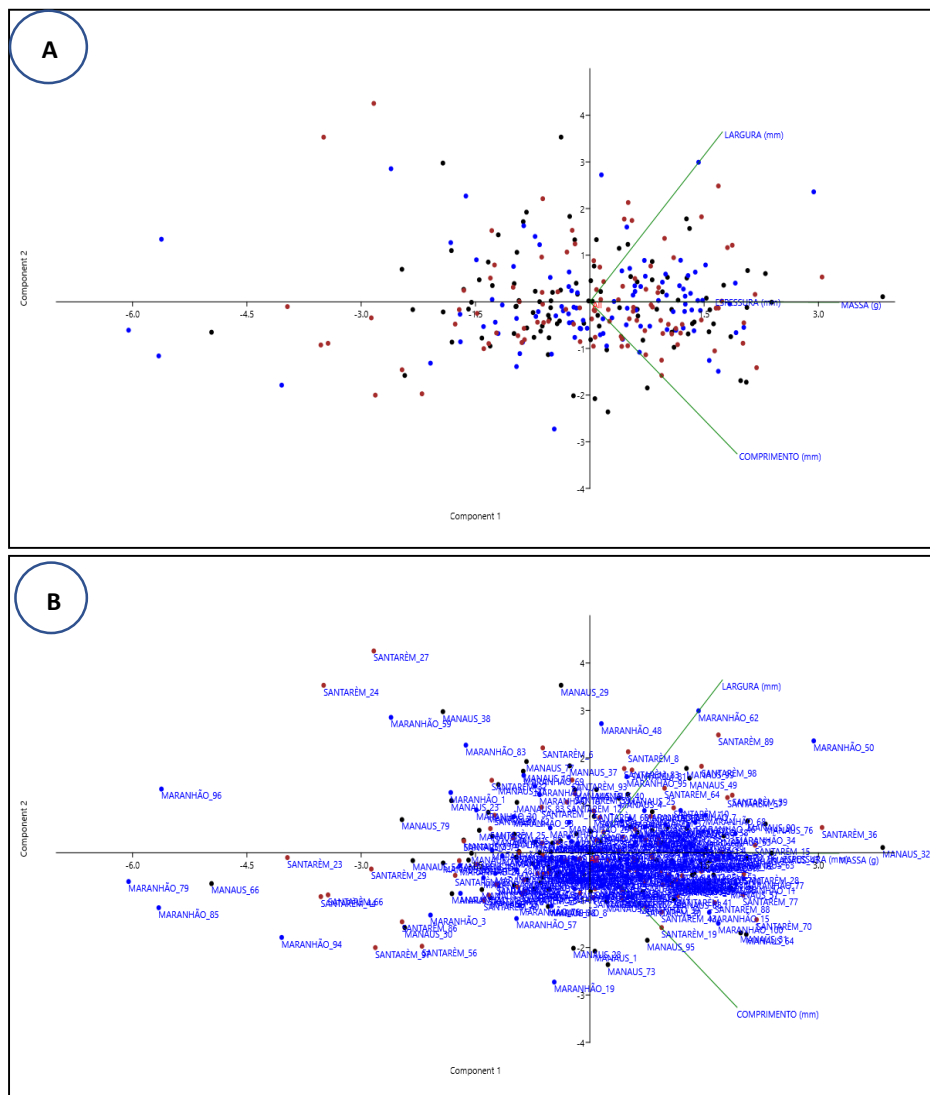


Figura 07 - Gráficos dos escores das variáveis biométricas marcadoras das amostras de sementes de *Libidibia ferrea*.

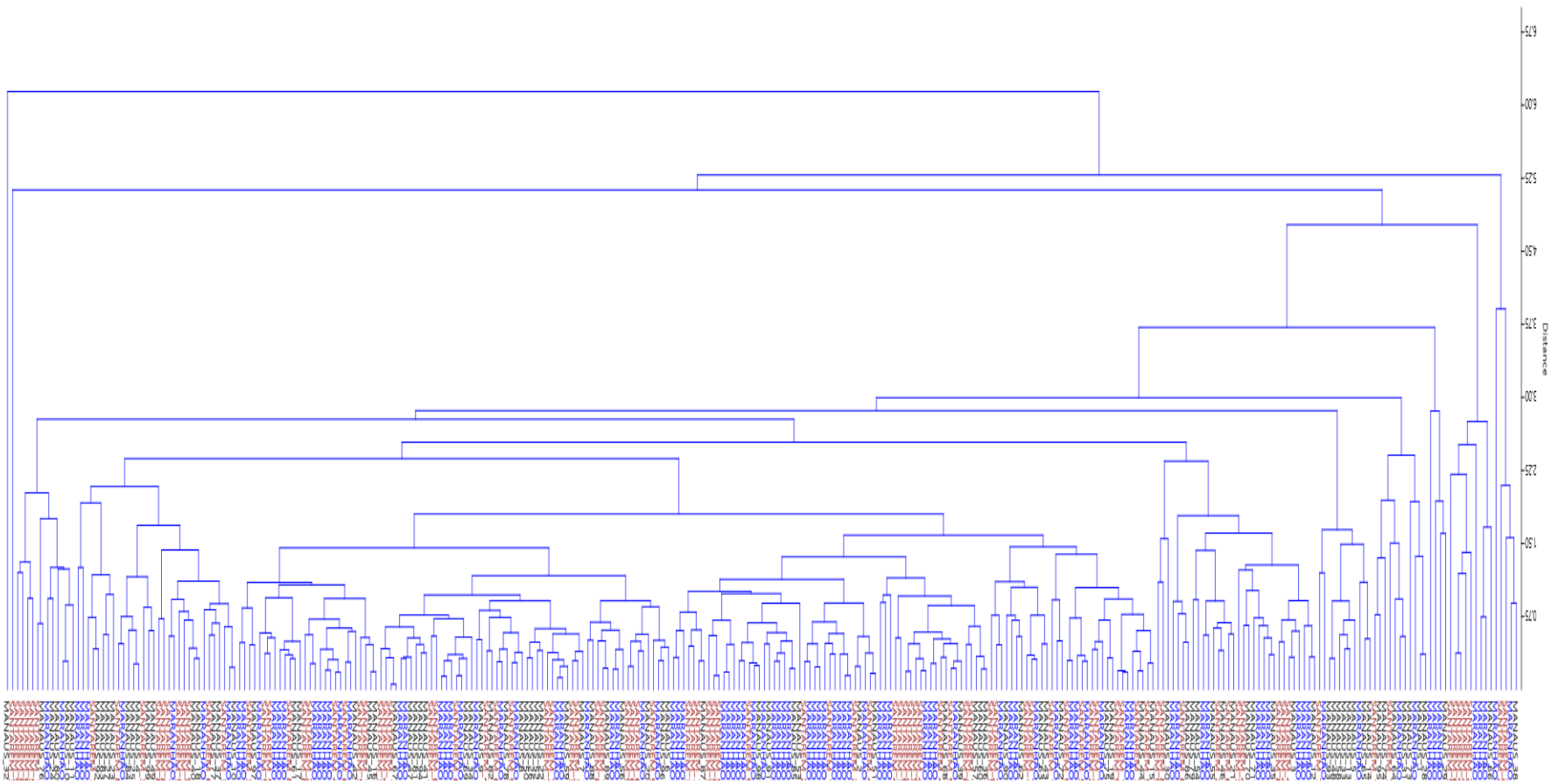


Figura 08- Dendrograma obtido a partir da análise hierárquica de cluster para amostras de 300 sementes de *Libidibia ferrea* de três procedências (Pará, Amazonas e Maranhão).



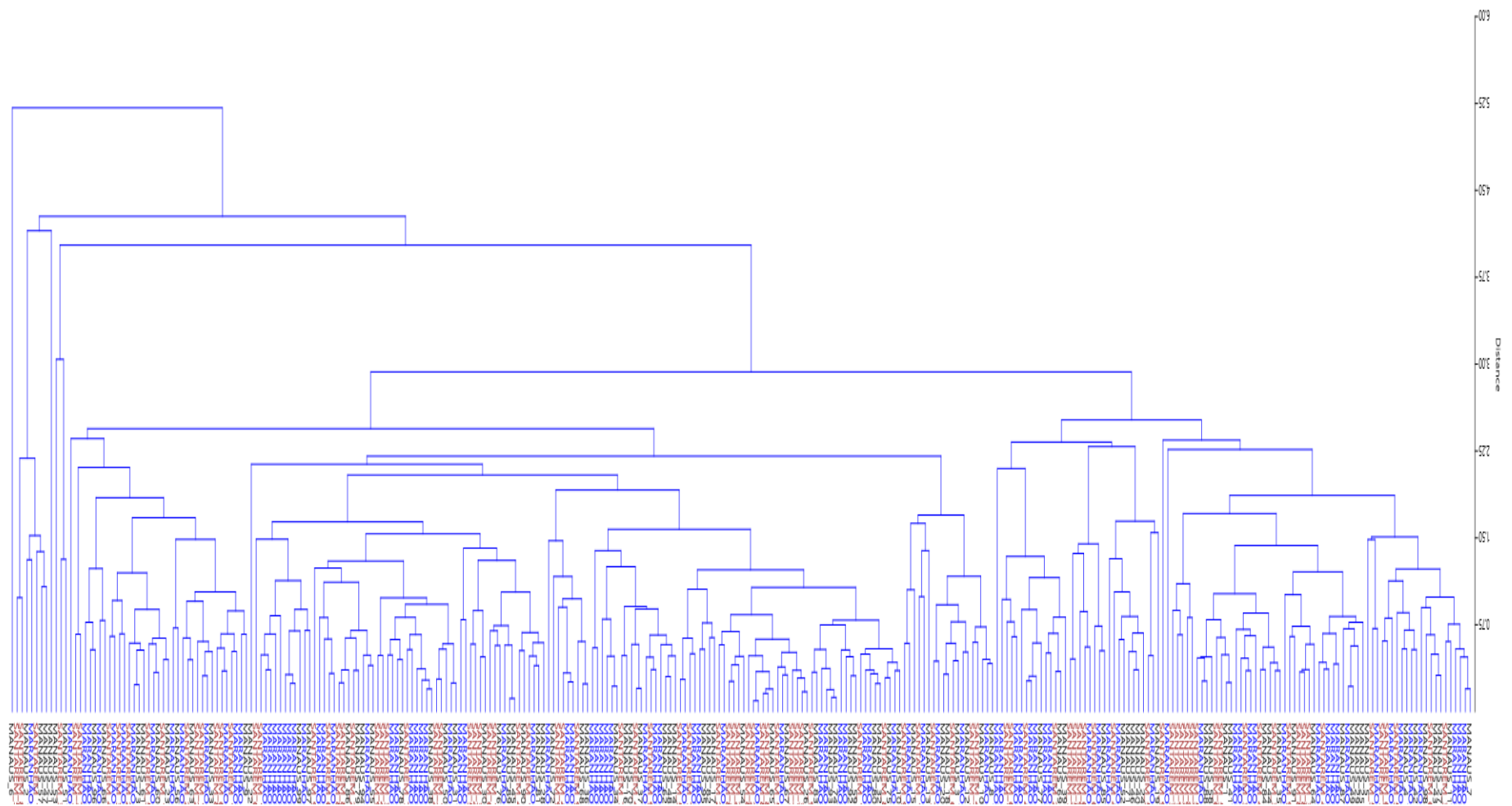


Figura 10 - Dendrograma obtido a partir da análise hierárquica de cluster para 300 amostras de frutos de *Libidibia ferrea* de três procedências (Pará, Amazonas e Maranhão).

#### 4 - CONCLUSÃO

Com base nos resultados da pesquisa podemos concluir que os frutos e sementes de *Libidibia ferrea* provenientes das três tipologias climáticas (Af, Aw e Am) apresentam pouca variação quanto as características biométricas e que por meio das análises PCA e HCA não foi possível inferir variabilidade fenotípica.

Frutos e sementes de *Libidibia ferrea* coletadas em três regiões diferentes com tipologias climáticas distintas não revelaram diversidade carpológica, não sendo possível estabelecer marcadores morfológicos para padrões de matéria prima.

A origem do material coletado deve ser considerada quando se pensar na introdução de *Libidibia ferrea* em programas de restauração e/ou plantio comercial, dando preferência à coleta em regiões com tipologias climáticas que se assemelham à região de origem da espécie, como evidencia o estudo.

## 5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, L. I. F.; LIMA, J. S. S.; OLIVEIRA, K. J. B.; SOARES, A. P. S.; SILVA, J. N. Biometria de vagens e viabilidade de sementes de jucá (*Caesalpinia ferrea* M.) no semiárido. **Agropecuária Científica no semi-árido**, v. 12, p. 73-82, 2016.

ARAÚJO NETO, J. C.; CAMARA, C. A.; FERREIRA, V. M.; LESSA, B. F. T.; OLIVEIRA, Y. M. Morphometric characterization, germination and conservation of *Caesalpinia pulcherrima* (L) SW. (Fabaceae: Caesalpinioidea) seeds. **SEMINA (LONDRINA)**, v. 1, p. 2287-2299, 2014.

BARTHLOTT, W. Epidermal and seed surface characters of plants: systematic applicability and some evolutionary aspects. **Nordic Journal of Botany**, v. 1, n. 3, p. 345-355, 1981.

BORÉM, A.; MIRANDA, G.V. **Melhoramento de plantas**. 6.ed. Viçosa: (Ed). UFV, 2013. 523 p.

CÂMARA, F. A. A.; TORRES, S. B.; GUIMARÃES, I. P.; OLIVEIRA, M. K. T.; OLIVEIRA, F. A. Biometria de frutos e sementes e superação de dormência de jucá *Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul (Leguminosae-Caesalpinioideae). **Caatinga**, Mossoró-RN, v. 21, n. 4, p.172-178, 2008.

CARVALHO, C. M. S.; TORRES, B. S.; BENEDITO, P. C.; NOGUEIRA, W. N.; SOUZA, T. A. A.; NETA, S. L. M. Viabilidade de *Libidibia ferrea* (Mart. Ex Tul) L.P Queiroz var. *ferrea* avaliada pelo teste de tetrazólio. **Journal of seed Science**, v. 39, n. 1, p. 007-012, 2017.

COELHO, M. F. B.; CAVALCANTE NETO, M. H.; BARBOSA, M. K. R.; OLIVEIRA, M. C.; LIMA, A. K. B. Superação da dormência em sementes de *Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. var. *ferrea* de duas populações. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Mossoró, v. 8, n. 4, p. 179-182, 2013.

COELHO, M. F. B.; MAIA, S. S. S.; OLIVEIRA, A. K.; DIÓGENES, F. E. P. Superação da dormência tegumentar em sementes de *Caesalpinia ferrea* Mart ex Tul. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 5, n. 1, p. 74- 79, 2010.

CÓRDULA, E; MORIM, M; ALVES, M. Morfologia de frutos e sementes de Fabaceae ocorrentes em uma área prioritária para a conservação da Caatinga em Pernambuco, Brasil. **Rodriguésia**. 65. 505-516. 2014.

CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S.; REGAZZI, A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 3. ed. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2014. 668 p.

DUARTE, M. M.; MILANI, J. E. F.; BLUM, C. T.; NOGUEIRA, A. C. Germinação e morfologia de sementes e plântulas de *Albizia edwallii* (Hoehne) Barneby & J. W. Grimes. **Revista Caatinga**, v. 28, n. 3, p. 166-173, 2015.

DUARTE, M. M.; PAULA, S. R. P.; FERREIRA, F. R. L.; NOGUEIRA, A. C. Morphological characterization of fruit, seed and seedling and germination of *Hymenaea courbaril* L. (Fabaceae) (Jatobá). **Journal of Seed Science**, v. 38, n. 3, p. 204-211, 2016.

FERREIRA, R. A.; BARRETO, S. S. B. Caracterização morfológica de frutos, sementes, plântulas e mudas de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lamarck). **Revista Árvore**, v. 39, n. 3, p. 505-512, 2015.

FERREIRA, M. R.; FERNANDES, M. T.; SILVA, W. A.; BEZERRA, I. C.; SOUZA, T. P., PIMENTEL, M. F.; SOARES, L. A. L. Chromatographic and spectrophotometric analysis of phenolic compounds from fruits of *Libidibia ferrea* Martius. **Pharmacognosy magazine**, v. 12, n. Supl. 2, p. S285-S291, mai. 2016.

GAGNON, E.; LEWIS, G. P.; SOTUYO, J. S.; HUGHES, C. E.; BRUNEAU, A. A molecular phylogeny of *Caesalpinia* sensu lato: Increased sampling reveals new

insights and more genera than expected. **South African Journal of Botany**, v. 89, p. 111-127, 2013.

GALDINO, G.; MESQUITA, M. R.; FERRAZ, I. D. K. Descrição morfológica da plântula e diásporos de *Caesalpinia ferrea* Mart. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, RS, v. 5, n. 2, p. 747-74, 2007.

GUSMÃO, E.; VIEIRA, F. A.; FONSECA-JUNIOR, E. M. Biometria de frutos e endocarpos de murici (*Byrsonima verbascifolia* Rich. Ex. A. Juss). **Revista Cerne**, Lavras, v. 12, n. 1, p. 84-91, jan/mar, 2006.

KRUALEE, S.; SDOODE, E.; EKSOMTRAMAGE, T.; SEREEPRASET, V. Correlation and path analysis of palm oil yield components in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq). **Kasetsart J. (Nat. Sci.)**, v. 47, p. 528-533, 2013.

LEWIS, G. P. *Caesalpinia: a revision of the Poincianella-Erythrostemon group*. 1 ed. Richmond: Royal Botanic Gardens (K-RBG), 233 p. 1998

LEWIS, G. P. Tribe Caesalpinieae. In: LEWIS, G.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. (Ed.) **Legumes of the World**. Kew, Royal Botanic Gardens, p. 127-161, 2005.

LIMA, J. R.; SANTOS, N. D.; TOZZI, A. M. G. A.; MANSANO, V. F. Using legumes as indicators in the seasonally dry vegetation types in South America. **Ecological indicators**, v. 73, p. 708-715, 2017.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Editora Plantarum, 2008

MARTENS, N.; NAES, T. **Multivariate calibration**. New York: John Wiley & Sons. 1989.

MATOS, A. C. B.; ATAÍDE, G. M.; BORGES, E. E. L. Physiological, physical, and morpho-anatomical changes in *Libidibia ferrea* ((Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz) seeds after overcoming dormancy. **Journal of Seed Science**, v. 37, n. 1, p. 26-32, 2015.

MORGANO, M. A.; QUEIROZ, S. C. N.; FERREIRA, M. M. C. Aplicação da análise exploratória na diferenciação de vegetais. **Brazilian Journal of food technology**, v. 2, n. 1-2, p. 73-79, 1999.

NOGUEIRA, N. W.; MARTINS, H. V. G.; BATISTA, D. S.; RIBEIRO, M. C. C. Grau de dormência das sementes de jucá em função da posição na vagem. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Mossoró, RN, v. 5, n. 1, p. 39-42, 2010.

OLIVEIRA, K. J. B.; LIMA, J. S. S.; ANDRADE, L. I. F., NOVO JUNIOR, J.; BENEDITO, C. P.; CRISPIM, J. F. Métodos para superação da dormência tegumentar em sementes de *Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. **Revista verde de agroecologia e desenvolvimento sustentável**, v. 12, p. 648-654, 2017.

PENNINGTON, R.T., LAVIN, M., SARKINEN, T.; LEWIS, G. P., KLITGAARD, B. B.; HUGHES, C. E. Contrasting plant diversification histories within the Andean biodiversity hotspot. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, U.S.A., v. 107, v. 13783-13787, 2010.

PRANCE, G.T; SILVA, M.F. Árvores de Manaus. Manaus. Editora do 1975.

PEREIRA, S. R.; GIRALDELLI, G. R.; LAURA, V. A.; SOUZA, A. L. T. Tamanho de frutos e de sementes e sua influência na germinação de jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* var. *stigonocarpa* Mart. Ex Hayne, Leguminosae – Caesalpinoideae). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina-PR, v. 33, n. 1, p. 141-148, 2011.

QUEIROZ, L. P. **Leguminosas da Caatinga**. 2. ed. Feira de Santana: Universidade Estadual de Feira de Santana, 2009. 443 p.

RIBEIRO, R. D.; LIMA, H. C. Riqueza e distribuição geográfica de leguminosas arbóreas e implicações para conservação no Centro de Diversidade de Cabo Frio, Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguesia**, v. 60, p. 111-127, 2009.

SANTIAGO, E. F.; PAOLI, A. A. S. Respostas morfológicas em *Guibourtia hymenifolia* (Moric.) J. Leonard e *Genipa americana* L. submetidas ao estresse por deficiência nutricional e alagamento do substrato. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 30, n. 1, p. 131-140, 2007.

SILVA, R. M.; CARDOSO, A. D.; DUTRA, F. V.; MORAIS, O. M. Aspectos biométricos de frutos e sementes de *Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. Provenientes do semiárido baiano. **Revista de Agricultura Neotropical**, Cassilândia-MS, v. 4, n. 3, p. 85-91, 2017.

## ***CAPÍTULO II***

**Análise da distribuição de substâncias fenólicas e localização *in situ* em plântulas de *Libidibia ferrea* (M. ex Tul.) L.P. Queiroz (Leguminosae-Caesalpinioideae).**

## **Análise da distribuição de substâncias fenólicas e localização *in situ* em plântulas de *Libidibia ferrea* (M. Ex Tul.) L.P. Queiroz (Leguminosae-Caesalpinioideae).**

### **RESUMO**

*Libidibia ferrea*, é uma leguminosa arbórea com distribuição e ocorrência natural em florestas estacionais decíduas e matas secas da caatinga. Na Amazônia é cultivada e possui uso difundido em função das propriedades antifúngicas, antibacterianas, antiulcerogênicas, anti-inflamatórias e cicatrizantes atribuídas a determinados grupos de metabólitos como flavonóides, esteroides, ácidos fenólicos e taninos. Plântulas representam um estágio de desenvolvimento muito especial na vida da planta e podem expressar características importantes do genótipo e quimiotipos promissores. Com objetivo de avaliar a ocorrência e distribuição dos compostos fenólicos nas plântulas de *Libidibia ferrea* em especial o ácido gálico, foram utilizadas técnicas de cromatografia gasosa e espectrometria de massas (CG/EM) e histoquímica vegetal para a determinação dos compostos fenólicos presentes nos extratos e tecidos de *Libidibia ferrea*. Os compostos fenólicos foram identificados em folíolos e raízes de plântulas de jucá, dentre os principais compostos fenólicos foram determinados, o ácido gálico, ácido ferrúlico e ácido cafeico, com concentrações diferentes, o perfil metabólico das plântulas do Pará assemelham-se com material procedente do Maranhão enquanto que as amostras do Amazonas evidenciaram diferenças nas quantidades de compostos. O único composto fenólico encontrado em todas as procedências foi o ácido gálico, do ponto de vista estrutural e histoquímico as plântulas apresentaram um padrão semelhante.

