



V Simpósio de Estudos e
Pesquisas em Ciências
Ambientais na Amazônia

ANAIS

Trabalhos Completos Aprovados – 2016

Volume I

ISSN: 2316-7637

Belém - Pará



HISTOQUÍMICA DO XILEMA SECUNDÁRIO DE *Genipa americana* L. (RUBIACEAE)

Jéfyne Campos Carréra¹; Elienara Almeida Rodrigues²; Larissa da Silva Pereira¹; Ana Claudia Gama Batista¹; Marta Freire da Silva¹; Fernanda Ilkiu-Borges³.

¹Graduanda do Curso de Engenharia Florestal. Universidade do Estado do Pará, CCNT, Campus V.

jefyne@hotmail.com

² Bióloga; Laboratório de Botânica; Embrapa Amazônia Oriental, rua Enéas Pinheiro s/n, C.P.48, Belém, PA.

³Pesquisadora, Dra; Laboratório de Botânica; Embrapa Amazônia Oriental, rua Enéas Pinheiro s/n, C.P.48, Belém, PA.

RESUMO

Genipa americana L. é uma árvore nativa de várzeas úmidas que ocorre em todo o território brasileiro. Apresenta natureza química diversa, segundo estudos com suas flores, frutos, casca e sementes. Entretanto, nenhum estudo foi voltado a elucidar as substâncias que possam ser encontradas no xilema secundário da espécie. O objetivo no presente trabalho foi avaliar por meio de testes histoquímicos (qualitativos) a presença e a localização de substâncias no xilema secundário de *G. americana* L., como forma de contribuir com os estudos fitoquímicos dessa espécie. Foram retiradas amostras de madeira de três indivíduos, coletadas no município de Tomé-açu, PA. As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de botânica da Embrapa Amazônia Oriental para a realização dos testes. Os testes indicaram a presença de amido e substâncias lipídicas em células de parênquima e açúcares redutores nas fibras. A presença dessas substâncias no xilema secundário de *G. americana* auxilia na compreensão de processos adaptativos relacionados à defesa da planta, bem como nos processos fisiológicos, além de contribuir com a taxonomia do gênero.

Palavras-chave: Anatomia. Jenipapo. Madeira.

Área de Interesse do Simpósio: Química Ambiental.

1. INTRODUÇÃO

Genipa americana L. pertence à família Rubiaceae (SOUZA E LORENZI, 2012). É uma árvore de copa estreita, com aproximadamente 8 a 14 m de altura, com tronco liso, de 40 a 60 cm de diâmetro, nativa de várzeas úmidas, que ocorre em todo o território brasileiro. (LORENZI E MATOS, 2008). A espécie é comumente encontrada em faixas marginais ao longo dos rios, em áreas de florestas secundárias ou em áreas degradadas pela agricultura itinerante (NASCIMENTO E DAMIÃO-FILHO, 1998; ORWA et. al, 2009).



A madeira de *G. americana*, comercializada como jenipapo (nome vernacular), é considerada de boa qualidade, dura, flexível e de boa trabalhabilidade, sendo usada em construções, na fabricação de móveis, lenha ou carvão, em arcos de barris, embarcações de pequeno porte e carpintaria (CONABIO, 2016). Apesar da presença dessas substâncias ser comumente associada a benefícios, a densa camada de mucilagem que recobre as sementes da espécie pode ser um empecilho à germinação (BEZERRA et. al., 2015). *G. americana* possui muitas substâncias em sua composição como o manitol, os taninos, a hidantoína, os ácidos tânicos, e os iridóides, característicos da família Rubiaceae (ERBANO E DUARTE, 2010).

Essas substâncias presentes na espécie permitem sua aplicação em diversos mercados. As flores, por exemplo, são utilizadas para a produção de óleos aromáticos e também em infusões medicinais; a casca é utilizada por conter quantidades significativas de taninos; a casca, resinas e frutos, são atribuídas propriedades medicinais; os frutos, principais produtos da espécie, são conhecidos por serem fonte de ferro, riboflavinas e substâncias antibacterianas, há relatos que as comunidades indígenas utilizam a polpa obtida dos frutos maduros de *G. americana*, como repelente para insetos e na etnomedicina, quando os frutos estão imaturos, são utilizados na extração de corantes (NASCIMENTO, CARVALHO E CARVALHO, 2000; BTFP, 2005).