**PALAVRAS-CHAVE:** cromatografia, fenólicos, histoquímica, leguminosas, metabólitos.

**Analysis of the distribution of phenolic substances and in situ localization in seedlings of *Libidibia ferrea* (M. ex Tul.) L.P. Queiroz (Leguminosae-Caesalpinioideae).**

**ABSTRACT**

*Libidibia ferrea* is a leguminous tree with distribution and natural occurrence in deciduous seasonal forests and dry forests of the Caatinga. In the Amazon, this species is cultivated and has widespread use due to the antifungal, antibacterial, antiulcerogenic, anti-inflammatory and cicatrizant properties attributed to certain groups of metabolites such as flavonoids, steroids, phenolic acids and tannins. Seedlings represent a very special stage of development of the plant life and may express important characteristics of the genotype and promising chemotypes. The objective of this study was to analyze the occurrence and distribution of phenolic compounds in *Libidibia ferrea* seedlings, especially gallic acid, using gas chromatography and mass spectrometry (GC / MS) and plant histochemistry techniques for the determination of the phenolic compounds present in extracts and tissues of *Libidibia ferrea*. The phenolic compounds were identified in leaflets and roots of jucá seedlings, among the main phenolic compounds were determined gallic acid, ferric acid and caffeic acid, with different concentrations, the metabolic profile of Pará seedlings resemble the material coming from Maranhão while the material from Amazonas showed differences in the amounts of compounds. The only phenolic compound found in all provenances was gallic acid; from a structural and histochemical point of view, the seedlings presented a similar pattern.

**KEY WORDS:** metabolites, phenolic, legumes, chromatography, histochemistry

## 1 - INTRODUÇÃO

A produção de metabólitos secundários é o resultado de complexas interações entre biossíntese, transporte, estocagem e degradação (SANTOS, 1999, WINK, 2013). Cada um desses processos, por sua vez, é controlado por determinados genes e sofrem influências de fatores como hereditariedade, ontogenia (estágio de desenvolvimento) e pressões ambientais.

Os metabólitos secundários possuem ocorrência restrita a certos grupos taxonômicos, são biossintetizados por um número delimitado de vias metabólicas e, mesmo não sendo essenciais para as atividades celulares, desempenham papel fundamental nos processos de regulação e proteção, assegurando a sobrevivência dos organismos em um determinado ambiente.

Embora, qualquer tecido ou célula vegetal tenha a capacidade de biossintetizar metabólitos secundários, evidências mostram que isso ocorre somente em alguns tecidos ou mesmo células especiais, em função do nível de diferenciação e desenvolvimento dos mesmos. Em alguns casos, a produção pode ser restrita a um estágio específico do desenvolvimento do vegetal ou de uma condição climática e ecológica específica (SANTOS 1999; WINK, 2012).

A síntese e armazenamento de metabólitos secundários são consideradas estratégias para defesa e comunicação nos vegetais. Plantas são sésseis e não podem fugir quando atacadas por herbívoros, nem possuem sistema imunológico complexo para proteção contra bactérias, fungos, vírus e parasitas. A Defesa contra herbivoria, patógenos e competição com plantas, são situações responsáveis pela produção diversa de metabólitos com ampla gama de propriedades farmacológicas e toxicológicas (WINK, 2010, 2012).

O local de biossíntese dos metabólitos secundários é restrito a um órgão, enquanto que o armazenamento ocorre em diferentes estruturas e tecidos. Wink (2010) fez uma síntese sobre o armazenamento destas substâncias separando os metabólitos em dois Grupos: metabólitos secundários hidrofílicos e metabólitos secundários lipofílicos. No caso de compostos hidrofílicos, os vacúolos, laticíferos e apoplastos/parede celular seriam os locais de estocagem de muitos alcaloides, compostos nitrogenados, saponinas, glicosídeos, flavonoides, antocianinas, taninos, glucosinolatos e aminas. Os compostos

lipofílicos teriam a cutícula, tricomas, dutos de resinas, laticíferos, idioblastos e plastídios da membrana como possíveis locais de armazenamento para ceras, terpenóides, monoterpenos, sesquiterpenos, quinonas, diterpenos e antraquinonas.

Em geral células jovens apresentam baixa especificidade e conseqüentemente suas organelas ainda não apresentam compartimentação adequada para o desenvolvimento de rotas biossintéticas específicas e por isso, a probabilidade encontrar substâncias do metabolismo primário é muito maior do que substâncias do metabolismo secundário.

Desto desta ótica a investigação do perfil metabólico de plantas em desenvolvimento nos assegura afirmar com maior precisão qual o estágio, ou melhor, período do desenvolvimento as substâncias do metabolismo secundário, principalmente compostos fenólicos iniciam sua produção e armazenamento nos tecidos. Ressalta-se que para este fenômeno ocorrer, as células devem apresentar especificidades, ou seja, sua compartimentalização deve estar em um estágio avançado para tanto é necessário um acompanhamento morfoanatômico associado às técnicas de metabolômica.

Este trabalho teve como objetivo, aplicar técnicas de cromatografia e de histoquímica vegetal para identificar a ocorrência de compostos fenólicos em especial ácidos fenólicos e taninos nos tecidos de raízes e folíolos de plântulas de três regiões com tipologias climáticas diferentes, com ênfase na distribuição e localização espacial destes compostos.

## 2 - MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 - Coleta do material botânico

Foram coletados frutos maduros durante os meses de julho e agosto nos anos de 2014 e 2015, na cidade Belém/Pará (1° 44' 2,4" S e 48° 31' 30" W), Manaus/Amazonas (3° 23' 45,6" S e 60° 02' 16,8" W) e Pinheiro/Maranhão (2° 48' 3,6" S e 45° 06' 14,4" W). Para caracterizar as áreas de coleta, foi gerado um mapa de tipologia climática (Figura 02), utilizando bases de classificação de Köppen adaptado por Martorano et al (1993), que resultou em 10 divisões climáticas, classificadas em Af (Af1, Af2, Af3), Am (Am1, Am2, Am3, Am4) e Aw (Aw3, Aw4 e Aw5), onde cada unidade apresenta condições específicas de precipitação e estações secas.

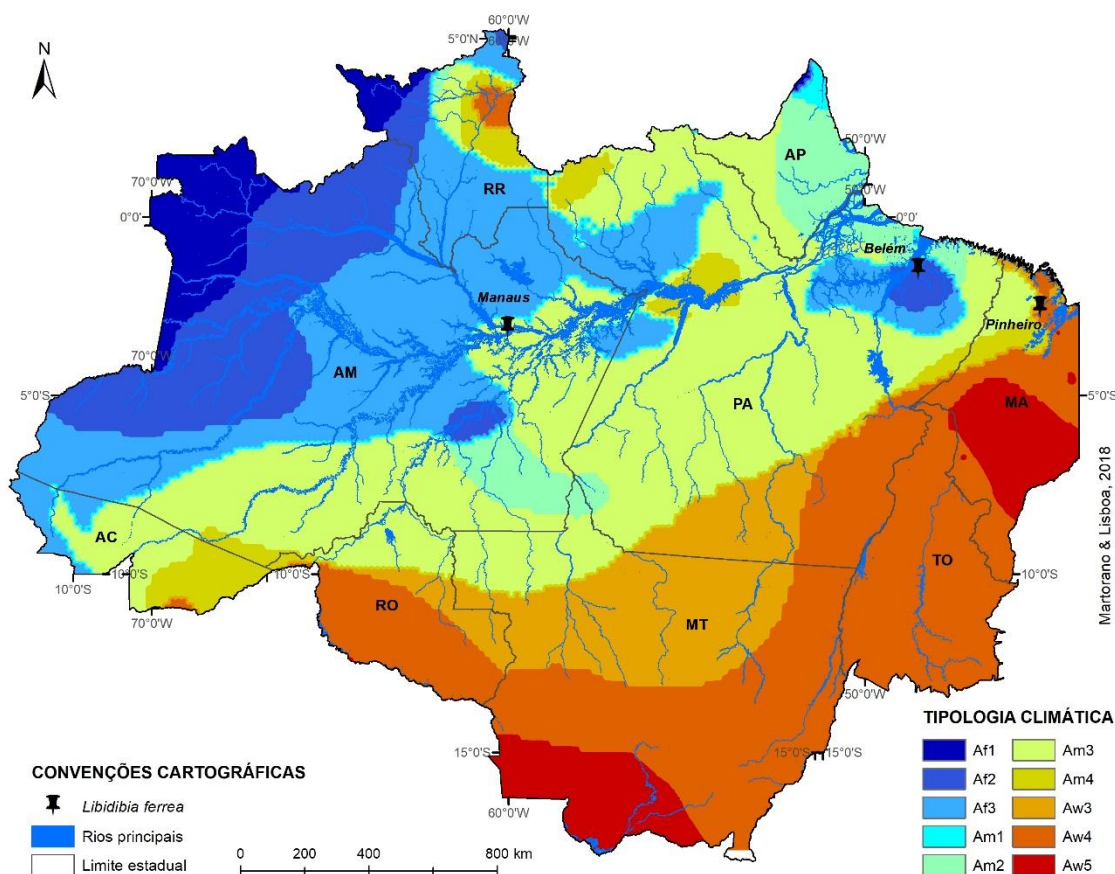


Figura 01 - Mapa de tipologia climática da Amazônia

Fonte: SIGClima-Embrapa Amazônia Oriental

## **2.2- Obtenção de plântulas e extratos**

O beneficiamento dos frutos foi realizado no Laboratório de Sementes Florestais (LASF) da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA. Um lote de sementes de cada procedência foi retirado aleatoriamente para produção de plântulas. A assepsia das sementes e o tratamento pré-germinativo para a quebra da dormência tegumentar seguiram as recomendações das instruções para análise de sementes de espécies florestais (Brasil, 2013). Posteriormente, as sementes foram distribuídas em bandejas, em substrato constituído de uma mistura de areia e serragem esterilizadas na proporção de 1:1. De cada procedência foram utilizadas 100 sementes constando de quatro repetições de 25 sementes. As bandejas foram mantidas em local semi-sombreado e irrigadas duas vezes ao dia, sendo realizada a contagem diária do número de plântulas. As plântulas geradas foram coletadas com 25 dias de cultivo, foram selecionados os indivíduos considerados plântulas normais que apresentavam suas estruturas essenciais (sistema radicular e parte aérea), posteriormente as amostras foram desidratadas em estufa com circulação e renovação de ar, à temperatura de 45 °C, durante 48 horas. Após a completa desidratação, o material foi pulverizado em moinhos de facas e armazenado ao abrigo de luz e umidade. Para a obtenção dos extratos brutos, foram realizadas extrações com solventes de diferentes polaridades (Hexano, Clorofórmio, Acetato de etila, e hidroalcolico 70%) com auxílio de ultrassom em temperatura de 45 graus por 30 minutos, seguindo metodologias utilizadas no Laboratório de Investigação Sistemática em Biotecnologia e Biodiversidade Molecular/Labsisbio da UFPa.

## **2.3- Obtenção do perfil químico do extrato hidroalcolico de folíolos e raízes de plântulas de *Libidibia ferrea*.**

Uma amostra de cada um dos extratos secos de folíolos e raízes, provenientes de cada procedência, foram pesadas e transferidas para tubos cônicos de volume de 2 mL e submetidas aos processos de hidrólise alcalina, hidrólise ácida e derivatização por sililação. Os processos descritos abaixo são referentes às metodologias para análise de compostos fenólicos desenvolvidas no Laboratório de Investigação Sistemática em Biotecnologia e Biodiversidade Molecular/Labsisbio da Universidade Federal do Pará.

## **2.4 - Hidrólise e extração dos compostos fenólicos**

Para o processo de extração dos compostos fenólicos, 50mg do extrato hidroalcoólico foi submetido a hidrólise alcalina, com agitação assistida por ultrassom, durante 30 min à temperatura de 60 °C, por meio da adição de 400 µL de NaOH 4M, em um frasco cônico de 2 mL com tampa. A homogeneização do sistema foi realizada através da agitação em vortex por 2 min. Em seguida, foram adicionados 500 µL de HCl 6M, agitou-se em vortex por 2 min e mensurou-se à pH 2. Em seguida, o sistema foi submetido a agitação assistida por ultrassom durante 30 min à temperatura de 60 °C. Para a extração dos compostos fenólicos, foram realizadas três extrações com 500 µL de AcOEt, seguida de centrifugação à 10.000 RPM durante 2 min. O sobrenadante foi separado e seco em N<sub>2</sub> em condições inertes.

## **2.5- Método de derivatização**

Foi adicionado 100µL de BSTFA a temperatura de 35°C, em um período de 1h. Após a derivatização foi adicionado 400µL de acetato de etila e transferido para o frasco de vidro com tampa e septo de 2 mL.

## **2.6- Análises de compostos fenólicos por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa (CG-EM).**

As análises em cromatografia gasosa foram realizadas através do uso de um Cromatógrafo Gasoso (CG) ThermoScientific Trace 1300 acoplado a um espectrômetro de massa (EM) ThermoScientific MS-ISQ Single Quadrupolo com auto-amostrador AI 1310, equipado com coluna capilar ZB-5HT (30m x 0,25mm x 0,1µm), foi usado gás Hélio como carreador a um fluxo de 1mL / min. Injeção de amostra de 1,0 µL no modo Splitless. O injetor operou a 220 °C e a programação de temperatura do forno iniciou com 50 °C até 200 °C (8 °C/min.), mantendo-se por 1 min., elevando-se até 300 °C (15 °C/min.), se mantendo por 5 min. Elevando-se novamente até 350°C (15 °C/min.) e mantendo-se por mais 9 minutos. O MS-ISQ operou com interface a 280 °C, fonte de ionização a 280 °C, faixa de massa (40-1000 Da). Ionização eletrônica a 70 eV. As identificações das substâncias foram

realizadas através da comparação dos espectros de massas com os das bibliotecas comerciais NIST2011, WILEY2009, FAMES2011.

## **2.7- Caracterização histoquímica e identificação de compostos fenólicos**

No laboratório de anatomia vegetal do Museu Paraense Emílio Goeldi, amostras de folíolos e raízes das três procedências foram fixadas em FAA por 24h (ácido acético glacial, formaldeído, etanol 50%, 1:1:18, v/v; Johansen, 1940) utilizados para preservar substâncias hidrofílicas e realizar a caracterização estrutural; em formalina neutra tamponada por 48h (FNT; Lillie, 1965) para preservar substâncias lipofílicas; e em sulfato ferroso em formalina por 48h (SFF; Johansen, 1940) para evidenciar compostos fenólicos totais a partir da precipitação destes. Posteriormente, o material foi desidratado até etanol 95%, incluído em hidroxietilmetracrilato (Historesin Leica®; soluções preparadas segundo o fabricante), seccionado em micrótomo rotativo de avanço automático (RM 2245, Leica®, Nussloch, Germany) com utilização de navalhas de Tungstênio (Leica®, Biosystems, Nussloch GmbH), para obtenção de cortes transversais e longitudinais (5-7 µm), da porção mediana da lâmina foliar (nervura central e margem) e raiz. As secções foram coradas com azul de toluidina a 0,05% em tampão acetato, pH 4,6 (O'Brien et al. 1964) e montadas com resina sintética (Permout®, New Jersey, USA). O azul de toluidina é um corante metacromático, exibindo diferentes colorações de acordo com o substrato que reage: mucilagens e paredes ricas em pectinas coram de roxo; paredes celulósicas coram de azul, e paredes lignificadas e conteúdos fenólicos não estruturais coram de verde.

Testes histoquímicos mais específicos para compostos fenólicos também foram realizados: Vanilina Clorídrica (Mace & Howell 1974) para taninos condensados e Cloreto de Alumínio (Charrière-Ladreix 1976) para flavonoides. Os controles dos testes foram realizados de acordo com as respectivas técnicas. A documentação fotográfica foi realizada através de câmera digital (AxioCam HRc; ©Carl Zeiss, Göttingen, Germany) acoplada ao microscópio óptico equipado com lâmpada de mercúrio (HBO 50W) e filtros bloqueadores BA420 e BA515 (filtros de excitação BP330-385, BP450-480 e espelho dicromático DM400 e DM500, respectivamente) do Laboratório de morfofisiologia aplicada a saúde da Universidade do Estado do Pará/UEPA.

### 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1- Perfil químico do extrato hidroalcolólico de folíolos e raízes de plântulas de *Libidibia ferrea* por (CG-EM).

O perfil químico de folíolos e raízes de *Libidibia ferrea*, foi determinado pela primeira vez, pois a maior parte dos trabalhos foram realizados com tecidos e estruturas maduras como sementes, frutos e ramos. O monitoramento dos compostos fenólicos em plântulas por CG-EM, possibilitou realizar inferências sobre a ação e importância destes compostos neste estágio de desenvolvimento e fazer uma relação com a procedência do material (Amazonas, Maranhão e Pará).

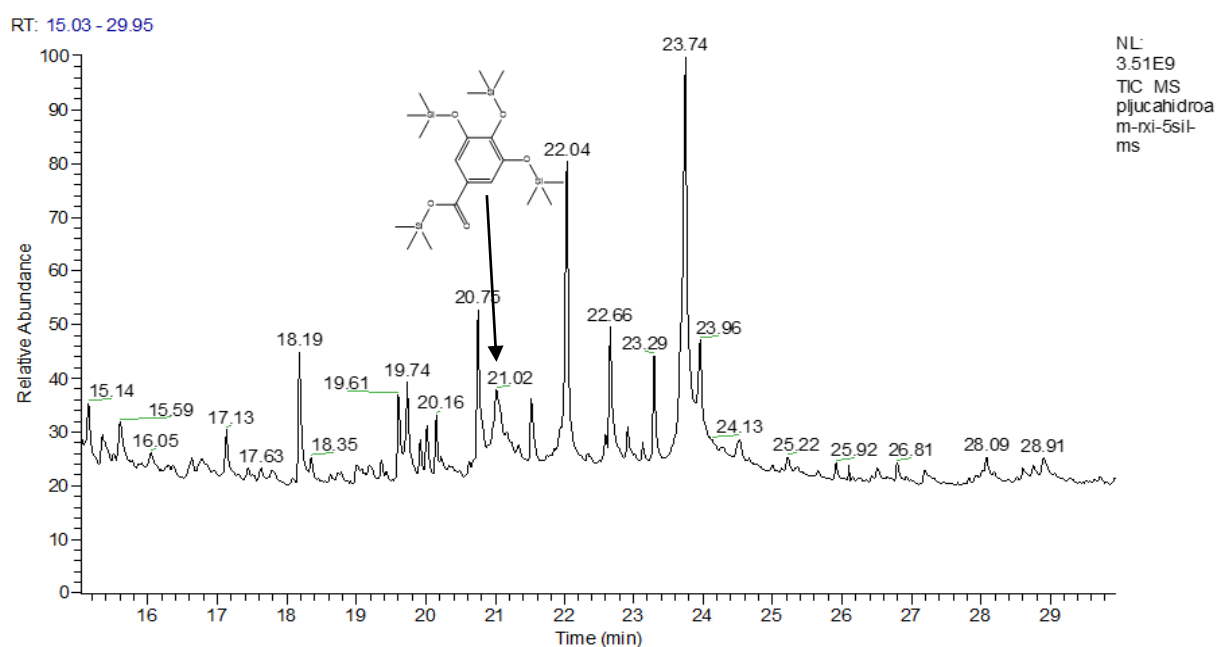


Figura 02 - Perfil cromatográfico em CG/EM do extrato hidroalcolólico de folíolos de *Libidibia ferrea*, procedência do Amazonas.

O cromatograma correspondente a Figura 3, foi registrado para a amostra de extrato de folhas, derivatizado, proveniente do estado Amazonas. O pico correspondente ao ácido gálico, com tempo de retenção de 21,02 min está identificado por uma seta que o relaciona com a imagem da estrutura molecular da substância.

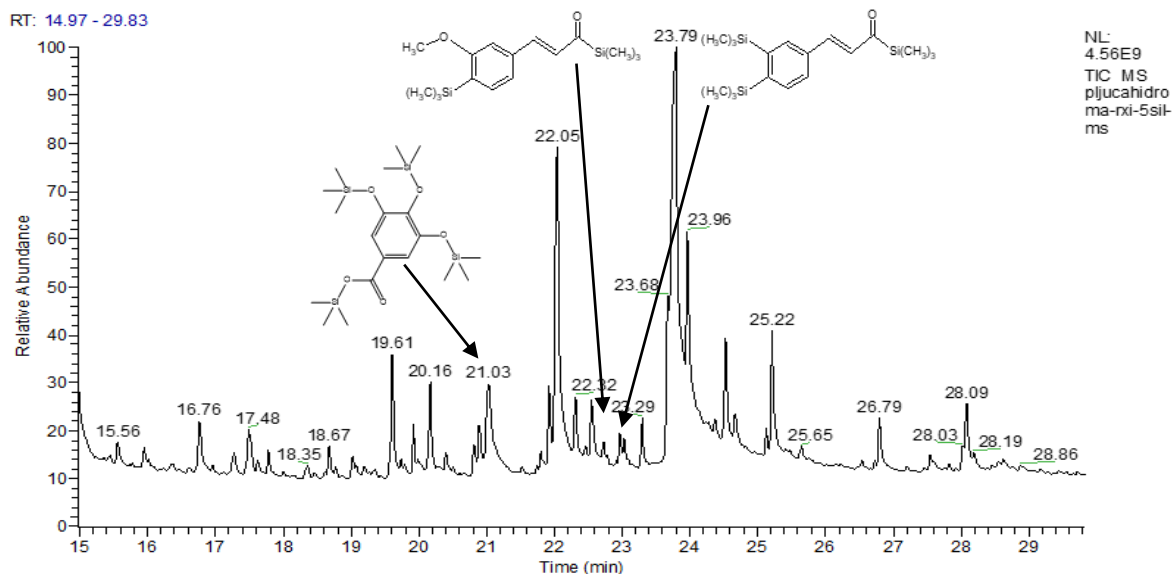


Figura 03 - Perfil cromatográfico em CG/EM do extrato hidroalcológico de folhas de *Libidibia ferrea*, procedência do Maranhão.

Nos cromatogramas referentes as figuras 2 e 3 estão identificados os picos referentes aos ácidos fenólicos na forma sililada que foram detectados nas amostras. Os picos com tempos de retenção de 21,03 e 21,02min correspondem ao ácido gálico em sua forma sililada como identificado na tabela 01 A segunda e terceira estruturas, observadas nos dois cromatogramas, correspondem, da esquerda para a direita, respectivamente, ao ácido ferrúlico e cafeico também em suas formas sililadas.

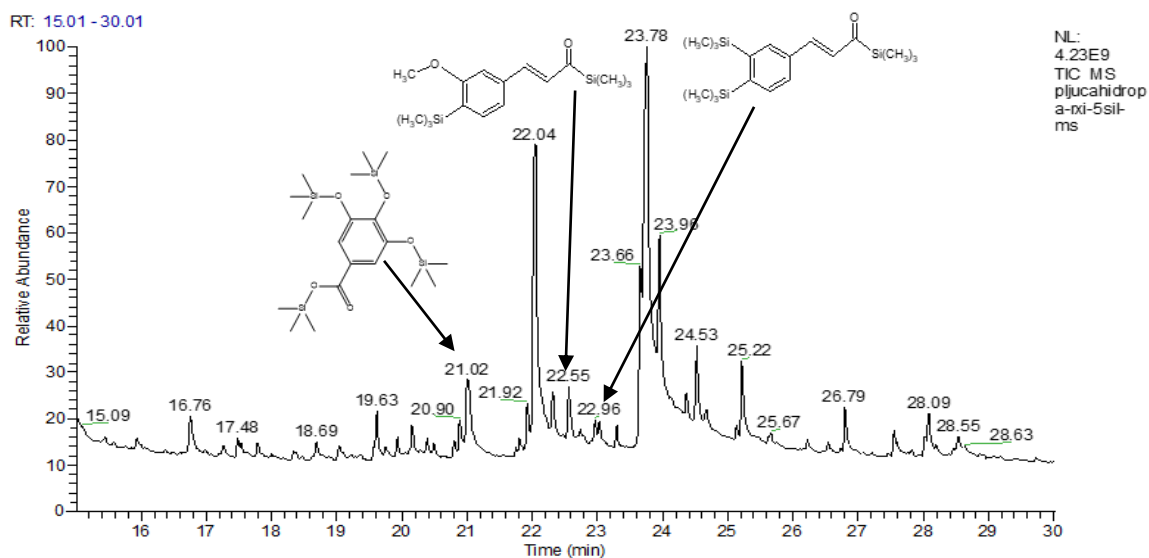


Figura 04 - Perfil cromatográfico em CG/EM do extrato hidroalcológico de folhas de *Libidibia ferrea*, procedência do Pará.