A maioria dos trabalhos voltados a elucidar a natureza química dessa espécie, estudam principalmente folhas, frutos e sementes (GUARNACCIA et. al., 1972; ALVES, 2004; PACHECO et. al., 2014; PORTO et.al., 2014; SANTANA NETA, 2014; VELÁSQUEZ; RIVAS E OCANTO, 2014; BEZERRA et. al., 2015; SANTOS, 2015).

A histoquímica tem sido uma técnica muito utilizada na identificação direta das classes de metabólitos secundários (ESPOSITO-POLESI; ALMEIDA E ALMEIDA, 2013; BELOTTO et. al., 2014). Os metabólitos secundários não estão diretamente relacionados com o crescimento e desenvolvimento das plantas, assumindo características funcionais e atuando como sinais químicos que as permitirão responder aos estímulos ambientais. (SALISBURY; ROSS, 1991; RAVEN; EICHHORN; EVERT, 2001).

Não foram encontrados, estudos que visem determinar por meio de testes qualitativos, as substâncias químicas que podem ser encontradas no xilema secundário (lenho) do jenipapo.



Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo avaliar por meio de testes histoquímicos a presença e a localização de substâncias no xilema secundário de *G. americana* L. como forma de contribuir com os estudos fitoquímicos dessa espécie.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram retiradas amostras de madeira de três indivíduos de *G. americana*, coletadas no município de Tomé-açu, PA. As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de botânica da Embrapa Amazônia Oriental para a realização dos testes.

Dos corpos de prova, de 2 cm³, foram obtidos cortes histológicos nas seções transversal, longitudinais tangencial e radial, seccionados em micrótomo de deslize. Após isso, foram aplicados testes histoquímicos (testes qualitativos), indicados no manual básico de métodos em morfologia vegetal (KRAUS E ARDUIN, 1997), para a localização das seguintes substâncias: lipídios (SASS, 1951), compostos fenólicos (taninos) (JOHANSEN, 1940), amido (JENSEN, 1962) e açúcares redutores (PURVIS et. al., 1964).

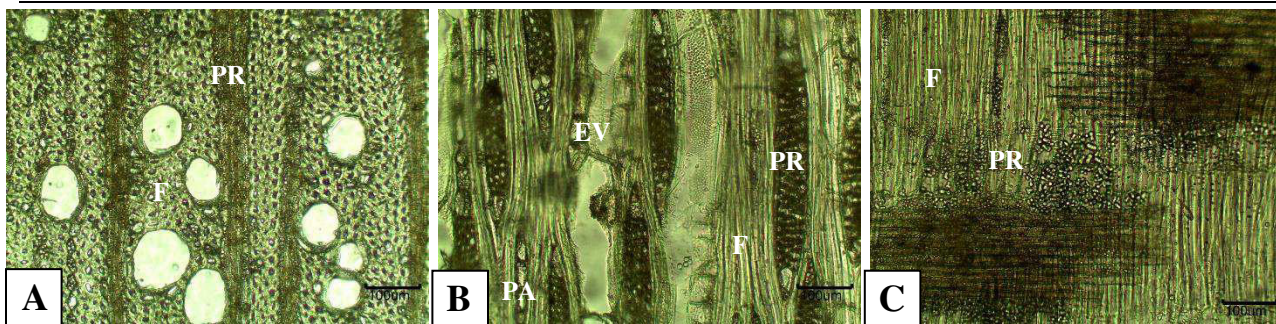
Os reagentes utilizados para os testes foram Sudam III (lipídios), cloreto férrico na concentração de 10% (compostos fenólicos – taninos), Lugol na concentração de 2% (amido) e solução de Fehling (açúcares redutores).

Após a verificação com as substâncias, os cortes foram fotografados em microscópio com câmera acoplada e as imagens processadas por meio do software Motic.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A testemunha mostra a coloração natural da madeira de *G. americana*, a qual pode apresentar o cerne com uma variação do marrom, cinzento ou amarelo (RICHTER E DALLWITZ, 2000) (Figura 1).

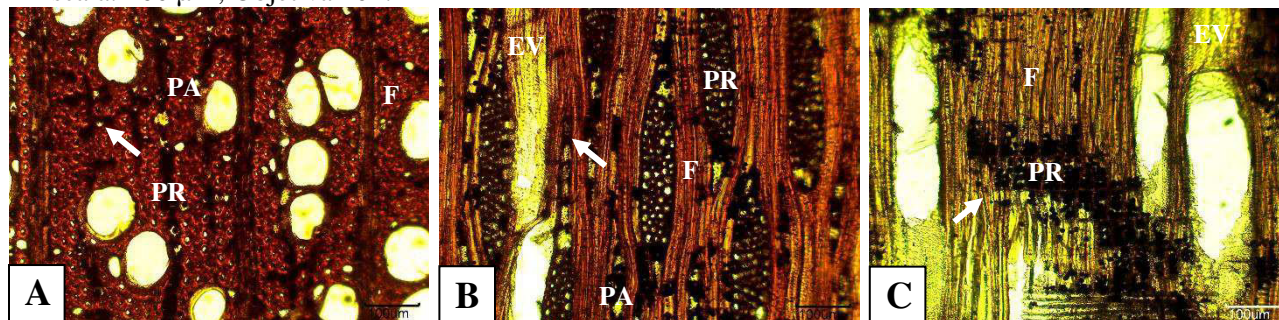
Figura 1 – Testemunha (branco analítico) de *G. americana* L. A: Corte transversal. B: Aspecto tangencial. C: Corte longitudinal radial. EV: Elemento de vaso; F: Fibras; PA: Parênquima axial; PR: Parênquima radial. Escala: 100 µm; Objetiva 10x.



Fonte: Autores, 2016.

A reação com Lugol a 2%, de acordo com Kraus e Arduin (1997), faz com que os grãos de amido adquiram coloração que varia do azul negro ao marrom muito escuro. Foram observados, a partir de tal reação, grãos de amido nas células de parênquima axial e radial, visíveis nos cortes dos três planos, transversal, tangencial e radial (figura 2A a 2C).

Figura 2 – Teste histoquímico para amido com lugol 2%. A: Corte transversal mostrando reação em células de parênquima axial e radial. B: Aspecto tangencial com grãos de amido detectados em células parenquimáticas. C: Corte longitudinal radial mostrando reação nas séries de células de parênquima radial. EV: Elemento de vaso; F: Fibras; PA: Parênquima axial; PR: Parênquima radial. Setas: grãos de amido. Escala: 100 µm; Objetiva 10x.



Fonte: Autores, 2016.

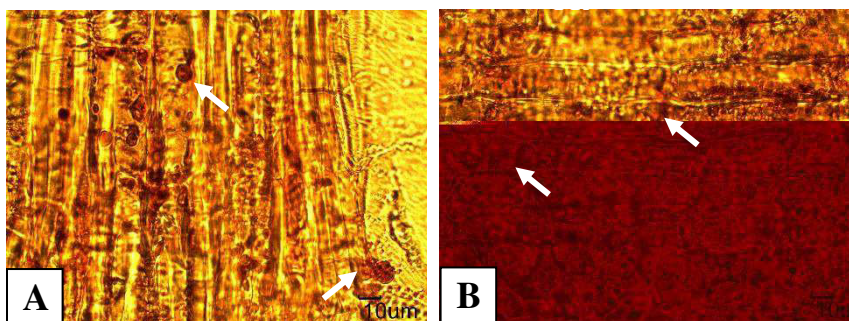
As células de parênquima são responsáveis por armazenar diversas substâncias; o parênquima de reserva, tecido que armazena metabólitos primários das plantas, possui classificação de acordo com sua especialidade, a exemplo do amilífero, que deposita amidos em amiloplastos (APEZZATO-DA-GLÓRIA E CARMELLO-GUERREIRO, 2013).

O amido é um carboidrato insolúvel presente em quase todas as plantas, servindo como um alimento que lhes proporcionará energia durante a dormência ou a germinação. Surge a partir da triose-fosfato gerada no Ciclo de Calvin; a síntese ocorre, mais especificamente, pela formação de ADP-glucose no interior dos cloroplastos. As concentrações relativas de ortofosfato e triose-fosfato são consideradas determinantes no controle do carbono fixado fotossinteticamente, isto é, se deverá

ser alocado como amido em cloroplastos ou sacarose no citosol (ENÉAS FILHO; MIRANDA E SILVEIRA, 2016)

Substâncias lipídicas puderam ser observadas a partir da reação do Sudam III com o conteúdo presentes nas células do xilema. Kraus e Arduin (1997) afirmam que a reação com Sudam III resulta em coloração do conteúdo em amarelo-alaranjado ou vermelho. A concentração de substâncias lipídicas ocorreu nas células de parênquima axial e radial. (figura 3A e 3B).