Na Tabela 01 é apresentada a composição química para os extratos de folíolos de plântulas de *Libidibia ferrea*, provenientes de três procedências distintas com tipologias climáticas específicas. A área de coleta do material proveniente do estado do Pará se enquadra como tipologia Af (subtipos Af1), se caracteriza por não apresentar estação seca com precipitação do mês menos chuvoso é igual ou superior a 60mm e precipitação anual maior que 3.000 mm. Quanto a região de coleta do material procedente do Amazonas é uma tipologia Am (subtipo Am3) que possui estação seca moderada (3 meses) ocorrendo precipitação mensal inferior a 60 mm, é considerado um clima intermediário entre Af e Aw e possui precipitação anual de 2000 a 2500 mm; quanto. No estado do Maranhão, a região de coleta se classifica como Aw, com inverno seco bem definido (6 meses) e ocorrência de precipitação mensal inferior a 60mm e precipitação anual de 1000 a 15000.

De acordo com Magalhães (2017), a variabilidade na composição química das plantas é resultado da evolução genética da espécie que no seu centro de origem sofreu processos de diversificação e de seleção e que influências ambientais pontuais promovem variações em menor amplitude que as de origem genética. A relação entre composição química de uma determinada espécie com os dados climáticos podem revelar mudanças no perfil metabólico ou estabelecer padrões de respostas às variações ambientais.

No material analisado cada uma das substâncias identificadas corresponde a um pico que pode ser visualizado em seu respectivo cromatograma, juntamente com seus tempos de retenção (TR), expresso em minutos, e a área relativa, expressa em percentagem. A identidade química das substâncias foi determinada por comparação entre o espectro de massas gerado na análise e os espectros de referência contidos na base de dados ou biblioteca espectral (NIST *Mass Spectral Library*) sincronizada ao *software* do equipamento. De acordo com a tabela 01 existe uma similaridade na composição dos extratos entre as procedências do estado do Pará (tipologia Af1) e Maranhão (tipologia Aw4), podendo ser melhor visualizada observando-se o perfil de seus cromatogramas, sendo evidente a semelhança entre a composição das amostras destas duas localidades, no entanto, há uma diferença significativa na composição do extrato proveniente do Amazonas (tipologia Af1) que é a região que não apresenta estação seca e possuía maior precipitação anual. Este último possui uma composição rica em ácidos graxos e alguns ésteres, como por exemplo, os ácidos  $\alpha$  – linolênico, mirístico, esteárico, laurico e palmítico que juntos correspondem a aproximadamente 27,00% da área total relativa, sendo mais de um terço

deste total correspondente ao ácido  $\alpha$  – linolênico, vulgarmente chamado de ômega 3. Nos extratos das procedências do Pará e Maranhão, a quantidade desse ácido graxo é o dobro da encontrada no extrato do Amazonas, sendo 22,14% da área relativa no cromatograma da amostra proveniente do Maranhão e 18,76% para a amostra referente ao Pará. Os ácidos fenólicos, conforme a Tabela 01, são encontrados em maiores quantidades nas amostras do Pará e Maranhão, entre estes temos a presença do ácido cafeico e ferrúlico que não estão presentes ou estão em quantidades não detectáveis pela técnica de CG-EM para a amostra do Amazonas. O ácido gálico é o metabólito da classe dos fenólicos que está presente em maior quantidade nas amostras provenientes das procedências (Pará/Af1, Amazonas/Am3 e Maranhão/Aw4), sendo detectado 3,28% para o Amazonas, 4,96% no Maranhão e 4,34% no Pará. A análise dos extratos das raízes de plântulas revelou perfis químicos muito semelhantes para as três procedências em estudo, rico em ácidos graxos, metabólitos primários, essenciais à manutenção do metabolismo vegetal. Na tabela 02 estão relacionadas as substâncias identificadas nas análises por CG-EM. O único ácido fenólico detectado em todos os extratos, porém em baixas concentrações, foi o ácido gálico, referente ao pico 13 como apresentado na tabela 02.

A maior concentração de fenólicos é encontrada na fase de frutificação, enquanto que na fase de floração e vegetativa essa quantidade é reduzida. As concentrações de fenólicos também diferem em função dos diferentes estágios ontogenéticos (CIRAK et al., 2013).

O perfil químico das plantas atuais, está relacionado com as mudanças e inovações da história evolutiva dos principais grupos taxonômicos de angiospermas, principalmente no processo de colonização do ambiente terrestre (WINK, 2013).

Tabela 01 - Perfil químico do extrato hidroalcoólico de folhas de *Libidibia ferrea* (Mart. Ex Tul.) L.P. QUEIROZ provenientes dos estados do Amazonas, Pará e Maranhão, identificado por CG-EM após processo de derivatização.

Substâncias	AMAZONAS			MARANHÃO			PARÁ		
	Picos	Tempo de Retenção (min)	Área (%)	Picos	Tempo de Retenção (min)	Área (%)	Picos	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
Pantoil lactona 1tms	2	9,79	4,04	2	9,80	9,05	2	9,82	12,62
Etilmalonato 1tms	3	9,92	4,02	-	-	-	-	-	-
Ácido 2-hidroxioglutárico 1tms éter	5	12,13	11,35	-	-	-	-	-	-
Ácido málico 2tms	6	13,18	5,73	-	-	-	-	-	-
Ácido oxálico 2tms	8	14,91	10,08	1	8,77	1,97	1	8,8	1,08
Ácido propanóico 3tms	9	15,14	1,06	-	-	-	-	-	-
Dodecanoato de metila	10	15,34	1,13	-	-	-	-	-	-
Ácido láurico 1tms	12	17,13	1,41	-	-	-	-	-	-
Miristato de metila	13	18,19	3,7	-	-	-	-	-	-
Ácido mirístico 1tms	14	19,74	4,33	-	-	-	-	-	-
Ácido gálico 4tms	17	21,02	3,28	12	21,03	4,96	10	21,0	4,34
Ácido palmítico 1tms	19	22,04	7,45	13	22,05	9,49	11	22,04	12,5
Oleato de metila	20	22,66	3,82	-	-	-	-	-	-
Fitol 1tms	21	23,29	1,94	-	-	-	-	-	-
Ácido $\alpha$ -Linolénico 1tms	22	23,74	11,51	18	23,79	22,14	14	23,78	18,76
Ácido estearico 1tms	23	23,96	1,75	-	-	-	15	23,96	2,44
Vitamina E o-tms	24	30,69	1,86	24	30,69	0,73	21	30,7	0,61
$\alpha$ -Sitosterol 1tms	25	32,46	3,78	25	32,44	1,69	22	32,46	1,99
Ácido pirotartárico 2tms	-	-	-	4	12,13	7,80	4	12,11	8,4
Ácido itacônico 2tms	-	-	-	5	12,41	5,27	5	12,41	2,93
Neofitadieno	-	-	-	9	19,61	2,59	9	19,63	1,68
Fitol acetato	-	-	-	11	20,16	1,88	-	-	-
Ácido ferrulico 2tms	-	-	-	15	22,55	1,83	12	22,55	1,78
Ácido cafeico 3tms	-	-	-	16	22,96	1,10	13	22,96	1,19
Monopalmitina 2tms	-	-	-	22	26,79	1,18	18	26,79	1,48
Ácido metilmaleico 2 tms	-	-	-	-	-	-	6	13,35	1,21
Monolinoleína 2tms	-	-	-	-	-	-	20	28,09	1,83

Tabela 02. Perfil químico do extrato hidroalcoólico de raízes de *Libidibia ferrea* provenientes de localidades do Amazonas, Pará e Maranhão, identificado por CG-EM após processo de derivatização.

Substâncias	AMAZONAS			MARANHÃO			PARÁ		
	Picos	Tempo de Retenção (min)	Área (%)	Picos	Tempo de Retenção (min)	Área (%)	Picos	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
Ácido láctico	1	5,85	4,7	1	5,85	3,79	1	5,8	3,84
Ácido pentanoico	2	6,91	16,00	2	6,89	12,78	2	6,88	11,95
Pantóil lactona (1TMS)	3	7,71	11,01	3	7,73	7,77	3	7,75	14,47
Ácido -2-Butenoico	4	8,08	2,36	4	8,06	3,77	4	8,1	1,20
Silanol	5	9,15	1,38	6	9,13	1,74	6	9,15	1,79
Ácido butanodioico	7	10,17	5,90	8	10,2	6,50	8	10,19	7,98
Ácido cítrico	12	17,02	2,68	19	17,03	2,45	13	17,02	1,09
Ácido gálico	13	18,61	1,38	22	18,61	0,57	15	18,61	1,45
Ácido metilmaleico	-	-	-	9	11,04	1,62	9	11,04	1,85
Ácido etilfosfórico	-	-	-	5	8,35	1,41	-	-	-
2-ácido metilmaleico	-	-	-	11	12,11	0,71	-	-	-
Ácido propanoico	-	-	-	12	12,65	18,77	-	-	-
Ácido octadecanoico	-	-	-	24	21,48	0,65	-	-	-

Na história evolutiva das plantas, fica claro a participação dos metabólitos secundários no sucesso de adaptação aos mais diversos ambientes terrestres, permitindo que algumas classes de metabólitos possam ser usadas como marcadores químicos para determinados grupos de plantas (Kubitzki e Gottlieb, 1984).

O atual sistema de classificação de angiospermas (APG IV, 2014), mostra o surgimento do ácido gálico e ácido elágico no clado onde está inserida a ordem Fabales, também chamado de clado fixador de nitrogênio. Isso pode conduzir ao pensamento de que estes dois compostos podem representar marcadores químicos para este grupo.

A concentração dos ácidos fenólicos pode estar correlacionada a tipologia climática. É possível que estes compostos fenólicos atuem como prestadores de serviços ecossistêmicos de regulação promovendo a capacidade de adaptação em condições climáticas adversas para controlar a competitividade na área de abrangência de sua ocorrência garantindo sua manutenção e permanência (*Plant fitness*). Em *Libidibia ferrea* (jucá), a presença de ácidos fenólicos e de taninos hidrolisáveis tem sido registrada em estruturas reprodutivas e órgãos vegetativos na planta adulta.

As etapas do desenvolvimento pós-seminal e a fase de plântula são cruciais para a produção vegetal e podem fornecer informações importantes sobre a ecologia das espécies, aspectos bioquímicos e fisiológicos da mobilização de reservas e aspectos da genética e plasticidade dos indivíduos. Do ponto de vista do metabolismo secundário a investigação do perfil metabólico de plântulas pode auxiliar na seleção e conservação de quimiotipos promissores para serem usados em pesquisas biotecnológicas. França (2107) destaca que plântulas cultivadas *in vitro* podem ser utilizadas como fonte de compostos-padrão investigados nos estudos de metaboloma e também como potencial modelo para testes de eliciação ou estimulação da síntese de metabólitos secundários. Gripenberg et al (2017), destacam que os polifenóis um dos grupos mais comuns de metabólitos secundários de plantas exercem papel fundamental no estabelecimento das plantas (*plant fitness*) e constituem uma das primeiras barreiras químicas das plantas, embora, a mortalidade de plântulas em função de ataques, de herbívoros, microrganismos, competição e fatores ambientais, possa atuar como um regulador importante na estrutura populacional.

### 3.2 - Histoquímica e identificação de compostos fenólicos

Os testes histoquímicos aplicados nas secções transversais de folíolos e raízes de *L. ferrea* não foram diferentes nas três procedências. Observou-se também que os compostos fenólicos totais e flavonoides estão presentes em tricomas glandulares pluricelulares localizados na face abaxial da lâmina foliolar (Figura 06 A-C). Enquanto que nas raízes, além de compostos fenólicos totais e flavonoides, também estiveram presentes taninos em idioblastos, especialmente em regiões com maior atividade meristemática, como nas proximidades da endoderme e periciclo e nas regiões de emissão de raízes secundárias (Figura 06 D-G). Os resultados das reações são resumidos na tabela 03.

Tabela 03 - Resultados dos testes histoquímicos para compostos fenólicos aplicados na

Testes	Procedências					
	Pará		Maranhão		Amazonas	
	Fl	R	Fl	R	Fl	R
Sulfato Ferroso em Formalina	+	+	+	+	+	+
Azul de Toluidina	+	+	+	+	+	+
Vanilina clorídrica	-	+	-	+	-	+
Cloreto de alumínio	+	+	+	+	+	+

secreção presente em plântulas *Libidibia ferrea*

**Notas:** resultado positivo (+); resultado negativo (-); Fl: folíolo; R: raiz.

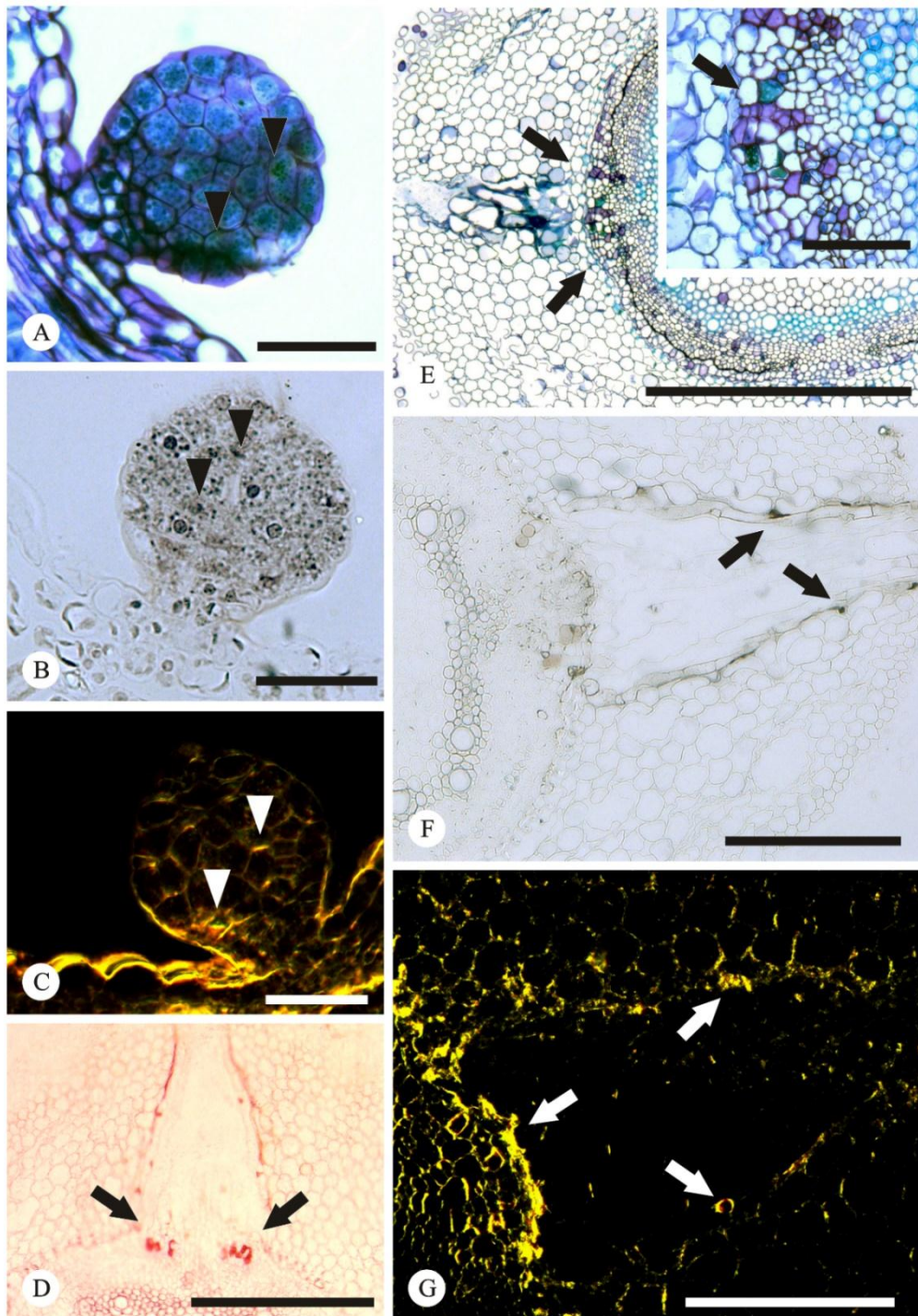


Figura 05 - Resultados positivos dos testes aplicados em *Libidibia ferrea* A-C. tricomas glândulares foliolares; D-G. raízes. A e E, (*inset*). azul de toluidina, fenólicos não estruturais em tricomas (cabeça de seta) e raízes (seta); B e F. sulfato ferroso em formalina, fenólicos totais em tricomas (cabeça de seta) e raízes (seta); D. vanilina clorídrica, taninos condensados em tricomas (cabeça de seta); C e G. cloreto de alumínio, flavonoides em tricomas (cabeça de seta) e raízes (seta). Barras: A-C e *inset*: 25µm; D-G: 75µm.

De acordo com Winker (2008) a biossíntese dos metabólitos secundários é dotada de grande complexidade, pois, envolve enzimas específicas para cada via e são altamente regulados em termos de compartimentação, tempo e espaço. Tal complexidade também é relacionada aos processos de síntese e armazenamento destes metabólitos. Em geral os tecidos e órgãos importantes para a sobrevivência e reprodução das plantas, como os tecidos da epiderme e da casca, flores, frutos e sementes, apresentam perfil metabólico distinto e em maior quantidade.

As plantas não apenas sintetizam os compostos de defesa, mas armazenam altas concentrações no vacúolo no caso de compostos hidrofílicos, dutos de resina, tricomas, laticíferos ou cutícula para compostos lipofílicos, com relação aos fenólicos sua produção ocorre no retículo endoplasmático, citoplasma e vacúolo, acumulando-se principalmente nesta organela, na membrana plasmática e/ou na parede celular (WINK, 2010; CASTRO e DEMARCO, 2008).

Por meio de técnicas histoquímicas é possível localizar os compostos secundários no tecido vegetal, de modo a conhecer seu local de síntese e/ou acúmulo (GAHAN, 1984; SUMMER, 1988). A histoquímica vegetal combina histologia com bioquímica analítica, cujos métodos baseiam-se em técnicas qualitativas (KHASIM, 2002).

Compostos fenólicos constituem um vasto grupo de substâncias solúveis em água e solventes orgânicos polares, sendo quimicamente muito reativos; podem ser obtidos por meio de extração etanólica de material fresco ou desidratados (CARVALHO et al. 2007). Quanto à localização e identificação de compostos fenólicos em tecidos vegetais usualmente emprega-se a pesquisa direta em lâminas permanentes não coradas, preparadas a partir de material fixado em sulfato ferroso e formalina (CASTRO e DEMARCO, 2008).

Grundhofer et al (2001) ao tratar sobre a biossíntese e distribuição subcelular de taninos hidrolizáveis, cita que embora, exista um vasto conhecimento sobre a estrutura e propriedades desses compostos, ainda existe uma lacuna na identificação específica de taninos hidrolisáveis em determinados compartimentos celulares como como plastídios, dictiosomes, retículo endoplasmático liso e rugoso e vacúolos (incluindo "Vacúolos de taninos"), pois na maioria da vezes as análises histoquímicas

utilizam reativos generalistas como íons  $Fe^{3+}$  ou  $Fe^{2+}$ ,  $Cr_2O_7^{2-}$ , vanilina / HCl, vermelho neutro, azul de metileno, toluidina / molibdato, etc. impedindo a identificação e discriminação de outros fenólicos constituintes da planta.

Gross (1999) propõe o uso de marcadores e técnicas de imunohistoquímica para identificação de taninos hidrolisáveis, nos compartimentos polifenólicos. As técnicas citadas acima são ferramentas úteis para estudar as concentrações de taninos hidrolisáveis neste compartimento atribuindo a estes um papel característico como local de deposição de taninos hidrolisáveis.

A técnica de identificação de fenólicos por CG/EM utilizada neste trabalho, demonstra ser um método que pode ser aliado às outras ferramentas analíticas como a histoquímica vegetal e desta forma ser aplicada como um método mais rápido eficiente de monitoramento e distribuição de compostos fenólicos em plantas. O uso de imunohistoquímica embora, seja eficiente para determinar compostos fenólicos mesmo em quantidades reduzidas, torna-se extremamente cara, pois, exige o uso de anticorpos e marcadores específicos.

Vale destacar que o processo de hidrólise que é realizado na técnica de extração destes compostos, exerce papel fundamental no processo de disponibilização dos fenólicos encontrados no apoplasto. De acordo com Gross (1999); Niemetz et al., (1999) a afinidade dos taninos hidrolisáveis com a parede celular é que estes compostos quando citotóxicos são excretados rapidamente no apoplasto ou que são produzidos e depositados diretamente neste compartimento onde podem exercer ação de proteção sem alterar os componentes citoplasmáticos.

Os taninos geralmente não são identificados em material fresco, recomendando-se sua desidratação. A presença de água em solventes orgânicos pode aumentar significativamente a extração de taninos e outros compostos fenólicos, dificultando sua histolocalização. Em histoquímica costumam ser identificados por meio de cloreto férrico e vanilina clorídrica (CASTRO e DEMARCO, 2008).

Compostos fenólicos foram localizados no parênquima foliar, próximo à epiderme e, especialmente, na estrutura secretora. Talvez se tratem de taninos, uma vez que a análise em CG/EM detectou derivados de ácido gálico em foliólos. O material fresco testado para flavonóides apresentou resposta positiva para os reagentes Natural A

e cloreto de alumínio. Material fixado em FNT e testado com o reagente Natural A igualmente apresentou resposta positiva, embora um pouco mais fraca do que os testes com material fresco. Talvez se tenha observado positividade para flavonóides no material fixado devido ao pH neutro da solução estoque.

Usualmente são empregadas técnicas histoquímicas quando se deseja conhecer a localização de determinada substância, ou grupo de substâncias químicas, no interior dos tecidos vegetais, ou verificar em qual etapa do desenvolvimento de determinados órgãos elas estão presentes (JENSEN, 1962; PEARSE, 1980).

Alguns reagentes, quando em contato com certas substâncias, produzem coloração ou precipitados importantes para a identificação de compostos presentes na espécie vegetal que as contém. Por meio dos métodos histoquímicos é possível localizar diferentes substâncias nas secções de tecidos com base em reações químicas específicas, ou em interações macromoleculares de alta afinidade (GAHAN, 1984).

Em climas áridos compostos voláteis, geralmente monoterpenos são usados quase que exclusivamente, enquanto que em ambientes muito húmidos compostos fenólicos e outros compostos hidrossolúveis são utilizados, possivelmente envolvidos nos processos relacionados à alelopátia com a presença de ácidos fenólicos como p-hidroxibenzoico, ácido vanílico e ácido ferúlico.