Figura 3– Teste histoquímico para substâncias lipídicas com Sudam III. A: Corte tangencial mostrando reação em células de parênquima axial. B: Aspecto radial mostrando reação nas séries de células de parênquima radial. PA: Parênquima axial; PR: Parênquima radial. Setas: gotas de óleo. Escala: 10 µm; Objetiva 40x.

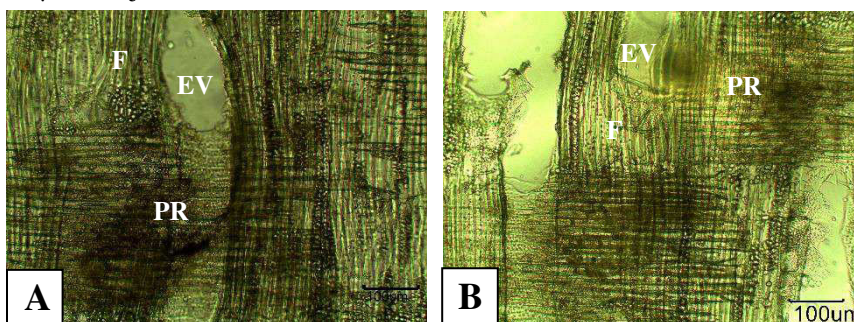


Fonte: Autores, 2016.

Assim como o amido as células de parênquima são também responsáveis por armazenar substâncias lipídicas (ESAU, 2013). A presença de substâncias lipídicas nas células é constantemente associada ao mecanismo de defesa da planta, visto que podem apresentar propriedades antibióticas, antifúngicas e antivirais (CHAGAS et. al., 2002).

Esperava-se com a solução de cloreto férrico à 10%, a reação que evidenciaria a presença de taninos (compostos fenólicos). Oliveira (2015) afirma que a reação à taninos ocorre se nas estruturas em que se aplica a solução for observada uma coloração do azul-esverdeado ao marrom; o mesmo não pode ser constatado nos cortes da espécie estudada, conforme pode ser observado na comparação com a testemunha (Figuras 4A e 4B).

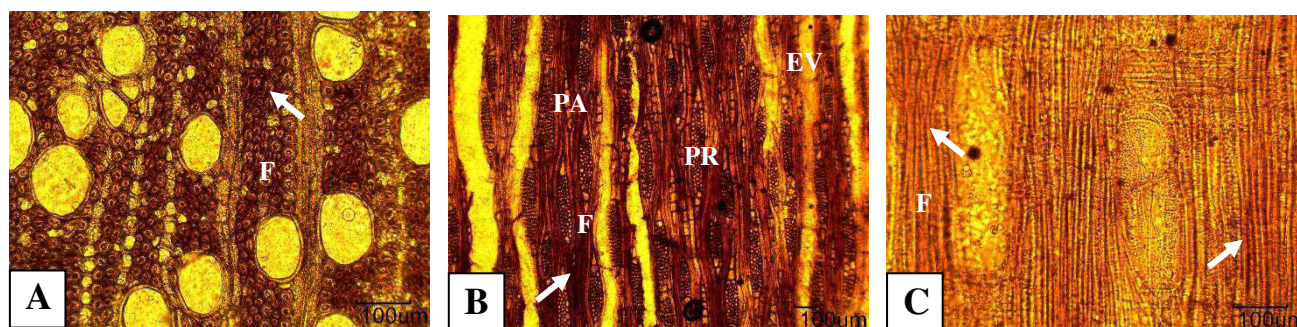
Figura 4 – Teste histoquímico para taninos (compostos fenólicos) com cloreto férrico 10%. A: Corte radial da testemunha. B: corte radial com cloreto férrico a 10%. EV: Elemento de vaso; F: Fibras; PR: Parênquima radial. Escala: 100 µm; Objetiva 10x.



Fonte: Autores, 2016.

A presença de carboidratos (açúcares) redutores, glicose e frutose, a partir do teste com a solução de Fehling, é evidenciada pela coloração de vermelho a amarelo-laranja (KRAUS E ARDUIN, 1997). A reação pôde ser constatada nas regiões das fibras (Figuras 5A a 5C).