Os taninos das plantas compreendem produtos secundários estruturalmente diversos que podem ser caracterizados pela sua capacidade de se ligar e, conseqüentemente, precipitar proteínas (HASLAM e CAI, 1994).

Quanto a distribuição os galotaninos estão restritos as espécies lenhosas enquanto elagitaninos são mais difundidos em outros grupos de plantas. Os taninos hidrolisáveis têm sido utilizados como marcadores quimiotaxonômicos em determinadas famílias como citados por (HASLAM, 1996).

#### 4 - CONCLUSÃO

A abordagem utilizada neste trabalho pode ser aplicada aos estudos de adaptação das espécies, na avaliação dos efeitos do ambiente no desenvolvimento das plantas e no controle de qualidade ou propriedades biológicas de espécies responsáveis pelo acúmulo de substâncias ativas. Os principais compostos fenólicos encontrados em folíolos e raízes de *Libidibia ferrea* por meio de técnicas histoquímicas foram compostos fenólicos totais, flavonoides e taninos. A presença de compostos fenólicos totais e flavonóides em tricomas glandulares estão associadas às atividades de defesa contra herbivoria, microorganismos e radiação solar. Nas raízes são identificados compostos fenólicos totais, flavonóides e taninos em estruturas especializadas. A cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM), foi um método eficiente para detecção de ácido gálico como estrutura comum as três tipologias climáticas (Af, Am e Aw), ocorrendo em folíolos e raízes. Podemos concluir que a presença do ácido gálico nos extratos de folíolos de plântulas de *Libidibia ferrea*, evidencia que esta espécie produz este ácido fenólico na fase inicial de desenvolvimento tendo sua concentração aumentada nos tecidos maduros como folhas e frutos. Os compostos fenólicos presentes em *Libidibia ferrea* atuam na proteção e na seletividade, auxiliando o estabelecimento desta espécie. As plântulas provenientes das tipologias Af e Aw apresentam maiores quantidades de ácidos fenólicos e possivelmente representam o quimiotipo de *Libidibia ferrea* encontrado no seu centro de irradiação e origem que são as florestas secas estacionais.

## 5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARTON, K. E. Early ontogenetic patterns in chemical defense in *Plantago* (Plantaginaceae): genetic variation and trade-offs. **American Journal of Botany**, v. 94, n. 1, p. 56-66, 2007.

BARTON, K. E.; KORICHEVA J. The ontogeny of plant defense and herbivory: characterizing general pattern using meta-analysis. **American Naturalist**, v. 175, n. 4, p. 481-493, 2010.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, C.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Orgs.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFSC, 2007. p. 519-535.

CASTRO, M. M.; DEMARCO, D. Phenolic compounds produced by secretory structures in plants: a brief review. **Natural Product Communication**, v. 3, p. 1273-1284, 2008.

CHARRIÈRE-LADREIX, Y. Répartition intracellulaire du secrétat flavonique de *Populus nigra* L. *Planta* 129, 167–174. 1976

CHEYNIER, V.; COMTE, G.; DAVIES, K. M.; LATTANZIO, V.; MARTENS, S. Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 72, p. 1-20, 2013.

CIRAK, C.; RADUSIENE, J.; KARPAVICIENE, B.; CAMAS, N.; ODABAS, M. S. Changes in phenolic content of wild and greenhouse grown *Hypericum triquetrifolium* during plant development. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, v. 37, n. 3, p. 307-314, 2013.

COLE, T. C. H.; HILGER; H. H.; CARVALHO, F. A. **Filogenia das Angiospermas - Sistemática das Plantas com Flores** (Portuguese translation of: Angiosperm Phylogeny Poster – Flowering Plant Systematics), 2016.

DEWICK, P.M. **Medicinal natural products, A Biosynthetic Approach**, 2nd ed. Wiley, New York. 2009

FAHN, A. Structure and function of secretory cells. **Advances in Botanical Research**, v. 31, v. 37-75, 2000.

GAHAN, P. B. **Plant histochemistry and cytochemistry: an introduction**. London: Academic Press, 1984.

GROSS, G. G. Biosynthesis, biodegradation, and cellular localization of hydrolyzable tannins. In: ROMEO, J. T. (Ed.). **Phytochemistry in Human Health Protection, Nutrition and Plant Defense: Recent advances in Phytochemistry**, New York: Kluwer Academic/ Plenum Publishers, v. 33, 1999a. p. 185-213.

GRUNDHOFER, P.; NIEMETZ, R.; SCHILLING, G.; GROSS, G. G. S. Biosynthesis and subcellular distribution of hydrolyzable tannins. **Phytochemistry**, v. 57, n. 6, p. 915-927, 2001.

GUERN, J.; RENAUDIN, J. P.; BROWN, S. C. The compartmentation of secondary metabolites in plant cell cultures. **Cell culture and somatic cell genetics of plants**, v. 4, p. 43-76, 1987.

HARBONE, J.B. **Introduction to Ecological Biochemistry**, 4th ed. Academic Press, London. 1993

HARBONE, J.B., Turner, B.L. **Plant Chemosystematics**. Academic Press, London. 1984

HARBONE, J. B.; TURNE, B. L. **Plant Chemosystematics**. 1. ed. London: Academic Press, 1984.

HARTMANN, T. From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry* 68, 2831–2846. 2007

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. **Journal of Natural Products**, v. 59, n. 2, p. 205-215, 1996.

HASLAM, E.; CAI, Y. Plant polyphenols (vegetable tannins): gallic acid metabolism. **Natural Product Reports**, v. 11, p. 41-66, 1994.

HELENO, S. A. Bioactivity of phenolic acids: Metabolites *versus* parente compounds: A review. **Food Chemistry**, v. 173, p. 501-513, 2014.

JOHANSEN, D.A. *Plant Microtechnique*. McGraw-Hill Book Co., New York. 1940

KAUR, N.; CHUGH, V.; GUPTA, A. K. Essential fatty acids as functional components of foods. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 10, p. 2289-2303, 2014.

KOSTYUK, V.; POTAPOVICH, A.; De LUCA, C. The Promise of Plant Polyphenols as the Golden Standard Skin Anti-Inflammatory Agents. **Current Drug Metabolism**, v. 11, n. 5, p. 415-424, 2010.

KUBITZKI, K.; GOTTLIEB, O. R. Phytochemical aspects of angiosperm origin and evolution. **Acta Botanica Neerlandica**, n. 33, n. 4, p. 457-468, 1984.

LEWIS, G.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. (Ed.) **Legumes of the World**. 1. ed. Kew, Royal Botanic Gardens, 2005.

LILLIE, R.D. *Histopathologic Technic and Practical Histochemistry*, 3<sup>rd</sup>, ed. McGraw-Hill Book Co., New York. 1965

MACE, M.E., HOWELL, C.R., 1974. Histochemistry and identification of condensed tan-nin precursor in roots of cotton seedlings. *Can. J. Bot.* 52, 2423–2426.

MARTORANO, L. G.; PEREIRA, L. C.; CEZAR, E. G. M.; PEREIRA, I. C. B. **Estudos climatológicos do estado do Pará, classificação climática (Köppen) e deficiência hídrica** (Thornthwite, Mather). Belém: SUDAM, EMBRAPA, SNLCS, 1993. 13 p.

NA JOM, K., FRANK, T; ENGEL, K.H. A metabolite profiling approach to follow the sprouting process of mung beans (*Vigna radiata*). *Metabolomics*, v. 7, n. 1, p. 102-117, 2011.

NIEMETZ, R; GROSS, GEORG, G. Gallotannin biosynthesis: a new  $\beta$ -glucogallin-dependent galloyltransferase from sumac leaves acylating gallotannins at positions 2 and 4. **Journal of plant physiology**, v. 155, n. 4-5, p. 441-446, 1999.

O'BRIEN, T.P., FEDER, N., MCCULLY, M.E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. *O Protoplasma* 59, 368–373. 1964

PEARSE, A. G. E. **Histochemistry theoretical and applied**. 4. ed. Edinburgh: C. Livingstone, 1980.

POLHILL, R. M. Classification of the Leguminosae. In: BISBY, F. A.; BUCKINGHAM, J.; HARBORNE, J. B. (Eds.). **Phytochemical dictionary of the Leguminosae**. London: Chapman & Hall, v. 1, 1994. p. 35-54.

POLHILL, R. M.; VIDAL, J. E. Caesalpinieae. In: POLHILL, R. M.; RAVEN, P. H. (Eds.). **Advances in Legume Systematics 1**. Kew: Royal Botanic Gardens, 1981.

QUEIROZ, L. P. **Leguminosas da Caatinga**. 2. ed. Feira de Santana: Universidade Estadual de Feira de Santana, 2009. 443 p.

VERMA, N.; SHUKLA, S. Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 2, n. 4, p. 105-113, 2015.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. 2. ed. New York: Springer, 2001.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. **Phytochemistry**, v. 64, n. 1, p. 3-19, 2003.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites in legumes (Fabaceae). **South African Journal of Botany**, v. 89, p. 164-175, 2013.

WINK, M. Plant secondary metabolism: diversity, function and its evolution. **Natural Product Communications**, v. 3, n. 8, p. 1205-1216, 2008.

## ***CAPÍTULO III***

**Desenvolvimento de Calogênese e estudo do perfil metabólico de *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz (Leguminosae-Caesalpinioideae).**

**\*Artigo a ser submetido à revista *Acta Scientiarum Agronomy***

**Desenvolvimento de Calogênese e estudo do perfil metabólico de *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz (Leguminosae-Caesalpinioideae).**

**RESUMO**

*Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. QUEIROZ, espécie conhecida popularmente como jucá ou pau-ferro, possui aplicação na medicina popular, evidenciando atividades antifúngicas, antibacterianas, antiulcerogênicas, antiinflamatórias e cicatrizantes. Flavonóides, ácidos fenólicos e esteroides podem estar relacionados às ações terapêuticas, justificando a aplicação de técnicas da biotecnologia para indução da calogênese com vistas à produção de metabólitos e o desenvolvimento de sistemas de cultura de células. Foram utilizadas sementes de frutos de *L. Ferrea* para produção de plântulas *in vitro* e estabelecimento da cultura e linhagens promissoras. Segmentos nodais e raízes primárias foram eleitos como melhores fontes de explantes. Neste estudo observou-se que diferentes níveis de 2,4-D e BAP representadas pelos tratamentos T2 e T3 apresentaram os melhores resultados e foram selecionados para estabelecimento das linhagens mais promissoras. Os calos observados em MEV apresentaram células com formatos regulares e alongados, os calos dos tratamentos T2 e T3 apresentam morfologias e texturas diferentes que variavam de friáveis à nodais.

**PALAVRAS-CHAVE:** Calos, Metabólitos, Cultura *in vitro*, Leguminosas.

**Development of Calogenesis and study of the metabolic profile of *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz (Leguminosae-Caesalpinioideae).**

**ABSTRACT**

*Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. QUEIROZ a species popularly known in the Amazon as jucá, has application in folk medicine, evidencing antifungal, antibacterial, antiulcerogenic, anti-inflammatory and cicatrizant activities. Flavonoids, phenolic acids and steroids are related to therapeutic actions, justifying the application of biotechnology techniques to induce calogenesis in order to produce metabolites and the development of cell culture systems. Seeds of *L. Ferrea* fruits were used to produce microplants in vitro and establishment of the crop and promising lines. Nodal segment and primary roots were chosen as the best sources of explants; the treatments T2 and T3 responded better to the concentrations of 2,4D and BAP and were selected as treatments to establish the most promising strains. The callus observed in MEV presented cells with regular and elongated formats, the calluses of treatments T2 and T3 present different morphologies and textures that vary from friable to nodal.

**KEY WORDS:** callus, metabolites, *in vitro* culture, legumes

## 1 - INTRODUÇÃO

O uso de plantas pela humanidade é uma prática antiga e pode ser observado em diferentes culturas e níveis de desenvolvimento. A busca pelo alívio e cura de doenças, por meio da ingestão de ervas, raízes e folhas, talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização desses recursos. No entanto, a busca contínua por produtos oriundos das florestas, as transformações nos ecossistemas e o aumento das atividades antropogênicas tem levado um grande número de espécies de plantas ao processo de erosão genética.

Zanin et al (2012) e França (2017) destacam que as substâncias de origem vegetal servem como a principal fonte de compostos orgânicos para aplicação na medicina, indústria de alimentos e cosméticos e que diversos metabólitos secundários têm sido validados quanto à eficácia. Diante da importância deste setor no mercado e o esgotamento acelerado destes recursos surge a necessidade da criação de novas estratégias voltadas ao cultivo, produção de moléculas biologicamente ativas e conservação dos recursos genéticos vegetais.

Neste sentido o cultivo *in vitro* de células e tecidos vegetais tem se destacado como uma alternativa promissora na produção de metabólitos de interesse biológico. Para otimização destes processos as técnicas de cultura devem ser associadas às ferramentas analíticas sofisticadas como RMN, HPLC, GC-MS e LC-MS (KUMAR, 2014). O principal objetivo do estabelecimento de bioprocessos *in vitro* está associado ao fato de que as atividades enzimáticas catalíticas e rotas metabólicas podem ser monitoradas. As técnicas de cultura *in vitro* de células e tecidos possibilitam a geração de plântulas axênicas e suspensões celulares em quantidades apreciáveis para os estudos de biossíntese e genômica uma vez que essas culturas sejam competentes, isto é, produzam os metabólitos-alvo como as espécies nativas das quais foram derivadas. (FRANÇA, 2017).

*Libidibia ferrea* (Mart. Ex Tul.) L.P. Queiroz, é uma espécie arbórea bastante conhecida na medicina popular, sendo suas diferentes partes utilizadas no tratamento de várias doenças e sintomas. Diante de sua importância etnofarmacológica, o Ministério da Saúde brasileiro incluiu esta espécie na Lista Nacional de Plantas Medicinais importantes para o Sistema de Saúde. Na literatura *Libidibia ferrea* apresenta muitos

registros sobre suas atividades antifúngicas, antibacterianas, antiulcerogênicas, analgésicas e antiinflamatórias (CARVALHO et al, 1996).

*Libidibia ferrea* faz parte do antigo grupo *Caesalpinia* onde seus componentes apresentam alta diversidade química, contribuindo com novas estruturas químicas e aplicações terapêuticas. Entre os metabólitos descritos para as espécies de *Caesalpinia* predominam os derivados fenólicos, esteróides e triterpenóides. Com relação ao jucá (*L. ferrea*), estudos fitoquímicos apontam a presença de flavonóides, saponinas, taninos, cumarinas, esteróides e compostos fenólicos como possíveis classes de metabólitos responsáveis por suas atividades biológicas (GONZALEZ et al., 2004, FREITAS et al, 2012).

Esta espécie denominada na região amazônica de Jucá é mais conhecida em todo o Brasil como Pau-ferro ou Pau-ferro verdadeiro, além dos nomes indígenas Ibirá-obi, Imirá-itá, Muirá-obi e Muiré-itá com ocorrência no Piauí, Alagoas, Bahia, Espírito Santo e Rio de Janeiro com ampla dispersão, porém geralmente em baixa densidade populacional (LORENZI, 2008).

Produz anualmente moderada quantidade de sementes viáveis, floresce a partir do final de novembro, prolongando-se até janeiro. Os frutos amadurecem no período de julho a agosto. Para obtenção de sementes, os frutos devem ser colhidos diretamente da árvore quando adquirirem coloração escura e iniciarem a queda espontânea, ou deve-se recolhê-los no chão após a queda, 1 (um) quilograma contém aproximadamente 5.200 unidades, cuja viabilidade dura mais de 8 meses (LORENZI, 2008).

A biotecnologia de espécies florestais, através do emprego de técnicas de cultura de células, ramos e raízes para a regeneração de plantas e produção de metabólitos secundários in vitro, e o desenvolvimento de sistemas que possibilitam a conservação de recursos genéticos asseguram formas alternativas para a exploração sustentável, contribuindo com programas de conservação das florestas brasileiras, principalmente de árvores nativas encontradas em ecossistemas ameaçados.

No entanto, a biossíntese de compostos vegetais de valor econômico em cultura de calos e suspensões celulares ainda enfrenta dois gargalos: o primeiro é referente à dificuldade de se estabelecer culturas estáveis, que produzam o metabólito de interesse de maneira contínua e em quantidade significativa, o que demanda muito tempo e a

experimentação de diversas variáveis de cultivo; o segundo gargalo é a transição da cultura experimental para o cultivo e a produção do composto em larga escala (*scale up*), de forma que seja economicamente viável para competir, ou até mesmo substituir, as técnicas convencionais de produção dos compostos (VERPOORTE e MARASCHIN, 2001).

Calos são sistemas não organizados de células parenquimatosas pouco diferenciadas e sem polaridade, obtidos *in vitro* a partir de um fragmento de tecido ou órgão vegetal que foi isolado da planta mãe e cultivado em meio de cultura contendo reguladores de crescimento exógenos. Os calos podem ser compactos ou friáveis e apresentar coloração variada, ou mesmo não ter pigmentação. A estrutura e o tipo de crescimento que o calo apresentará dependem de diversos fatores, tais como a composição do meio de cultura, condições ambientais (iluminação, temperatura, etc.), origem, idade e genótipo do tecido doador do explante e até mesmo o tamanho do inoculo (NARAYANASWAMY, 1994; TERMIGNONI, 2005).

A calogênese envolve mudanças estruturais e metabólicas nas células e pode ser dividida em três etapas: indução, divisão celular e diferenciação. Na fase de indução a célula se prepara para a divisão e seu metabolismo é ativado; segue-se a esta fase a de divisão celular, na qual há síntese ativa e o retorno progressivo ao estado meristemático ou basal, conhecido também como desdiferenciação. À medida que as divisões celulares vão ocorrendo, começam a se estabelecer gradientes nutricionais e padrões histológicos diferenciados. Após perder sua identidade inicial, as células entram em uma nova fase, de diferenciação. Podem surgir centros com atividade meristemática, denominados meristemóides, com disposição concêntrica, onde serão formados traqueídeos e elementos de tubo crivado, primórdios de raízes ou gemas. Embora o processo de calogênese seja dividido em três fases, definida pelas características predominantes em cada uma delas a formação da massa celular ocorre pela divisão celular e diferenciação concomitantes, na segunda e na terceira fase (NARAYANASWAMY, 1994; TERMIGNONI, 2005).

O termo cultura de tecidos vegetais tem sido bastante utilizado para definir a cultura asséptica *in vitro* de células, tecidos, órgãos e seus componentes sob condições físicas e químicas definidas. A cultura de tecidos constitui uma importante ferramenta para estudos básicos, como a compreensão dos fatores responsáveis pelo crescimento, metabolismo, diferenciação e morfogênese das células vegetais, bem como para estudos

aplicados, como micropropagação, manutenção de germoplasma *in vitro*, limpeza clonal e produção de metabólitos (SILVA-NETO e ANDRADE, 2011).

Segundo Viana et al. (1999), os estudos básicos sobre cultura *in vitro* e biotecnologia da conservação, são as bases para o estabelecimento de estratégias de conservação de espécies nativas brasileiras, a curto, médio e longo prazo. As técnicas de cultura *in vitro* possibilitam a obtenção de plantas inteiras a partir de células isoladas, de tecidos e de órgãos. Constituindo assim, uma alternativa para conservação de espécies propagadas vegetativamente ou com sementes de baixo potencial de armazenamento (PENNY, 1999).

O princípio básico da cultura de tecidos é a totipotencialidade das células, ou seja, qualquer célula vegetal pode gerar uma nova planta com o uso de indutores apropriados e na escolha de variedades químicas de elevado rendimento, tem proporcionando obter um peso de massa celular seca, de cinco a dez vezes superior à que é obtida a partir da própria planta (TORRES et al., 1998).

A maioria das plantas medicinais que possuem protocolos de cultura de tecidos bem estabelecidos são herbáceas em função da dificuldade encontrada no processo de propagação das plantas lenhosas para cultivo *in vitro* por uma maior produtividade de metabólitos secundários. O fator principal para o sucesso da produção em escala comercial de substâncias biologicamente ativas é a capacidade de crescer células em larga escala, onde a organogênese indireta, passando pela fase de calo, tem sido a forma mais preconizada para a obtenção de elevadas taxas de multiplicação *in vitro* (PARANHOS, 2014).

Calos são tecidos não diferenciados predominantemente constituídos por células parenquimatosas, que apresentam grandes vacúolos e formas variadas. Quanto ao formato das células algumas podem se apresentar compactadas e justapostas (calos nodais), outras se apresentam friáveis com largos espaços intercelulares (calos friáveis) CUNHA e ROQUE (2014).

A cultura de calos e de suspensão de células pode ser derivada de um grande número de órgãos da planta (raízes, brotos, folhas) ou tipos de células específicas (endosperma, pólen), sendo a escolha de uma dessas fontes de explantes uma função do objetivo do estudo e do meio de cultura utilizado (STREET, 1973). Tanto os calos

quanto a suspensão de células são de grande importância para o estudo de fenômenos morfogênicos *in vitro*, bem como para a obtenção de variações genéticas no explante inicial (DIXON, 1985, EVANS et al, 1981, HILDEBRANDT et al, 1946, STREET, 1973). As metodologias para obtenção de calos de várias espécies vegetais são amplamente conhecidas (DIXON, 1985; EVANS et al. 1981; HENDERSON et al. 1984; MURASHIGE, 1980; PHILLIPS; COLLINS, 1984), mas adaptações nos métodos de desinfestação superficial, na obtenção de explantes e na suplementação do meio de cultivo, são ainda necessárias, especialmente para novas cultivares, espécies vegetais menos estudadas e estudos com objetivos específicos.

Teixeira (1998) destaca alguns pontos devem ser seguidos para se conseguir um protocolo de micropropagação *in vitro* completo. É necessário focar alguns aspectos relacionados à planta matriz, como o estágio de desenvolvimento, o genótipo, as condições de estresse a que a planta está submetida, seu crescimento em relação à luminosidade, a presença de substâncias nitrogenadas, compostos fenólicos, substâncias de reserva como carboidratos e a nutrição mineral entre outros.

O presente trabalho evidencia as possibilidades de aplicação de técnicas da biotecnologia vegetal na iniciação da cultura e o estabelecimento *in vitro* desta espécie florestal bem como o desenvolvimento de tecnologia avançada para multiplicação de biomassa como estratégia para produção e o acúmulo de metabólitos de interesse.

## **2 - MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 - Material vegetal**

Os ensaios de cultivo *in vitro* foram realizados no Laboratório de Biotecnologia Vegetal que integra o Laboratório de Investigação Sistemática em Biotecnologia e Biodiversidade Molecular (Labisisbio/ICEN/UFPA). Para realização dos experimentos foram utilizadas sementes maduras de *Libidibia ferrea* provenientes do município de Belém (1° 44' 2,4" S e 48° 31' 30" W) coletadas nos meses de junho e julho (2015 e 2016). As sementes foram previamente selecionadas, descartando-se aquelas que apresentavam deformidades, alterações de coloração e/ou morfologia bem como sinais de contaminação por insetos e fungos de superfície.

### **2.2 - Assepsia e desinfecção das sementes**

As sementes maduras de *L. ferrea* foram submetidas a lavagens com água estéril, imersão em Tween 80 e em seguida houve a adição de NaClO 10% (v/v) por 30 minutos, uma lavagem com água estéril e posteriormente houve e imersão em fungicida Derosal a 0,5% (v/v) por 48 horas. Após este período, as sementes foram retiradas do fungicida e imersas em solução de nitrato de oxiconazol + cloranfenicol 25 mg.L<sup>-1</sup> e mantidas sob agitação por um período de 12 horas. Em câmara de fluxo laminar, as sementes foram submetidas à solução de etanol a 70% (v/v) por 4 minutos, solução de NaClO a 10% (v/v) por 2 minutos e foram feitas 5 lavagens com água destilada estéril.

### **2.3- Germinação de sementes e estabelecimento de plantas axênicas**

As sementes foram inoculadas em frascos cilíndricos de vidro com dimensões de 5cm x 10cm contendo 40 mL de meio de cultura básico MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) e/ou tubos de ensaio com dimensões 30x10cm, contendo 20mL de meio de cultura. Os tratamentos realizados consistiram de preparo do meio MS com a concentração completa (**T1**) ou com a metade da concentração dos sais, ½ MS (**T2**), 3% de sacarose (m/v), vitamina de MS e 0,2% de Phytigel para solidificação do meio de cultura. O Ph foi ajustado para 5,8 com NaOH 0,1 N e o sistema foi esterilizado em autoclave a 121°C (1Kgf/cm<sup>2</sup>) durante 20 minutos O material inoculado foi

acondicionado em estufas incubadoras BOD (demanda bioquímica de oxigênio) com temperatura de  $24 \pm 2$  °C e fotoperíodo de 16/8 horas (claro/escuro) (Tungsramlamp, 40 WF, 90 l mol. m<sup>-2.s<sup>-1</sup></sup>). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, composto por 3 repetições para cada tratamento sendo cada parcela composta por 5 sementes, totalizando 30 sementes por tratamento e 60 sementes no total.

#### **2.4- Indução e morfogênese de calos de *Libidibia ferrea* em diferentes condições de cultura.**

Para indução de calos de *Libidibia ferrea*, foram realizados ensaios em meio MS acrescido dos reguladores de crescimento BAP e 2,4-D nas seguintes concentrações: 2,0 mg. L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 0,1 mg. L<sup>-1</sup> de BAP (T1); 0,5 mg. L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de BAP (T2); 0,2 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de BAP (T3) e 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 0,2 mg.L<sup>-1</sup> de BAP (T4); 0,2 mg. L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 0,2 mg. L<sup>-1</sup> de BAP (T5). Como fontes de explantes foram utilizadas raízes de sementes zigóticas e segmentos nodais. Após 30 dias do início dos experimentos, foi avaliada a porcentagem de indução de calos (nº total de calos/nº total de explantes x 100%). Os calos provenientes dos tratamentos foram mantidos em sala de crescimento para avaliação de metabólitos e determinação da curva de crescimento.

#### **2.5 - Avaliação da curva de crescimento e produção de biomassa e análise de compostos fenólicos.**

Para avaliação da curva de crescimento e desenvolvimento de biomassa dos calos foram coletadas amostras de calos com aproximadamente 1g, posteriormente foi realizada a pesagem destes calos de acordo com o intervalo de tempo de 8 dias, totalizando 80 dias. Para esta avaliação foi escolhido o tratamento (T2-0,5 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de BAP), devido este ser o tratamento que também apresentava células com características friáveis. Durante este período foi realizada a amostragem por sacrifício, onde três repetições representadas por 1 frasco cada eram retiradas para pesagem e posterior avaliação da proliferação celular determinada pelo aumento de biomassa. Uma amostra do material foi selecionado para análise do perfil químico de

acordo com às metodologias para determinação de compostos fenólicos desenvolvidas no Laboratório de Investigação Sistemática em Biotecnologia e Biodiversidade Molecular/Labsisbio da Universidade Federal do Pará.

### 3-RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1-Indução e produção de calos

Para indução de calos de *Libidibia ferrea*, foram realizados ensaios em meio MS acrescido dos reguladores de crescimento BAP (6-Benzilaminopurina) e 2,4-D (ácido 2,4- Diclorofenoxiacético) obedecendo a uma matriz de planejamento. A percentagem de explantes que induziram calos variou de acordo com a concentração de 2,4-D e BAP no meio de cultura (Tabela 1), concentrações mais elevadas de 2,4 D (T1 e T4) não permitiram maiores percentagens de indução de calos nos dois tipos de explantes utilizados. Embora todos os tratamentos tenham induzindo a calogênese os melhores resultados ocorreram nos tratamentos (T2 e T3), onde se destacaram os tratamentos 0,5 mg.L<sup>-1</sup>de 2,4-D e 0,1 mg.L<sup>-1</sup>de BAP e 0,2 mg.L<sup>-1</sup>de 2,4-D e 0,1 mg.L<sup>-1</sup>de BAP como sendo os melhores para tal finalidade.

Tabela 01 - Efeito da concentração de 2,4D e BAP, tipo de explantes sobre a indução e morfogênese de calos de *Libidibia ferrea* com 40 dias de cultivo em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido.

Tratamento /mg.	Concentração de Reguladores/ mg. L <sup>-1</sup>		Quantidade de Explantes	Calogênese Raiz (%)	Calogênese Segmento Nodal (%)
	2,4 -D	BAP			
T1	2,0	0,1	30	75	68
T2	0,5	0,1	30	100	100
T3	0,2	0,1	30	100	100
T4	1,0	0,2	30	80	60
T5	0,2	0,2	30	70	50

A formação do calo envolve mudanças estruturais e metabólicas nas células e pode ser dividida em três etapas: indução, divisão celular e diferenciação. Na fase de indução a célula se prepara para a divisão e seu metabolismo é ativado; segue-se a esta fase a de divisão celular, na qual há síntese ativa e o retorno progressivo ao estado meristemático ou basal, conhecido também como desdiferenciação. À medida que as

divisões celulares vão ocorrendo, começam a se estabelecer gradientes nutricionais e padrões histológicos diferenciados. Após perder sua identidade inicial, as células entram em uma nova fase, de diferenciação. Podem surgir centros com atividade meristemática, denominados meristemóides, com disposição concêntrica, onde serão formados traqueídeos e elementos de tubo crivado, primórdios de raízes ou gemas. Embora o processo de calogênese seja dividido em três fases, definida pelas características predominantes em cada uma delas a formação da massa celular ocorre pela divisão celular e diferenciação concomitantes, na segunda e na terceira fase (NARAYANASWAMY, 1994; TERMIGNONI, 2005).

Ao observarmos os dados presentes tabela podemos perceber que o balanço adequado de diferentes tipos de reguladores de crescimento torna-se de extrema importância para o processo de indução de calos. Percebeu-se que concentrações mais elevadas de 2,4 D (T1 e T4) ocasionaram uma redução na percentagem de indução de calos nos dois tipos de explantes utilizados. Embora todos os tratamentos tenham induzindo a calogênese os melhores resultados ocorreram nos tratamentos (T2 e T3), onde se destacaram as concentrações 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de BAP e 0,2 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de BAP como sendo os melhores para tal finalidade.

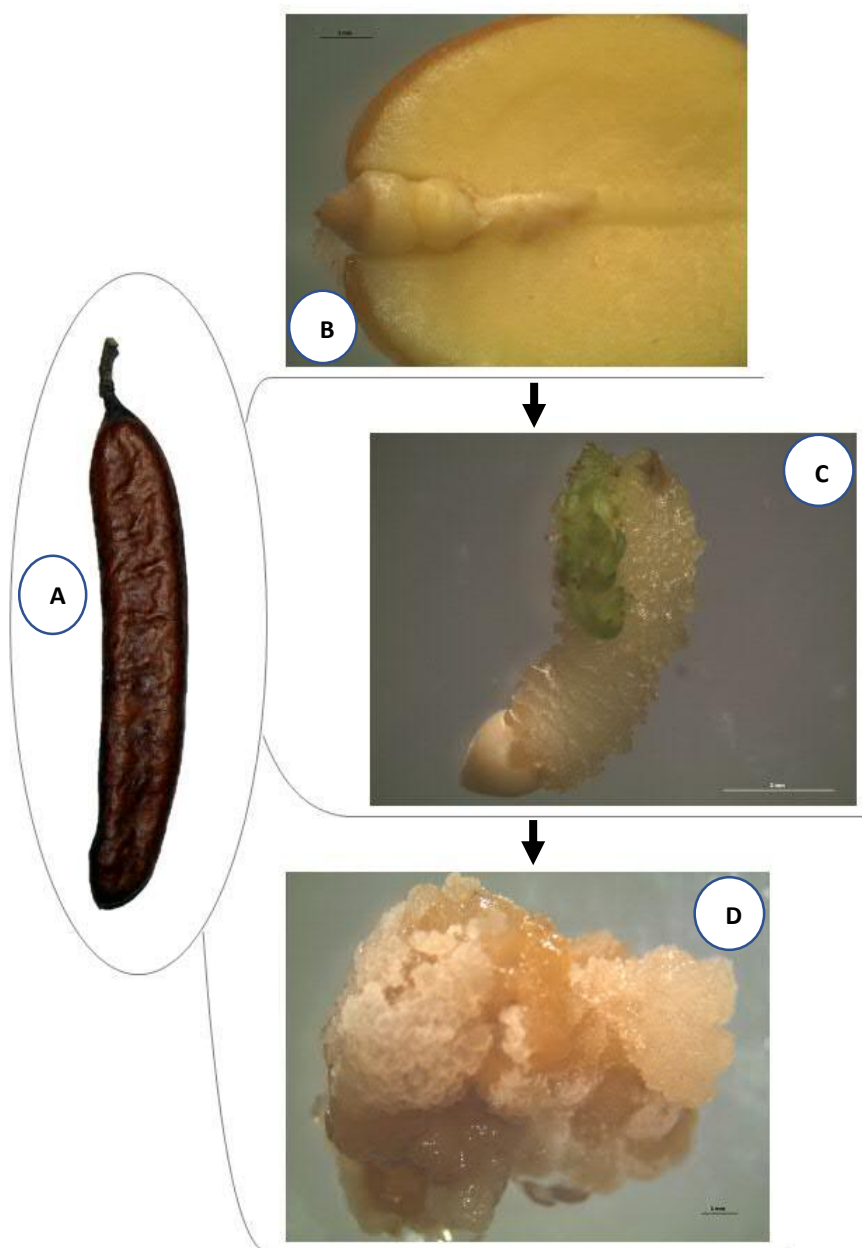


Figura 01 - Diagrama ilustrando o processo de indução de calos a partir de raízes de embriões zigóticos. A- Fruto de *Libidibia ferrea*, B-Semente em secção longitudinal (detalhe do eixo hipocótilo-radícula), C-embrião zigóticos cultivado em meio nutritivo, D-Calos originados de raiz de embriões zigóticos em meio nutritivo (T2) 0,5 mg. L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de BAP.

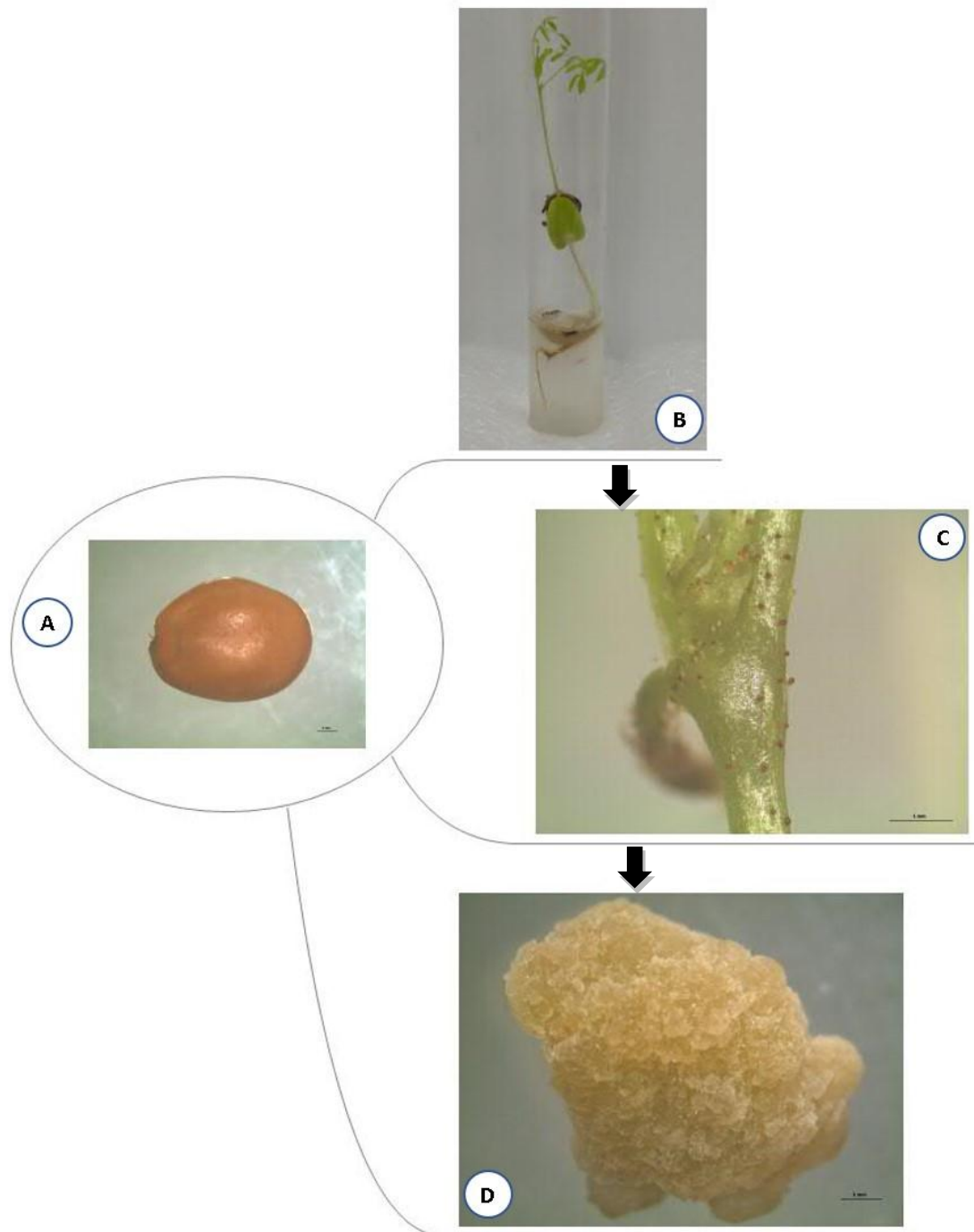


Figura 02 - Diagrama ilustrando o processo de indução de calos a partir de segmentos nodais. A-Semente de *Libidibia ferrea*, B-plântula obtida por germinação *in vitro*, C-segmento nodal, D-Calos originados segmento nodal em meio nutritivo (T3)  $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$  de 2,4-D e  $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP.

### 3.2-Caracterização estrutural de calos

A caracterização morfológica e estrutural dos calos permite evidenciar as mudanças que ocorrem nas diferentes fases do crescimento do calo, fornecendo dados importantes relacionados aos processos morfogenéticos *in vitro* de tecidos vegetais, além de auxiliar na identificação de fatores que alterações fisiológicas nos explantes como friabilidade ou desenvolvimento de embriões somáticos.

Calos são tecidos não diferenciados predominantemente constituídos por células parenquimatosas, que apresentam grandes vacúolos e formas variadas. Quanto ao formato das células algumas podem se apresentar compactadas e justapostas (calos nodais), outras se apresentam friáveis com largos espaços intercelulares (calos friáveis) (CUNHA e ROQUE, 2014).

Os calos induzidos apresentaram texturas que variam de friável à nodais (compactados), dependendo do tipo de explante utilizado. A textura compactada (calos nodais) foi observada em calos induzidos a partir de segmentos nodais de plântulas axênicas geradas a partir da germinação de sementes em concentrações de 0,2 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de BAP. A textura friável foi característica de calos provenientes de explantes de raiz originados do desenvolvimento de embriões zigóticos, quando utilizada a concentração de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de BAP.

Murthy et al. (2014) consideraram dois estágios na produção de metabólitos secundários a partir do cultivo *in vitro*: o primeiro consiste no cultivo de células e órgãos para o crescimento, multiplicação e acúmulo de biomassa (calos) e o segundo, se refere a síntese de metabólitos a partir dos calos. Murphy et al. (2014) salientam que no primeiro estágio para a produção de metabólitos secundários *in vitro* é possível selecionar células ou órgãos de alta produção e otimizar parâmetros para o acúmulo de biomassa. Calos são massas celulares em grande parte não organizadas e indiferenciadas, que surgem a partir do crescimento desorganizado de pequenos órgãos vegetais, pedaços de tecido vegetal, ou células previamente cultivadas, em condições estéreis (GEORGE, 2008). O calo formado sobre um explante original é chamado de calo primário e os calos secundários são aqueles iniciados a partir de pedaços de tecido destacados do calo primário, propiciando assim a formação de subcultivos por longos períodos (George, 2008).

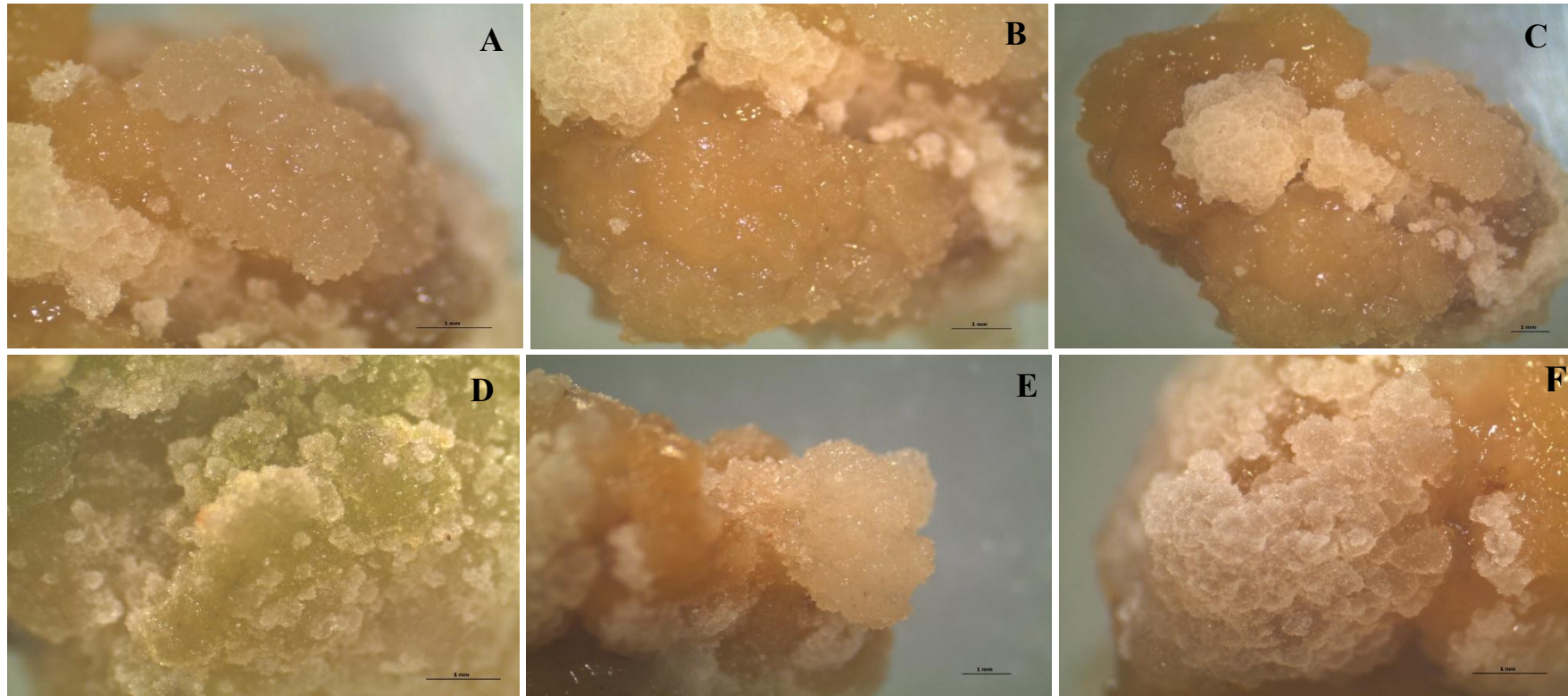


Figura 03-Diferentes morfologias de calos após a adição dos reguladores de crescimento 2,4-D e BAP cultivados em meio MS. A; B e C- Calos obtidos de raízes de embriões zigóticos com predominância de células friáveis; D- Calo obtido de segmento nodal com células clorofiladas com predominância de células compactadas; E e F- Calos originados de segmentos nodais com células compactadas e células friáveis.

### 3.3-Produção de biomassa, análise de compostos fenólicos e curva de crescimento.

De acordo com Cunha (2014), a importância de se estabelecer a curva de crescimento de calos de determinada espécie está na identificação das fases em que ocorrem processos fundamentais ao estudo cinético do seu crescimento e assim pode-se estabelecer o momento exato da repicagem para um novo meio e estabelecimento de subcultivos.

As culturas de células e órgãos de plantas são técnicas promissoras para a produção de valiosos metabólitos secundários com importância médica e farmacêutica, e os recentes avanços no desenvolvimento de técnicas em cultura de tecidos vegetais mostraram resultados promissores para melhorar notavelmente o crescimento e a produtividade da biomassa (MURTHY et al, 2014).

O estudo dos calos através da curva de progressão (Figura 04) apresenta uma tendência com duas fases bem definidas, nas condições estabelecidas neste processo durante 80 dias: Fase Lag, representada por  $\frac{dx}{dt} = 0$ , o que descreve a fase de adaptação das células em um mínimo intervalo de tempo. Observa-se que esta fase é muito curta nas condições estabelecidas. Fase exponencial, representada  $\frac{dx}{dt} > 0$  ou  $\frac{dx}{dt} = \mu x$ , o que descreve o desenvolvimento celular em toda a extensão do período remanescente, observa-se que esta tendência encontra-se em velocidade específica tendendo pra uma leve diminuição no último ponto do gráfico. Esta tendência descreve o potencial de divisão celular que estes calos apresentam nas condições estabelecidas. Neste sentido as investigações ocorridas nestas células não apresentaram concentrações elevadas de substâncias fenólicas como mostra a (Tabela 01).

Os compostos fenólicos representam um grupo de substâncias de grande interesse para *Libidibia ferrea*, tanto sob o aspecto farmacêutico quanto cosméticos. Em células de plantas adultas e tecidos maduros, esses compostos são encontrados principalmente nos vacúolos e apoplastos da célula vegetal. Assim, a baixa concentração de compostos fenólicos totais nos calos de *Libidibia ferrea* pode estar relacionada ao nível de desenvolvimento das células no período avaliado, indicando o baixo grau de diferenciação dos calos obtidos.