Figura 5 – Teste histoquímico para açúcares redutores com solução de Fehling. A: Corte transversal mostrando reação em paredes secundárias das fibras. B: Aspecto tangencial com carboidratos detectados nas fibras. C: Corte longitudinal radial mostrando reação nas fibras. EV: Elemento de vaso; F: Fibras; PA: Parênquima axial; PR: Parênquima radial Setas: local da reação. Escala: 100 µm; A e C: Objetiva 10x; B: Objetiva 4x.



Fonte: Autores, 2016.

A reação foi mais evidente nas fibras pela composição da parede secundárias dessas células, relacionadas com a sustentação das plantas. A composição da parede secundária, em matéria seca é 65 a 85% de polissacarídeos e 15 a 35% de lignina; o principal polissacarídeo da parede secundária é a celulose, a qual é formada a partir de monômeros de glicose (glicose uridina-difosfato – GUDP). (APEZZATO-DA-GLÓRIA E CARMELLO-GUERREIRO, 2013). Os açúcares redutores (carboidratos) estão associados ao fornecimento de energia para a maioria das atividades celulares, através de quebra de moléculas e produção de ATP (Adenosina trifosfato)



(BELTRÃO E OLIVEIRA, 2007). Do ponto de vista industrial, ensaios têm sido realizados com materiais lignocelulósicos para a obtenção de etanol por hidrólise enzimática de açúcares redutores. (BRANDANI E HELM, 2010; LAZZAROTTO; NETIPANYJ E MAGALHÃES, 2012).

4. CONCLUSÕES

Os testes histoquímicos evidenciaram a presença de grãos de amido, substâncias lipídicas, e açúcares redutores, em células de parênquima e esclerênquima do xilema secundário de *G. americana*. A reação negativa de taninos ao cloreto férrico na concentração de 10% e a presença de compostos não identificados com os reagentes utilizados, faz necessário o emprego de técnicas diferenciadas, análises que serão realizadas posteriormente. A investigação dessas substâncias auxilia na compreensão de processos adaptativos relacionados à defesa da planta, bem como nos processos fisiológicos, além de contribuir com a taxonomia do gênero.

REFERÊNCIAS

- ALVES, G. L. **Identificação dos compostos voláteis importantes para o aroma de jenipapo (*Genipa americana* L.) e murici (*Byrsonima crassifolia* L. RICH)**. 2004. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos/ Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.
- APEZZATO-DA-GLÓRIA, B; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia Vegetal**. 3. ed. Viçosa: Editora UFV, 2012. (impressão 2013). 404 p.
- BELOTTO, E. M et. al. Caracterização anatômica, histoquímica e de classes de metabólitos secundários de folhas de *Guzmania lingulata* (L.) Mez. Rev. Bras. Pl. Med., Campinas (SP), v. 16, n. 1, p. 127-134, 2014.
- BELTRÃO, N. E. M; OLIVEIRA, M. I. P. de. **Biossíntese e degradação de lipídios, carboidratos e proteínas em oleaginosas**. Documentos, n. 178. Embrapa Algodão: Campina Grande (PB), 2007.
- BEZERRA, A. K. D. et. al. Extração da mucilagem em sementes de *Genipa americana* L. visando o potencial fisiológico. Revista Ciência Agronômica. Fortaleza (CE), v. 46, n. 4, p. 786-791, out.-dez, 2015.
- BFTP – BioTrade Facilitation Programme. **Market Brief in the European Union – for selected natural ingredients derived from natural species (*Genipa americana*)**. UNCTAD/ BFTP, 2005. Disponível em: <<http://www.biotrade.org/ResourcesPublications/biotradebrief-genipaamericana.pdf>>. Acesso em: 10 Set. 2016.



BRANDANI, L. de C; HELM, C. V. **Hidrólise de enzimas lignocelulolíticas de basidiomicetos dos gêneros ganoderma e lentinula em madeira pré-tratada.** In: EVENTO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA FLORESTAS, 2., 2010, Colombo. Anais. Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2010.

CHAGAS, A. C. de S. et. al. Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus* spp. em *Boophilus microplus*. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science. São Paulo, v. 39, n. 05, p. 247-253, 2002.