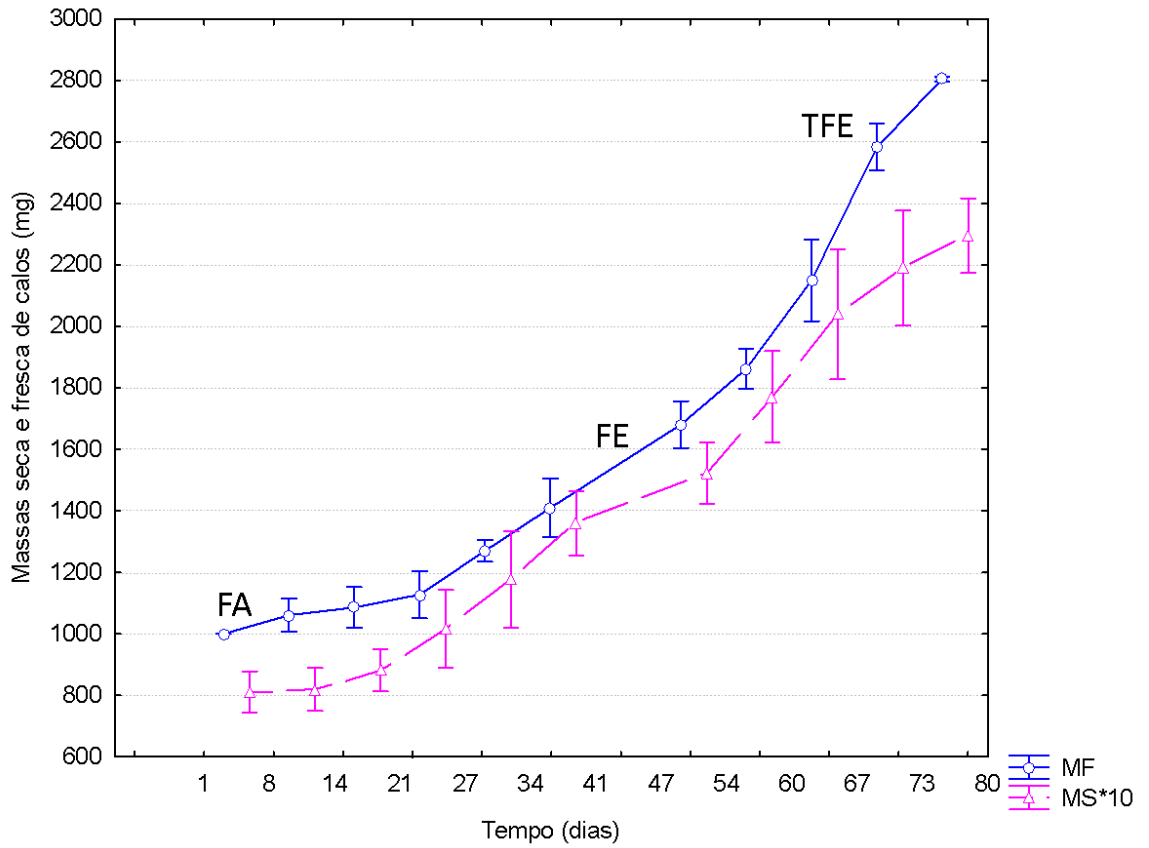
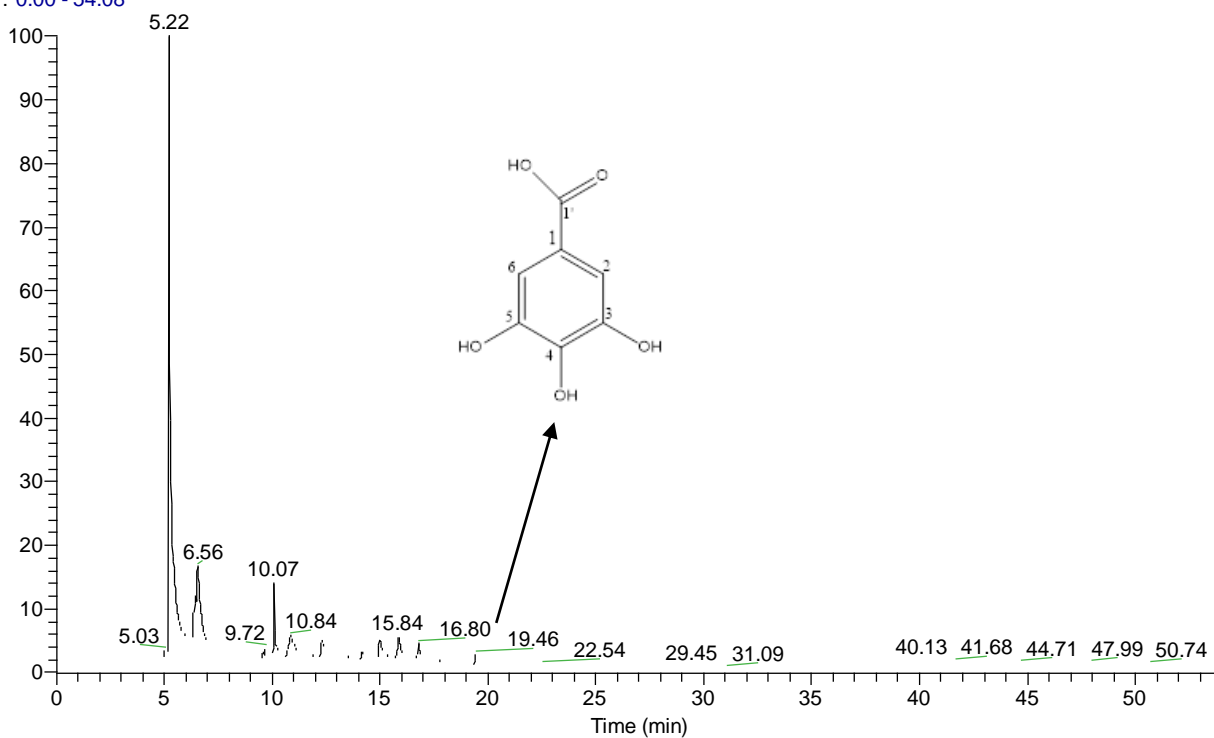


Figura 04 - Curva de crescimento de Calos de *Libidibia ferrea*, cultivada em meio MS. T2 (0,5 mg. L<sup>-1</sup>de 2,4-D e 0,1 mg.L<sup>-1</sup>de BAP). Massa fresca (MF) e Massa seca (MS) medido durante 80 dias por amostragem de sacrifício. Fase de adaptação (FA), Fase exponencial (FE), Tendência a fase estacionária (TFE).

Tabela 02 - Perfil químico de calos de *Libidibia ferrea*, tratamento T2 (0,5 mg. L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de BAP).

Picos	Substâncias	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
1	Ácido Láctico 2TMS	5,22	49,97
2	Ácido Oxálico 2TMS	6,56	15,49
3	Ácido Butenodioico 2TMS	9,72	2,69
4	Ácido Málico 3TMS	10,07	4,58
5	Ácido-3-metil-oxobutanoico 2TMS	10,84	5,12
6	2-metil-ácido málico 3TMS	11,95	0,72
7	43(33), 44(7), 45(15), 55(7), 149(4), 189(4), 233(6), 245(3)	12,30	3,82
8	Ácido Pentanodioico 2TMS	13,60	1,77
9	Ácido Benzoico TMS	14,15	1,38
10	40(6), 42(6), 43(91), 44(19), 147(30), 191(8), 204(8), 217(11)	14,56	0,21
11	43(37), 44(9), 45(19), 55(5), 149(6), 157(6), 275(24), 276(5)	14,99	3,48
12	43(29), 44(7), 45(15), 55(5), 148(5), 149(6), 169(8), 259(7)	15,84	4,46
13	Ácido cítrico 4TMS	16,80	2,21
14	Glicerol 3TMS	17,79	0,42
15	Ácido gálico 4TMS	18,49	0,09
16	Ácido Palmítico 1TMS	19,46	2,86

RT: 0.00 - 54.08



NL:  
4.49E9  
TIC MS  
T2-Calo-  
Raiz-  
FEN\_ZB5H  
T\_M19-2

Figura 05 - Perfil cromatográfico em CG/EM de calos de *Libidibia ferrea*, Tratamento (T2) 0,5 mg. L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de BAP

#### 4 - CONCLUSÃO

Após estabelecido o sistema de cultivo, se obteve uma linhagem de células competentes calulósicas que serão usadas para aumento de biomassa e sistema de produção de metabólitos *in vitro* em escala preparativa ou piloto. Observou-se também que as fontes de explante utilizadas foram adequadas para a indução de calos. Possibilitando novas alternativas para a produção de metabólitos tornando este trabalho muito interessante para a geração de um processo estabelecido para a produção e aumento de biomassa de calos, principalmente, para espécies lenhosas como é o caso de *Libidibia ferrea*. Os calos foram desenvolvidos, entretanto por não apresentarem células especializadas, não foi possível identificar substâncias provenientes do metabolismo secundário.

## 5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSIS, T. F.; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa SPI/Embrapa CNPH, 1998. p. 261-296.

BACCHI, E. M.; SERTIE, J. A.; VILLA, N.; KATZ, H. Antiulcer action and toxicity of *Styrax camporum* and *Caesalpinia ferrea*. **Planta Medica**, v. 61, n. 3, p. 204-207, 1995.

BARROS, A. O.; SOUZA, R. S.; ARANHA, E. S. P.; COSTA, L. M.; SOUZA, T. P.; VASCONCELLOS, M. C., LIMA, E. S. Antioxidant and hepatoprotective activities of *Libidibia ferrea* bark and fruit extracts. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 11, p. 71-76, 2014.

BARRUETO CID, L. P. **Cultivo in vitro de plantas**. 3. ed. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2014. 325 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de Sementes**. Brasília: CLAV/DNDV/SNAD/MA, 2009. 365 p.

CARVALHO, J. C. T.; TEIXEIRA, J. R. M.; SOUZA, P. J. C.; BASTOS, J. K.; SANTOS FILHO, D.; SARTI, S. J. Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 53, p. 175-178, 1996.

CARVALHO, J. C.; TEIXEIRA, J. R.; SOUZA, P. J.; BASTOS, J. K., SANTOS FILHO, D.; SARTI, S. J. Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 53, n. 3, p: 175-178, set. 1996.

DIXON, R. A. Isolation and maintenance of callus and cell suspension cultures. **Plant cell culture**, Oxford, v. 1, n. 1, 1985.

DURZAN, D. J. Somatic Polyembryogenesis for the Multiplication of Tree Crops. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 6, n. 1, p. 341-378, 1988.

ENGELMANN, F. Plant cryopreservation: progress and prospects. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 40, n. 5, p. 427-433, set. 2004.

EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; FUCK, C. E. Growth and behavior of cell cultures embryogenesis and organogenesis. In: THORPE, T. A. (Ed.). **Plant tissue culture: methods and applications in agriculture**. New York: Academic Press, 1981. p. 45-114.

FREITAS, A. C. C.; XIMENES, N. C. A.; AGUIAR, J. S.; NASCIMENTO, S. C.; LINS, T.U. L.; MAGALHÃES, L. R.; COELHO, L. C. B. B.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G.; GONÇALVES-SILVA, T.; CORREIA, M. T. S. Biological Activities of *Libidibia (Caesalpinia) ferrea* var. *parvifolia* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz Pod Preparations. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, mar. 2012.

GEORGE E. F.; DEBERGH P. C. Plant Tissue Culture Procedure: Background. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. (Ed). **Plant propagation by tissue culture**. 3. ed. Dordrecht: Springer, 2008. p. 1-28.

GONZALEZ, F.G; BARROS, S.B.M; BACHI, E.M. Atividade e perfil fitoquímico de *Caesalpinia ferrea* Mart. **Braz. J. Pharm. Sci.** 40:79, 2004.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese Somática e Sementes Sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: SPI/EMBRAPA, v. 2, 1999.

HENDERSON, J. H. M.; PHILLS, B. R.; WHATLEY, B. T. Sweet potato. In: SHARP, W. R.; EVANS, D. A.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. (Eds). **Hand book Plant Cell Culture**. New York: Macmillan, 1984.

KIM, Y. Antimelanogenic and antioxidant properties of gallic acid. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 6, p. 1052-1055, 2007.

KUMAR, B.; PRAKASH, A.; RUHELA, R.; MEDHI, B. Potential of metabolomics in preclinical and clinical drug development. **Pharmacological Reports**, v. 66, n. 6, p. 956-963, dez. 2014.

LAUDANO, W. S. **Cultura de calos e criopreservação de sementes de *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae)**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC, 2005.

LEE, S. K.; RAO, A. N. Plantlet production of *Swietenia macrophylla* through tissue culture. **Garden Bulletin Singapore**, v. 41, n. 1, p. 11-18, 1988.

LIMA, S. M. A.; ARAÚJO, L. C. C.; SITÔNIO, M. M.; FREITAS, A. C.; MOURA, S. L.; CORREIA, M. T. S.; MALTA, J. N.; GONÇALVES-SILVA, T. Potencial anti-inflamatório e analgésico da *Caesalpinia ferrea*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, p. 169-175, 2011.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Editora Plantarum, 2008.

MANSUR, E.; PACHECO, G. P.; CARNEIRO, M. L. V. Conservação *in vitro* de germoplasma. In: BORÉM, A.; LOPES, M. T. G.; CLEMENT, C. R. **Domesticação e melhoramento: espécies amazônicas**. Viçosa: UFV, 2009. 486 p.

MARUYAMA, E.; ISHII, K. Somatic embryogenesis in big-leaf mahogany (*Swietenia macrophylla* King). In: JAIN, S. M.; GUPTA, P. K.; NEWTON, R. J. **Somatic embryogenesis of woody plants**. Dordrecht: Springer, 1999. p. 45-62.

MURASHIGE, T. Principles of rapid propagation. In: HUGHES, K. W.; HENKE, R.; CONSTANTIN, N. **Propagation of higher plants through tissue culture**. Washington, U.S.A.: Printing Office, v. 15, n. 3, p. 14-24, 1980.

MURASHIGE, T.; SKOOG. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**, v.15, n. 3, p.473-497, 1962.

MURTHY, H. N.; LEE, E.; PAEK, K. Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 118, n. 1, p. 1-16, jul. 2014.

NAKAMURA E. S.; KUROSAKI, F.; ARISAWA, M.; MUKAINAKA, T.; TAKAYASU, J.; OKUDA, M.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; PASTORE, F. Cancer chemopreventive effects of a Brazilian folk medicine, Juca, on *in vivo* two-stage skin carcinogenesis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, n. 1, p. 135-137, jun. 2002.

NAKAMURA, E. S.; KUROSAKI, F.; ARISAWA, M.; MUKAINAKA, T.; OKUDA, M.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; PASTORE, F. Cancer chemopreventive effects of constituents of *Caesalpinia ferrea* and related compounds. **Cancer Letters**, v. 177, n. 2, p. 119-124, mar. 2002.

NARAYANASWAMY, S. **Plant cell and tissue culture**. Nova Delhi: Tata McGraw-Hill Publishing Company Limited, 1994.

OLIVEIRA, I. V. P. M. Avaliação cicatricial macroscópica da vagem e da casca do jucá (*Caesalpinia ferrea* MART. EX TUL. VAR. *ferrea*) em lesões cutâneas em asininos (*Equus asinus*), v. 8, n. 2, p. 129-135, 2014.

PENCE, V. C. The Application of Biotechnology for the Conservation of Endangered Plants. In: BENSON, E. E. (Ed.). **Plant Conservation Biotechnology**. London: Taylor & Francis, 1999. cap. 15. p. 227-241.

SILVA-NETO, S.P & ANDRADE, S. R. M. Cultura de tecidos vegetais: princípios e aplicações. In: Faleiro, F.G.; Andrade, S.R.M. de. (Org.). **Biotecnologia: estado da arte**

**e aplicações na agropecuária.** 1ed. Planaltina DF: Embrapa Cerrados, 2011, v. 1, p. 410-434.2011.

SOARES, L. A. L. *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) LP Queiroz: a review of the biological activities and phytochemical composition. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 9, n. 5, p. 140-150, fev. 2015.

STREET, H. E. Cell (suspension) cultures: techniques. In: STREET, H. E. (Ed). **Plant tissue and cell culture**. Berkeley: University of California, v. 11, 1973. cap. 4. p. 59-99.

TEIXEIRA, J. B. **Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas.** 1998. Disponível em: <<http://www.embrapa.br>>. Acesso em: 09 mar. 2014.

TEIXEIRA, S. P.; MACHADO, S. R. Storage sites in seeds of *Caesalpinia echinata* and *C. ferrea* (Leguminosae) with considerations on nutrients flow. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, n. 1, p. 127-136, 2008.

TERMIGNONI, R. R. **Cultura de Tecidos Vegetais.** Porto Alegre: Editora da UFRGS. 2005.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas.** 1. ed. Brasília: Embrapa-SPI, 1998.

VERPOORTE, R.; MARASCHIN, M. Engenharia do Metabolismo de Plantas Mediciniais. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. (Eds.). **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna.** Chapecó: Argos, v. 1, 2001.

VIANA, A. M.; MAZZA, M. C.; MANTELL, S. Applications of biotechnology for the conservation and sustainable exploitation of plants from Brazilian Rain forests. In: BENSON, E. E. **Plant Conservation Biotechnology.** London: Taylor & Francis, 1999. cap. 18, p. 277-299.

ZANIN, J. L. B.; CARVALHO, B. A.; MARTINELLI, P. S.; SANTOS, M. H; LAGO, J. H. G.; SARTORELLI, P.; VIEGAS JR, C.; SOARES, M. G. The genus *Caesalpinia* L. (Caesalpinaceae): phytochemical and pharmacological characteristics. **Molecules**, v. 17, n. 7, p. 7887-7902, jun. 2012.

## ***CAPÍTULO IV***

**Perfil metabólico e avaliação das atividades biológicas de frutos de *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz (FABACEAE).**

Perfil metabólico e avaliação das atividades biológicas de frutos de *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz (FABACEAE)

## RESUMO

*Libidibia ferrea*, espécie conhecida popularmente como jucá ou pau-ferro, possui aplicação na medicina popular, evidenciando atividades antifúngicas, antibacterianas, antiulcerogênicas, antiinflamatórias e cicatrizantes. Flavonóides, ácidos fenólicos e esteroides podem estar relacionados às ações terapêuticas. Técnicas cromatográficas foram utilizadas para identificação do perfil metabólico dos extratos hidroalcoólico do epicarpo desta espécie, o extrato bruto e os ácidos gálico e elágico foram utilizados para avaliação da ação cicatrizante in vivo. Por meio dos processos cromatográficos empregados no extrato bruto hidroalcoólico dos frutos de *Libidibia ferrea* foi possível identificar os ácidos gálico e elágico. A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas mostrou ser um método eficaz para identificação destes compostos fenólicos no extrato bruto hidroalcoólico do epicarpo dos frutos de *L. ferrea*. Quanto à atividade cicatrizante os resultados sugerem que o extrato bruto, os ácidos gálico e elágico mostraram-se eficiente na proliferação do colágeno tipo III na fase inicial do processo de reparação tecidual e que pode ter sido induzido pelas ações dos ácidos gálico e elágico.

**PALAVRAS-CHAVE:** Fenólicos, cicatrização, ácido gálico, ácido elágico, colágeno

Metabolic profile and evaluation of the biological activities of fruits of *Libidibia ferrea* (Mart. Ex Tul.) L.P. Queiroz (FABACEAE)

## **ABSTRACT**

*Libidibia ferrea*, a species popularly known as jucá or pau-ferro, has application in folk medicine, evidencing antifungal, antibacterial, antiulcerogenic, anti-inflammatory and cicatrizant activities. Flavonoids, phenolic acids and steroids may be related to therapeutic actions. Chromatographic techniques were used to identify the metabolic profile of the hydroalcoholic extracts of the epicarp of this species, the crude extract and the gallic and ellagic acids were used to evaluate the healing action in vivo. By means of the chromatographic processes used in the crude hydroalcoholic extract of the fruits of *Libidibia ferrea* it was possible to identify the gallic and ellagic acids. Gas chromatography coupled to mass spectrometry showed to be an effective method for identifying these phenolic compounds in the crude hydroalcoholic extract of the epicarp of *L. ferrea* fruits. As for the cicatrizant activity, the results suggest that the crude extract, gallic and ellagic acids were efficient in the proliferation of type III collagen in the initial phase of the tissue repair process and that may have been induced by the actions of gallic and ellagic acids.

**KEYWORDS:** Phenolics, healing, gallic acid, ellagic acid, collagen

## 1-INTRODUÇÃO

Compostos fenólicos são metabólitos secundários e se distribuem extensamente em diferentes órgãos do corpo vegetal, possuem várias funções ecológicas e inúmeras atividades farmacológicas, cientificamente comprovadas, sendo bem representadas por ácidos fenólicos, flavonóides, taninos e cumarinas. Entretanto, a atividade farmacológica dos compostos fenólicos é menos pronunciada do que a de outros grupos, como os alcaloides ou esteróis e por essa razão o valor terapêutico dos polifenóis foi durante certo tempo acompanhado por dúvidas e controvérsias (LIMA NETO et al., 2015; CUNHA, 2014)).

*Libidibia ferrea* é uma leguminosa arbórea com ampla distribuição na região nordeste e bastante utilizada popularmente para fins terapêuticos inclusive para acelerar processos de cicatrização de feridas cutâneas. Em trabalho realizado por (KOBAYASHI et al, 2015) a composição química e o potencial cicatrizante do extrato etanólico dos frutos de *L. ferrea* foi testado em ratos. Este autor avaliou o processo de cicatrização com medidas macro e microscópicas, revelando que a cicatrização foi mais significativo com uso de extrato etanólico dos frutos de *L. ferrea* a 12,5%, neste trabalho a triagem fitoquímica mostra a presença de saponinas, ácidos orgânicos, açúcares redutores, fenóis e taninos.

Uma comparação feita com a atividade cicatrizante do extrato aquoso do fruto e da casca da *Libidibia ferrea* (jucá) em lesões cutâneas de asininos (*Equus asinus*) foi realizada para avaliação de cicatrização em feridas com formato de figura plana circular. Neste trabalho o extrato aquoso não foi eficiente para interferir no processo de cicatrização (OLIVEIRA, et al., 2014)

O uso tradicional de plantas para tratamento de afecções da pele e fins cosméticos é uma prática comum na medicina popular de muitas culturas, e pode fornecer informações importantes para o desenvolvimento e novos fármacos em especial com ação cicatrizante, despigmentante e inibidores de tirosinase (PEDROSA et al, 2016).

Pedrosa et al (2017), ao realizarem estudos *in vitro* atribuíram o mecanismo de inibição da enzima tirosinase à forte atividade antioxidante dos extratos do caule e dos frutos de *Libidibia ferrea*. Neste trabalho os autores identificaram via HPLC alguns

metabólitos secundários como kaempferol, quercetina e derivados do ácido gálico indicando as ações de despigmentação e clareamento da pele.

Pedrosa et al (2017), sugerem que a alta capacidade antioxidante dos extratos de frutos e caule de *L. ferrea* em combinação com outros metabólitos como flavonóides, ácido gálico e outros compostos fenólicos como a epigalocatequina favorecem o potencial antienvhecimento. Estes extratos mostraram grande capacidade de inibição da hialuronidase e ação inibitória na melanogênese, principalmente pela presença de agentes ativos tais como kaempferol, ácido elágico.

Neste sentido, é importante lembrar que grande parte destes medicamentos apresentam efeitos adversos, fato que tem impulsionado a busca por compostos de origem vegetal. O Ministério da Saúde brasileiro, nos últimos anos, tem estimulado a introdução de plantas como forma de práticas complementares de cuidado no sistema oficial de saúde. Destaca-se a implementação da Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápico (PNPMF) e a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) que visam estimular o acesso às plantas medicinais.

De acordo com CUNHA (2010) os avanços em métodos bioquímicos nas últimas décadas e na área da farmacologia clínica permitiu que houvesse aumento no conhecimento das atividades biológicas atribuídas a estes compostos. Este autor destaca entre as principais atividades o efeito cardioprotetor e vasodilator; atividade antiperoxidativa em nível das membranas celulares do fígado; atividade antioxidante; inibidores da carcinogênese pulmonar, antitumorais, antibacteriana e atividade antidiarreica. Uma discussão atual sobre os flavonóides é relacionada ao mecanismo de absorção digestiva e a biodisponibilidade.

Com relação à atividade cicatrizante algumas espécies arbóreas como a aroeira (*Schinus terebinthifolius*) tem sido alvo de investigação, sua atividade cicatrizante é descrita na medicina popular para tratamentos bucais, estomatite, como antiinflamatórios e cicatrizante.

Um estudo fitoquímico preliminar do extrato hidroalcoólico das cascas do caule e das folhas mostrou a presença de flavonóides, saponinas, taninos, cumarinas, esteróides e compostos fenólicos em *C. ferrea* (GONZALEZ et al., 2004). Dentre os constituintes químicos descritos na literatura destaca-se a presença de polifenóis, onde o ácido gálico e

o ácido elágico podem ser as possíveis substâncias químicas responsáveis por parte da atividade biológica dos frutos desta espécie de leguminosa (UEDA et al., 2001). Os polifenóis são substâncias de grande importância para a fisiologia da planta, contribuindo para o mecanismo de defesa. *Libidibia ferrea* apresenta diversos compostos ricos em taninos, esteroides e fenóis, podendo ser considerada uma espécie potencial para o desenvolvimento de produtos com ações anti-inflamatórias, adstringentes e hemostáticas. Estas classes de metabólitos atuam como marcadores químicos para fins de quantificação e padronização de drogas vegetais.

*Libidibia ferrea* é uma planta muito utilizada popularmente para fins terapêuticos, inclusive para acelerar processos de cicatrização de feridas cutâneas. Em trabalho realizado por (KOBAYASHI et al, 2015) a composição química e o potencial cicatrizante do extrato etanólico dos frutos de *L. ferrea* foi testado em ratos. Este autor avaliou o processo de cicatrização com medidas macro e microscópicas, revelando que a cicatrização foi mais significativa com uso de extrato etanólico dos frutos de *L. ferrea* a 12,5%, neste trabalho a triagem fitoquímica mostra a presença de saponinas, ácidos orgânicos, açúcares redutores, fenóis e taninos.

Uma comparação feita com a atividade cicatricial do extrato aquoso da vagem da casca da *Caesalpinia ferrea* (jucá) em lesões cutâneas de asininos (*Equus asinus*) foi realizada para avaliação de cicatrização em feridas em formato de figura plana circular. Neste trabalho o extrato aquoso não foi suficiente para interferir no processo de cicatrização (OLIVEIRA, et al., 2014).

Outras atividades revelaram que o uso tópico de pomada à base de *Caesalpinia ferrea* apresenta efeito significativo na cicatrização da pele de caprinos. No entanto, há a necessidade de ampliação do estudo com diferentes dosagens e formulações. (OLIVEIRA, 2008).

Em outro experimento foi realizada a comparação na atividade cicatrizante de *Caesalpinia ferrea* e *Aloe vera* em lesões cutâneas totais em ratos apresentando um resultado satisfatório quanto ao uso das duas pomadas não havendo diferença estatística significativa. Confirmando, portanto, que ambos possuem ação cicatrizante quando comparados ao grupo controle (SOARES et al., 2013; KOBAYASHI et al, 2015).

O extrato aquoso de frutos desta espécie é utilizado no tratamento de diabetes e tosses e também exibe propriedade antifúngica, antiulcerogênico anti-inflamatória e propriedades analgésicas. Ácido gálico e gaiato de metilo foram identificados como componentes importantes dos frutos de *C. ferrea*. Estudos do caule fazem referência as propriedades cicatrizantes de taninos e revelou uma proporção de 4,7% (saponinas) e 9,2% (taninos) presentes na composição do extrato do caule de *C. ferrea*, estas classes de metabólitos foram consideradas prováveis responsáveis pela ação antiúlcera (DI STASI & HIRUMI-LIMA, 2002, FERREIRA et al, 2016; COSTA et al, 2015).

## **2- MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1-Coleta do material botânico e obtenção de extratos**

Foram coletados frutos maduros de *Libidibia ferrea* de matrizes localizadas no Campus de pesquisa do Museu Paraense Emílio Goeldi na cidade de Belém/Pará (1° 44' 2,4" S e 48° 31' 30" W), autorização de coleta nº 13989-2/SISBIO. Amostras de ramos floridos foram utilizadas para a determinação botânica que foi realizada no Herbário MFS da Universidade do Estado do Pará, onde encontra-se depositado (voucher nº002780).

O beneficiamento e seleção dos frutos foram realizados no Laboratório de Sementes Florestais (LASF) da Embrapa Amazônia Oriental, onde se considerou como matéria prima somente as estruturas dos frutos sem as sementes. Posteriormente as amostras foram desidratadas em estufa com circulação e renovação de ar, à temperatura de 45 °C, durante 48 horas. Após a completa desidratação, o material foi pulverizado em moinhos de facas e armazenado ao abrigo de luz e umidade. Para obtenção dos extratos brutos, foram realizadas extrações com solventes de diferentes polaridades na seguinte ordem (Hexano, Clorofórmio, Acetato de etila, hidroalcolico 70%) com auxílio de ultrassom em temperatura de 45 graus por 30 minutos, seguindo metodologias utilizadas no Laboratório de Investigação Sistemática em Biotecnologia e Biodiversidade Molecular/Labsisbio da UFPA.

## **2.2- Análise do perfil fenólico dos frutos (pericarpo) por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA).**

As análises preliminares em CCDA, se utilizou placas cromatográficas em folhas de alumínio 20 x 20 cm Silicycle, tendo como fase estacionária sílica gel 250  $\mu\text{m}$  \UV<sub>254nm</sub> de alta resolução. As placas foram cortadas em dimensões de 5x3cm e alíquotas das amostras foram aplicadas na forma de bandas por meio de um tubo capilar. Foram preparadas soluções alcoólicas de concentração de 1mg/mL, das amostras, extrato hidroalcoólico seco e do padrão de ácido gálico (pureza > 99,5%). A fase móvel foi constituída de uma mistura de acetato de etila/ácido fórmico/H<sub>2</sub>O na proporção de 9:0,5:0,5(V/V) de acordo com a FARMACOPEIA (2010). Para a detecção e identificação das classes de compostos fenólicos presentes, se utilizou solução alcoólica de FeCl<sub>3</sub> a 1%(m/V).

## **2.3-Avaliação do perfil químico do extrato hidroalcoólico de frutos (pericarpo) de *Libidibia ferrea* por CG-EM.**

Uma amostra do extrato seco de frutos (pericarpo), foi pesada e transferida para tubo cônico de volume de 2 mL e submetida aos processos de hidrólise alcalina, hidrólise ácida e derivatização por sililação. Os processos descritos abaixo são referentes às metodologias para análise de compostos fenólicos desenvolvidas no Laboratório de Investigação Sistemática em Biotecnologia e Biodiversidade Molecular/Labsisbio da Universidade Federal do Pará/UFpa.

## **2.4-Hidrólise e extração dos compostos fenólicos**

Para o processo de extração dos compostos fenólicos, 50mg do extrato hidroalcoólico foi submetido a hidrólise alcalina, com agitação assistida por ultrassom, durante 30 min à temperatura de 60 °C, por meio da adição de 400  $\mu\text{L}$  de NaOH 4M, em um frasco cônico de 2 mL com tampa. A homogeneização do sistema foi realizada por meio de agitação em vortex por 2 min. Em seguida, foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de HCl 6M, agitou-se em vortex por 2 min e mensurou-se à pH 2. Em seguida, o sistema foi submetido a agitação assistida por ultrassom por 30 min à temperatura de 60 °C. Para a

extração dos compostos fenólicos, foram realizadas três extrações com 500 µL de AcOEt, seguida de centrifugação à 10.000 RPM durante 2 min. O sobrenadante foi separado e seco em N<sub>2</sub> (Estes procedimentos foram realizados em condições inertes).

## **2.5-Método de derivatização**

Foi adicionado 100µL de BSTFA a temperatura de 35°C, em um período de 1h. Após a derivatização foi adicionado 400µL de acetato de etila e transferido para o frasco de vidro com tampa e septo de 2 mL.

## **2.6-Análise de compostos fenólicos por CG-EM**

As análises em cromatografia gasosa foram realizadas através do uso de um Cromatógrafo Gasoso (CG) ThermoScientific Trace 1300 acoplado a um espectrômetro de massa (EM) ThermoScientific MS-ISQ Single Quadrupolo com auto-amostrador AI 1310, equipado com coluna capilar ZB-5HT (30m x 0,25mm x 0,1µm), foi usado gás Hélio como carreador a um fluxo de 1mL / min. Injeção de amostra de 1,0 µL no modo Splitless. O injetor operou a 220 °C e a programação de temperatura do forno iniciou com 50 °C até 200 °C (8 °C/min.), mantendo-se por 1 min., elevando-se até 300 °C (15 °C/min.), se mantendo por 5 min. Elevando-se novamente até 350°C (15 °C/min.) e mantendo-se por mais 9 minutos. O MS-ISQ operou com interface a 280 °C, fonte de ionização a 280 °C, faixa de massa (40-1000 Da). Ionização eletrônica a 70 eV. As identificações das substâncias foram realizadas através da comparação dos espectros de massas com os das bibliotecas comerciais NIST2011, WILEY2009, FAMES2011.

## **2.7-Avaliação do processo de cicatrização em feridas limpas induzidas cirurgicamente**

Com objetivo de avaliar o efeito do extrato bruto de *Libidibia ferrea*, ácido gálico e ácido elágico isoladamente, foram realizados os ensaios de cicatrização *in vivo* para verificar a influências destes sobre o processo de cicatrização.

A pesquisa foi iniciada após submissão e a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Uso de Animais da Universidade do Estado do Pará-CEUA/UEPA, parecer

de aprovação nº 26/2016. O estudo foi realizado com 50 ratos da raça Wistar, machos, sendo divididos em 5 grupos contendo 10 animais em cada. Tais grupos ainda foram subdivididos em dois grupos cada, contendo 5 animais, que possuíam tempo de tratamento distintos, 7 e 14 dias. Os grupos foram divididos da seguinte forma: grupos controle negativo (GN), controle positivo (GP), Grupo Ácido Elágico (GE), Grupo Ácido Gálico (GG) e Extrato Bruto (GB).

Cada animal foi pesado e anestesiado por via intraperitoneal (i.p) com uma associação Cetamina e Xilazina (90 mg/Kg e 10 mg/Kg respectivamente). Posteriormente, os animais foram tricotomizados na região do dorso e após realizada a assepsia foi utilizado um *punch* metálico, especialmente confeccionado para este fim, contendo lâmina cortante na sua borda inferior. Com este instrumento, foi excisado fragmento cutâneo, em forma de disco, de 8mm de diâmetro, no centro da área epilada, até a exposição da fáscia dorsal muscular (Figura02 AB).

As amostras foram fixadas em formol a 10% pelo período de 24 a 48h. Em seguida, foram desidratadas em álcool etílico absoluto, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Os blocos de parafina foram confeccionados e submetidos a microtomia a 5 µm. As lâminas com os cortes histológicos foram desparafinizadas em estufa a 80°C e xilol, em seguida hidratadas em álcool etílico e água corrente. As lâminas foram coradas por 1h em solução de Sirius Red a 0,1% e lavadas em água corrente, contra coradas com hematoxilina por 2min, e por fim, desidratadas em álcool etílico, clarificadas em xilol e montadas com bálsamo do Canadá e lamínula. As lâminas foram visualizadas em microscópio Zeiss, aumento de 100x, com luz polarizada. Foram obtidas 3 fotografias da área de fibrose de cada lâmina através do programa Axion Vision. As microfotografias foram analisadas no programa Image J com o plug-in Threshold Colour. Obtiveram-se o percentual de colágeno por análise de partículas de acordo com seleção e medidas de áreas com base na cor. Foram utilizadas as matrizes 0-40 para cor vermelha (colágeno tipo I) e 45-120 para cor verde (colágeno tipo III), saturação 0-255 e brilho 5-225, segundo o protocolo padronizada por BEDOYA, et al (2016).

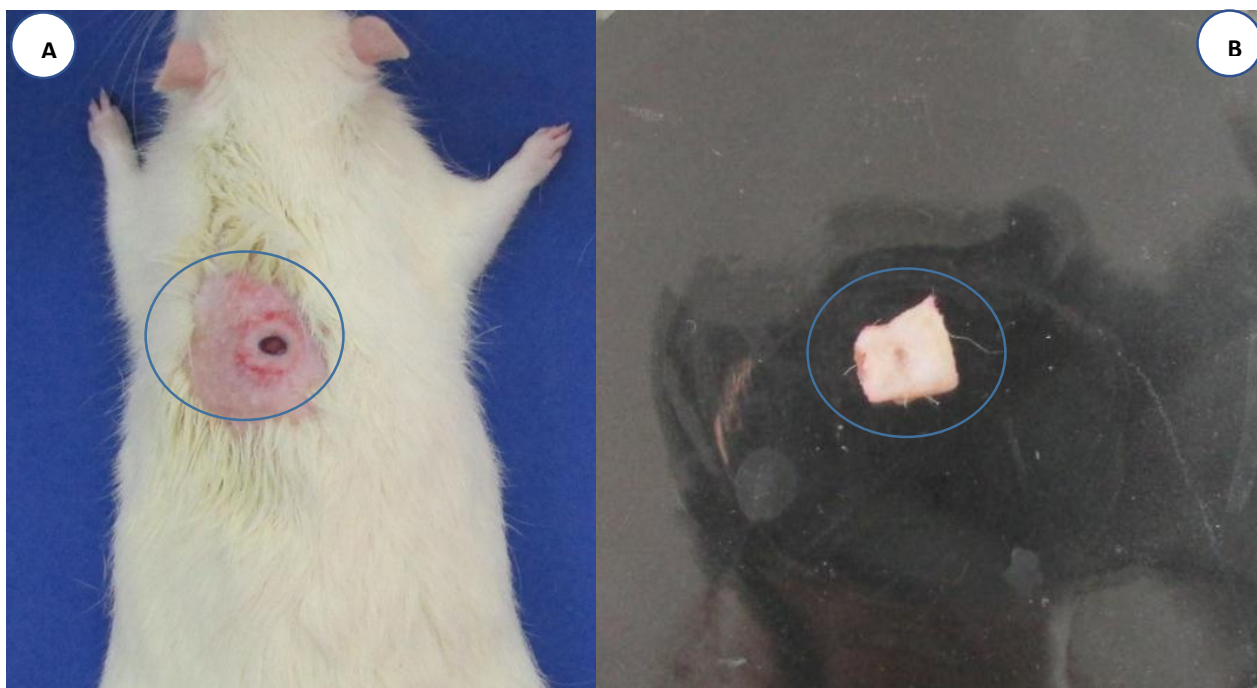


Figura 01-A-aspecto da área cirúrgica no dorso do animal (indução da lesão), B-Fragmento de tecido para análise microscópica.

Fonte: Santos (2018)

O grupo controle negativo (GN) foi tratado com solução salina e o grupo controle positivo (GP) com óleo de girassol. Aplicação diária, uma vez ao dia durante 7 e 14 dias. Neste estudo foi utilizado o extrato hidroalcoólico de *Libidibia ferrea*, ácido elágico e ácido gálico. Estes compostos foram solubilizados em água destilada para a obtenção do extrato aquoso, com uma concentração de 12,5%. Após a assepsia das lesões as soluções foram aplicadas diariamente, uma vez ao dia, durante 7 e 14 dias, com uma dose de 50 microlitros. Todos os cortes foram corados com Picrosirius e examinados ao microscópio óptico sob luz polarizada (Olympus BX-53 ®, Japão). A observação das fibras colágenas por meio desse método permitiu a diferenciação do colágeno tipo I e tipo III. De cada lâmina, foram selecionados 2 campos histológicos com aumento de 10x. Os campos foram selecionados da esquerda para a direita e de cima para baixo. As imagens foram analisadas com ajuda do software Image J, com o plug-in Threshold Colour, obtendo-se o percentual de colágeno por meio da análise de partículas automatizadas de acordo com seleção e medida das áreas com base na cor. Os valores para cada tipo de colágeno no Threshold Colour foram padronizados para todas as imagens do seguinte modo: matriz 0-40 para a cor vermelha (colágeno tipo I) e 45-120 para a cor verde (colágeno tipo III).

### 3-RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1-Perfil do extrato hidroalcólico dos frutos (pericarpo) por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA).

O surgimento de bandas ou zonas de coloração azul ou verde escura sobre a placa após a aplicação do reagente indica a presença de metabólitos pertencentes à classe dos taninos hidrolisáveis ou condensáveis, respectivamente. Na imagem correspondente à Figura 02 é possível observar a presença de bandas de um tom mais escuro que contrastam com a superfície da placa de coloração fracamente amarelada.

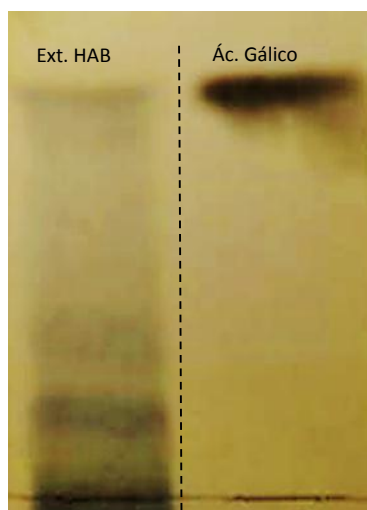


Figura 02 - Cromatoplaça do Extrato hidroalcólico bruto (Ext. HAB.) e padrão de ácido gálico (Ác. Gálico) após a aplicação do reagente  $\text{FeCl}_3$  (Cloreto férrico).

As bandas de coloração azul escuras evidenciam um resultado positivo para o teste de detecção de metabólitos pertencentes à classe dos taninos hidrolisáveis ou pirogálicos no extrato bruto. Como identificado na imagem da figura 02, o grupo de bandas ao lado esquerdo corresponde ao cromatograma do extrato e, ao lado direito, a única banda observada, próximo ao topo da placa, é referente ao padrão de ácido gálico. A semelhança na coloração entre a banda referente ao padrão de ácido gálico e as bandas que correspondem aos constituintes da amostra sugere que todos pertencem a mesma classe de fenólicos, isto é, o mecanismo de reação é o mesmo para todos os compostos presentes, produzindo um resultado semelhante ou equivalente, como o observado. A presença do ácido gálico e de taninos hidrolisáveis no extrato hidroalcólico de frutos de *L. ferrea* pode ser considerada uma forma rápida e eficaz de controle de qualidade de

matéria prima da droga vegetal (Jucá), pois para a Farmacopéia Brasileira um dos requisitos para ser aprovado como droga é a presença de ácido gálico e taninos nas amostras.

### **3.2-Perfil dos compostos fenólicos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas-CG/EM.**

Uma amostra do extrato hidroalcoólico seco, preparado a partir do epicarpo de frutos de *Libidibia ferrea*, foi submetida aos processos sucessivos de hidrólise alcalina e hidrólise ácida, nesta ordem, sob aquecimento e agitação assistida por ondas ultrassônicas seguida de extração por partição com solvente orgânico, como descrito na (metodologia de hidrólise). Após a realização do procedimento de extração, a fase aquosa foi descartada e à fase orgânica aplicou-se o processo de derivatização descrito na (metodologia de derivatização), modificando algumas características químicas e físicas dos constituintes da amostra que possibilitem sua detecção e identificação por CG-EM. A Figura 03 corresponde ao perfil cromatográfico da amostra por CG-EM após, submetido ao processo de derivatização. A tabela 01 apresenta os picos identificados, seus tempos de retenção, expresso em minutos, e sua área percentual relativa. De acordo com a tabela a composição química da amostra possui uma ampla variedade de substâncias entre ácidos graxos, ácidos orgânicos alifáticos e ácidos fenólicos, todos identificados automaticamente pelo *software* do equipamento através da comparação entre o espectro de massas experimental gerado para cada um dos picos registrados no cromatograma da amostra e as bases eletrônicas de referência de dados espectrais de massas (NIST2011-WILEY2009-FAMES2011) armazenadas na memória do equipamento de aquisição dos dados.

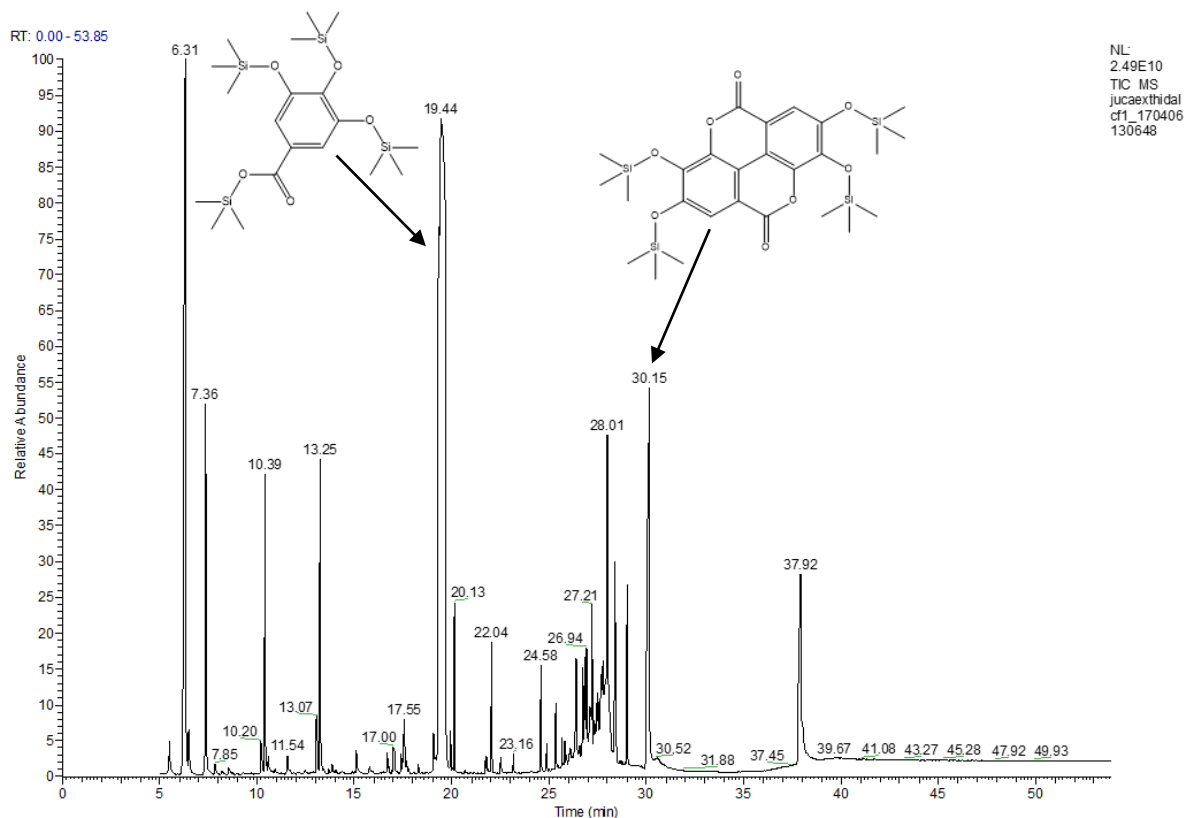


Figura 03 - Perfil químico em CG-EM, do extrato hidroalcolóico de frutos (epicarpo) de *Libidibia ferrea*.