CONABIO. **Genipa americana.** Disponível em: <
http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/61-rubia5m.pdf>.
Acesso em: 12 Set. 2016.

ENÉAS FILHO, J; MIRANDA, M. R. A. de; SILVEIRA, J. A. G. da. **Fisiologia Vegetal.** Disponível em:< <http://www.fisiologiavegetal.ufc.br/apostila.htm>>. Acesso: 04 nov. 2016.

ERBANO, M; DUARTE, M. R. Morfoanatomia de folha e caule de *Genipa americana* L., Rubiaceae. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 20, n. 06, p. 825-832, dez. 2010.

ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes.** Tradução de Berta Lange de Morretes. São Paulo: Blucher, 1974 (impressão 2013).

ESPOSITO-POLESI, N. P; ALMEIDA, C. V; ALMEIDA, M. Avaliação histoquímica de espécies de microplantas hospedeiras de endófitos. Revista Biociências, Taubaté (SP), v. 19, n. 2, p. 61-71, 2013.

GUARNACCIA, R. et al.. Geniposidic acid, an iridoid glucoside from *Genipa americana*. Tetrahedron Letters, V. 13, n. 50, p. 5125-5127, 1972.

KRAUS, J. E. & ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal.** Seropédica (RJ): EDUR, 1997. 198 p.

LAZZAROTTO, M; NETIPANYJ, R. R; MAGALHÃES, W. L. E. **Método de Fehling adaptado: uma ferramenta para analisar açúcares redutores totais em madeira hidrolisada.** Comunicado técnico, n. 311. Embrapa: Colombo (PR), 2012.

LORENZI, H; MATOS, F. J. de A. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas.** 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

NASCIMENTO, W. M. O; CARVALHO, J. E. U; CARVALHO, N. M. Germinação de sementes de Jenipapo (*Genipa americana* L.) submetidas a diferentes temperaturas e substratos. Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal (SP), v. 22, n. 3, p. 471-473, dez. 2000.

NASCIMENTO, W. M. O; DAMIÃO-FILHO, C. F. Caracterização morfológica de sementes e plântulas de Jenipapeiro (*Genipa americana* L.- Rubiaceae). Revista Brasileira de Sementes, v. 20, n. 1, p. 143-147, 1998.



ORWA, C. et. al. 2009. **Agroforestry Database: a tree reference and selection guide** (version 4.0). Disponível em: <<http://www.worldagroforestry.org/sites/treedbs/treedatabases.asp>>. Acesso em: 10 set. 2016.

PACHECO, P. et al. Composição centesimal, compostos bioativos e parâmetros físico-químicos do jenipapo (*Genipa americana* L.) in natura. Demetra: Alimentação, Nutrição & Saúde, v. 9, n. 4, p. 1041-1054, 2014.

PORTO, R. G. C. L et. al. Chemical Composition and Antioxidant Activity of *Genipa americana* L. (Jenipapo) of the Brazilian Cerrado. Journal of Agriculture and Environmental Sciences, v. 3, n. 4, p. 51-61, dez. 2014.

RAVEN, P. H; EVERT, R. F; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 6. ed. Coordenadora de tradução Jane Elizabeth Kraus. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2001.

RICHTER, H.G; DALLWITZ, M.J. **Commercial timbers: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval**. In English, French, German, Portuguese, and Spanish. 25ª Ed. 2009. Disponível em:<<http://delta-intkey.com>>. Acesso em: 15 Out. 2016.

SALISBURY, F. B; ROSS, C. W. **Plant Physiology**. 4. ed. Belmont, California: Wadsworth Publishing Company, 1991.

SANTANA NETA, L. G. **CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE BIOATIVOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTES DE *Genipa americana* L DESIDRATADO**. 2014. 77f. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – Faculdade de Farmácia/ Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2014.

SANTOS, F. B dos. **Atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcoólicos dos frutos do cerrado *Genipa americana* L., *Dipteryx alata* Vog. e *Vitex cymosa* Bert**. Dissertação (Mestrado em saúde e desenvolvimento) - Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande- MS, 2015.

SOUZA, V. C; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação de famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III**. 3. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2012.

VELÁSQUEZ, C. L; RIVAS, ANDREA; OCANTO, I. S. Obtención de Genipina a partir de frutos de caruto (*Genipa americana* L.) del llano venezolano. Avances en Química, v. 9, n. 2, p. 75-86, 2014.