Como observado na tabela 01, foram identificadas 18 substâncias, 17 destas em sua forma sililada, substâncias que possuem a sigla tms (trimetilsiloxisano) após seu nome sistemático, em sua grande maioria sendo ácidos graxos e estando em baixas concentrações, estando apenas o ácido láctico em concentração significativa, correspondendo a 10,76% de área percentual relativa.

Os ácidos gálico e elágico (ácidos fenólicos) foram detectados em concentrações significativas correspondendo a 44,92 e 7,47%, respectivamente, ou seja, essas duas substâncias somam cerca de 52% do total de constituintes da amostra. Quando comparamos os resultados obtidos na análise da composição de ácidos fenólicos do epicarpo dos frutos com outros órgãos de *Libidibia ferrea* como folhas e raízes de plântulas foi verificado que diferem em dois aspectos: perfil de ácidos fenólicos presentes e concentração desses ácidos. O ácido gálico é o ácido fenólico que está presente em todas as partes da planta analisadas, sendo encontrado em menores concentrações nas amostras de extrato das raízes. Nas folhas de plântulas, além do ácido gálico, foram

encontrados também os ácidos ferrúlico e cafeico em concentrações mais baixas e não tão significativas. A concentração significativa de ácido gálico foi detectada no extrato do epicarpo do fruto, como já citado, no entanto, somente nesta parte da planta foi detectada a presença do ácido elágico em concentração significativa. Os ácidos fenólicos são amplamente estudados devido demonstrarem uma série propriedades bioativas, como antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e antitumoral (HELENO et al., 2014).

Para o ácido gálico em especial, diversos estudos relatam propriedades tal como antineoplásicos, bacteriostática, antimelanogênica e antioxidante (FERREIRA et al, 2016, FERREIRA et al, 2015). Em outros estudos esta molécula demonstrou possuir propriedades anticâncer (HELENO, 2014, KIM, 2007; NAKAMURA et al, 2002), ou seja, todas essas propriedades bioativas tem despertado grande interesse das indústrias farmacêuticas e de cosméticos.

Tabela 01 - Principais substâncias identificadas do extrato hidroalcolólico de frutos (epicarpo) de *Libidibia ferrea*

Picos	Substâncias	Tempo de Retenção (min)	Area (%)
1	Acido d-lactico 1tms	6.31	10.76
2	Acido oxálico 2tms	7.36	3.44
3	Acido butanedioico 2tms	10.2	0.31
4	Acido pirotartarico 2tms	10.39	1.93
5	1-Oxo-1, 2,3-tri (trimetilsiloxi) propano	10.57	0.13
6	Acido tartonico 3tms	11.54	0.32
7	Acido malico 3tms	13.07	0.65
8	2-Deoxieritropentono-1,4-lactona 1tms	13.25	3.19
9	Acido arabinonico 3tms	15.09	0.27
10	Acido cis-aconitico 3tms	16.68	0.26
11	Ácido d-ribo-hexonico 3tms	17	0.443
12	Acido xiquimico 3tms	17.55	1.04
13	Acido gálico 4tms	19.44	44.92
14	Acido palmitico 1tms	20.13	1.02
15	Acido trans-9-octadecenoico 1tms	21.78	0.28
16	Acido esteárico 1tms	22.04	0.75
17	Mono (2-etilhexil) fitalato	24.58	0.839
18	Acido elágico 4tms	30.15	7.47

### 3.3-Avaliação do processo de cicatrização em feridas limpas induzidas cirurgicamente

Picrosirius é uma coloração seletiva de tecido conjuntivo que permite uma análise qualitativa das fibras colágenas do tecido conjuntivo. Quando observada sob luz polarizada, pela diferença na interferência de cores, na intensidade e na birrefringência dos tecidos corados, essa coloração permite a diferenciação principalmente das fibras tipo I e tipo III (BEDOYA, 2016)

Tabela 02 - Avaliação histopatológica para avaliação de formação de colágenos.

GRUPOS	AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA			
	7 dias		14 dias	
	Colágeno Tipo I (VERMELHO) %	Colágeno Tipo III (VERDE) %	Colágeno Tipo I (VERMELHO) %	Colágeno Tipo III (VERDE) %
Controle Positivo	7,86	27,80	45,69	25,000
Controle Negativo	5,39	31,70	45,60	19,90
Ácido Elágico	15,03	26,01	48,90	32,40
Ácido Gálico	2,43	31,94	29,40	27,90
Extrato Bruto	5,66	24,24	40,30	27,90

O Colágeno é a proteína mais abundante no organismo, existem pelo menos 20 subtipos de colágenos. Dois subtipos são importantes para a reparação de feridas. O colágeno tipo I predomina na matriz extracelular da pele intacta e o colágeno tipo III, está presente em menor quantidade na pele intacta e torna-se mais frequente no processo de cicatrização de feridas, especialmente na fase inicial da cicatrização. A síntese de colágeno inicia horas após o ferimento, mas se torna significativa aproximadamente uma semana após a lesão. A ativação dos fibroblastos para sintetizar o colágeno é derivada de fatores de crescimento e das próprias condições metabólicas da ferida (MEDEIROS e FILHO, 2016).

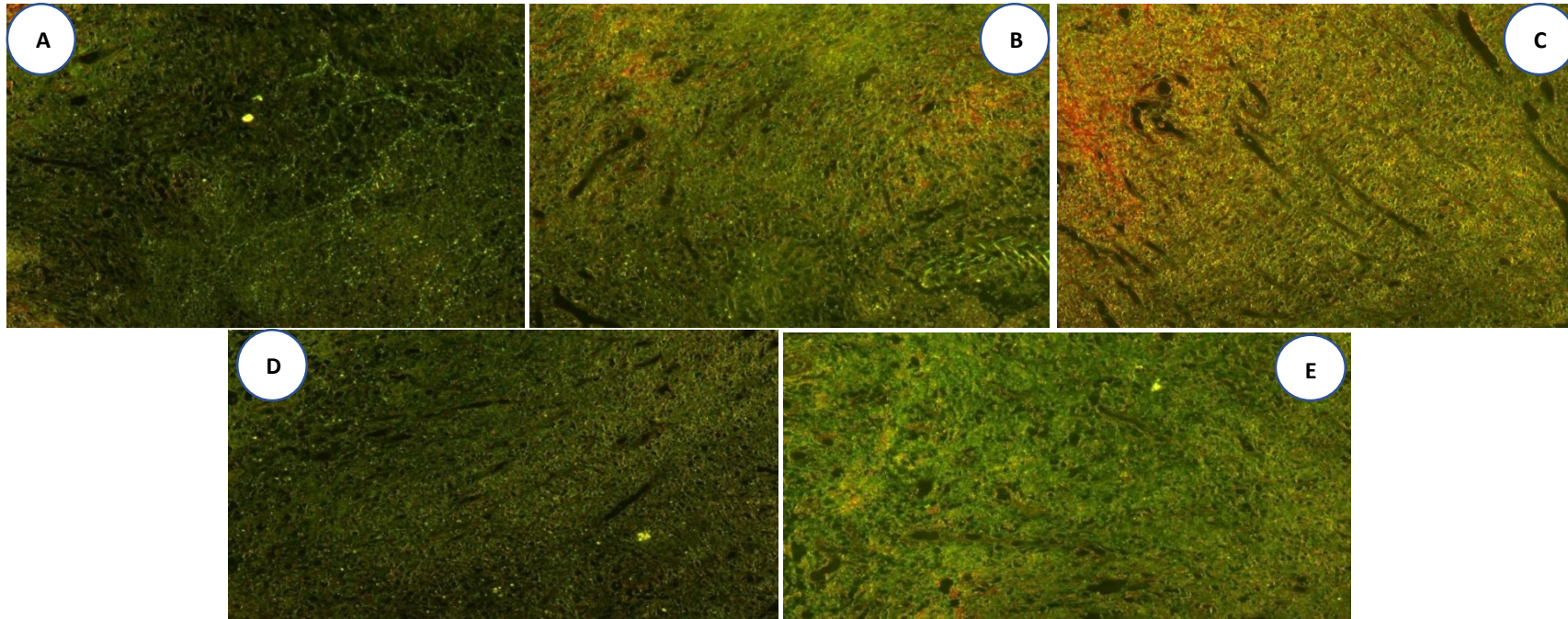


Figura 04 - Análises microscópicas de tecidos animais e avaliação pelo método de *Picrosirius* (7 dias). A-Controle negativo, B-Controle positivo, C-tecido tratado com ácido elágico, D- tecido tratado com ácido gálico, E- tecido tratado com extrato bruto de *Libidibia ferrea*.

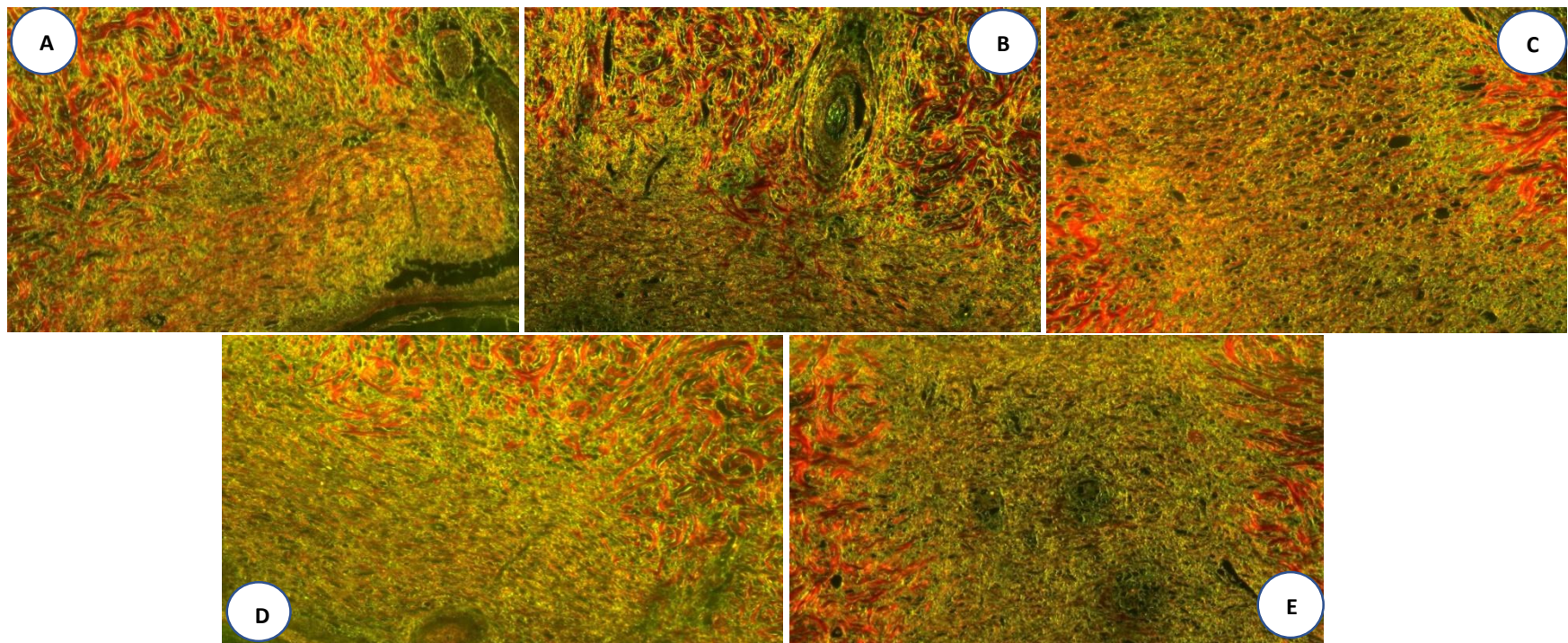


Figura 05 - Análises microscópicas de tecidos animais e avaliação pelo método de *Picrosirius* (14 dias). A-Controle negativo, B-Controle positivo, C-tecido tratado com ácido elágico, D- tecido tratado com ácido gálico, E- tecido tratado com extrato bruto de *Libidibia ferrea*.

Pedrosa et al (2016) ao analisar extratos do caule e frutos de *Libidibia ferrea* por CL-EM destacam os seguintes compostos: ácido quínico, ácido glucônico, ácido gálico, ácido cafeico, ácido elágico, catequina, epicatequina, quercetina e kaempferol. Os autores relacionaram a presença destes ácidos fenólicos e flavonóides como as substâncias mais recorrentes responsáveis pelas atividades antirrugas e anti-branqueamento.

A presença de ácido gálico e ácido elágico no extrato hidroalcolico de *Libidibia ferrea* podem ser responsáveis pela atividade antioxidante, responsável por modular efeitos do estresse oxidativo que está diretamente envolvida na aceleração do envelhecimento da pele.

#### **4 - CONCLUSÃO**

Através dos processos cromatográficos empregados no extrato bruto hidroalcolico dos frutos de *Libidibia ferrea* foi possível identificar os ácidos gálico e elágico. A cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas mostrou ser um método eficaz para identificação destes compostos fenólicos no extrato bruto hidroalcolico do epicarpo dos frutos de *L. ferrea*.

Quanto à atividade cicatrizante os resultados sugerem que o extrato bruto, os ácidos gálico e elágico mostraram-se eficiente na proliferação do colágeno tipo III na fase inicial do processo de reparação tecidual e que pode ter sido induzido pelas ações dos ácidos gálico e elágico.

## 5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, U. P. Re-examining hypotheses concerning use and knowledge of medicinal plants: a study in the Caatinga vegetation of NE Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 2, n. 1, p. 30, jul. 2006.

BACCHI, E. M.; SERTIE, J. A.; VILLA, N.; KATZ, H. Antiulcer action and toxicity of *Styrax camporum* and *Caesalpinia ferrea*. **Planta Medica**, v. 61, n. 3, p. 204-207, 1995.

BAHIA, M. V.; SANTOS, J. B., DAVID J. P.; DAVID, J. M. Biflavonoids and other phenolics from *Caesalpinia pyramidalis* (Fabaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6B, p. 1402-1405, nov./dez. 2005.

BARROS, A. O.; SOUZA, R. S.; ARANHA, E. S. P.; COSTA, L. M.; SOUZA, T. P.; VASCONCELLOS, M. C.; LIMA, E. S. Antioxidant and hepatoprotective activities of *Libidibia ferrea* bark and fruit extracts. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 11, p. 71-76, 2014.

BEDOYA, S. A. O.; CONCEIÇÃO, L. G.; VILORIA, M. I. V.; LOURES, F. H.; VALENTE, F. I.; AMORIM R. L.; SILVA, F. F. Caracterização de colágenos tipos I e III no estroma do carcinoma de células escamosas cutâneo em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 1, p. 147-154, jan. 2016.

CARVALHO, J. C.; TEIXEIRA, J. R.; SOUZA, P. J.; BASTOS, J. K.; SANTOS FILHO, D.; SARTI, S. J. Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 53, n. 3, p. 175-178, set. 1996.

CAVALHEIRO, M. G.; FARIAS, D. F.; FERNANDES, G. S.; NUNES, E. P.; CAVALCANTI, F. S.; VASCONCELOS, I. M.; MELO, V. M. M.; CARVALHO, A. F. U. Atividades biológicas e enzimáticas do extrato aquoso de sementes de *Caesalpinia*

*ferrea* Mart., Leguminosae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 19, n. 2B, p. 586-591, mai. 2009.

COSTA, L. M.; GUILHON-SIMPLICIO, F.; SOUZA, T. P. *Libidibia ferrea* (Mart. Ex TUL) L. P Queiroz var. *ferrea*: Pharmacological, Phytochemical and Botanical Aspects. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, p. 48-53, jan. 2015.

CUNHA, A. P. da. **Farmacognosia e Fitoquímica**. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 2014.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. São Paulo: UNESP, 2002. 604 p.

FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010. Ministério da Saúde, vol. I., 5ª. Edição, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília.

FERREIRA, M. R. A.; SOARES, L. A. L. *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul) L. P Queiroz : A review of the biological activities and phytochemical composition. **Journal of medicinal plants**, v. 9, n. 2, p. 140–150, 2015.

FERREIRA, M. R.; FERNANDES, M. T.; SILVA, W. A.; BEZERRA, I. C.; SOUZA, T. P., PIMENTEL, M. F.; SOARES, L. A. L. Chromatographic and spectrophotometric analysis of phenolic compounds from fruits of *Libidibia ferrea* Martius. **Pharmacognosy magazine**, v. 12, n. Suppl 2, p. S285-S291, mai. 2016.

FRASSON, A. P. Z.; BITTENCOURT, C. F.; HEINZMANN, B. M. Caracterização físico-química e biológica do caule de *Caesalpinia ferrea* Mart. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n 1, p. 35-39, 2003.

FREITAS, A. C. C.; XIMENES, N. C. A.; AGUIAR, J. S.; NASCIMENTO, S. C.; LINS, T.U. L.; MAGALHÃES, L. R.; COELHO, L. C. B. B.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G.; GONÇALVES-SILVA, T.; CORREIA, M. T. S. Biological Activities of *Libidibia*

(*Caesalpinia ferrea* var. *parvifolia* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz Pod Preparations. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, mar. 2012.

GIRALDI, M.; HANAZAKI, N. Uso e conhecimento tradicional de plantas medicinais no Sertão do Ribeirão, Florianópolis, SC, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 2, p. 395-406, fev. 2010.

KIM, Y. J. Antimelanogenic and antioxidant properties of gallic acid. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 6, p. 1052-1055, 2007.

KOBAYASHI, Y. T. S.; ALMEIDA, V. T.; BANDEIRA, T.; ALCÂNTARA, B. N.; SILVA, A. S. B.; BARBOSA, W. L. R.; SILVA, P. B.; MONTEIRO, M. V. B.; ALMEIDA, M. B. Avaliação fitoquímica e potencial cicatrizante do extrato etanólico dos frutos de Jucá (*Libidibia ferrea*) em ratos Wistar. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 52, n. 1, p. 34-40, abr. 2015.

LIMA, S. M. A.; ARAÚJO, L. C. C.; SITÔNIO, M. M.; FREITAS, A. C.; MOURA, S. L.; CORREIA, M. T. S.; MALTA, J. N.; GONÇALVES-SILVA, T. Potencial anti-inflamatório e analgésico da *Caesalpinia ferrea*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, p. 169-175, 2011.

MORESKI, D. A. B.; LEITE-MELO, E. V. S.; BUENO, F. G. Ação cicatrizante de plantas medicinais: um estudo de revisão. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 22, n. 1, p. 63-69, jan. /abr. 2018.

NAKAMURA E. S.; KUROSAKI, F.; ARISAWA, M.; MUKAINAKA, T.; TAKAYASU, J.; OKUDA, M.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; PASTORE, F. Cancer chemopreventive effects of a Brazilian folk medicine, Juca, on in vivo two-stage skin carcinogenesis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, n. 1, p. 135-137, jun. 2002a.

NAKAMURA, E. S.; KUROSAKI, F.; ARISAWA, M.; MUKAINAKA, T.; OKUDA, M.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; PASTORE, F. Cancer chemopreventive effects of

constituents of *Caesalpinia ferrea* and related compounds. **Cancer Letters**, v. 177, p. 119-124, 2002b.

NOZAKI, H.; HAYASHI, K.; KIDO, M.; KAKUMOTO, K.; IKEDA, S.; MATSUURA N.; TANI, H.; TAKAOKA, D.; IINUMA, M.; AKAO, Y. Pauferrol A, a novel chalcone trimer with a cyclobutane ring from *Caesalpinia ferrea* mart exhibiting DNA topoisomerase II inhibition and apoptosis-inducing activity. **Tetrahedron Letters**, v. 48, n. 47, p. 8290-8292, nov. 2007.

OLIVEIRA, A.F.; BATISTA, J.S.; PAIVA, E.S.; SILVA, A.E.; FARIAS, Y.J.M.D.; DAMASCENO, C.A.R.; BRITO, P.D.; QUEIROZ, S.A.C.; RODRIGUES, C.M.F.; FREITAS, C. I. A. Avaliação da atividade cicatrizante do jucá (*Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. var. *ferrea*) em lesões cutâneas de caprinos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 3, p. 302-310, mar. 2010.

OLIVEIRA, I. V. P. DE M. Avaliação cicatricial macroscópica da vagem e da casca do jucá (*Caesalpinia ferrea* MART. EX TUL. VAR. *ferrea*) em lesões cutâneas em asininos (*Equus asinus*). **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 8, n. 2, p. 129-135, 2014.

PEDROSA, T. N.; BARROS, A. O.; NOGUEIRA, J. R.; FRUET, A. C.; RODRIGUES, I. C.; CALCAGNO, D. Q.; SMITH, M. A. C.; SOUZA, T. P.; BARROS, S. B. M.; VASCONCELOS, M. C.; SILVA, F. M. A.; KOOLEN, H. H. F.; MARIA-ENGLER, S. S.; LIMA, E.S. Anti-wrinkle and anti-whitening effects of jucá (*Libidibia ferrea* Mart.) extracts. **Archives of Dermatological Research**, v. 308, n. 9, p. 643-654, nov. 2016.

POLHILL, R. M.; VIDAL, J. E. Caesalpinieae. In: POLHILL, R. M.; RAVEN, P. H. (Eds.). **Advances in Legume Systematics 1**. Kew: Royal Botanic Gardens, 1981.

POLHILL, R. M.; VIDAL, J. E. Caesalpinieae. In: POLHILL, R. M.; RAVEN, P. H. (Eds.). **Advances in Legume Systematics 1**. Kew: Royal Botanic Gardens, 1981.

QUEIROZ, L. P. **Leguminosas da Caatinga**. 2. ed. Feira de Santana: Universidade Estadual de Feira de Santana, 2009. 443 p.

SAWADA, L. A.; MONTEIRO, V. S. C.; RABELO, G. R.; DIAS, G. B.; CUNHA, M.; NASCIMENTO, J. L. M.; BASTOS, G. N. T. *Libidibia ferrea* mature seeds promote antinociceptive effect by peripheral and central pathway: possible involvement of opioid and cholinergic receptors. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

SOARES, J. A.; BARROS, M.; GONÇALEZ, W.P; CRISCI, A.N; JORGE, M.H.S Avaliação da atividade cicatrizante da *Caesalpinia ferrea* ex . TUL . var *ferrea* e da *Aloe vera* (L.) Burm. f. em lesões cutâneas totais em ratos. **Perspectiva online: biologia & saúde**, p. 33-42, 2013.

UEDA, H.; TACHIBANA, Y.; MORIYASU, M.; KAWANISHI, K.; ALVES, S. M. Aldose reductase inhibitors from the fruits of *Caesalpinia ferrea* Mart. **Phitomed.**, v. 8, n. 5, p. 377-381, 2001.

ZANIN, J. L. B.; CARVALHO, B. A.; MARTINELLI, P. S.; SANTOS, M. H; LAGO, J. H. G.; SARTORELLI, P.; VIEGAS JR, C.; SOARES, M. G. The genus *Caesalpinia* L. (Caesalpinaceae): phytochemical and pharmacological characteristics. **Molecules**, v. 17, n. 7, p. 7887-7902, jun. 2012.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Foi possível evidenciar alguns aspectos inovadores, como a cultura de células e a cultura de embriões como possibilidade de propagação, além da produção de metabólitos de interesse *in vitro*, isto pode representar uma alternativa para utilização sustentável dos recursos desta espécie em detrimento ao extrativismo. A Aplicação de técnicas de metabolômica na identificação do perfil dos compostos fenólicos e na avaliação das atividades biológicas é um aporte importante neste tipo de pesquisa, além de representar ferramentas para o controle de qualidade da matéria prima.