



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE
SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS
GENÉTICOS VEGETAIS**



EVELYN SOPHIA SILVA COSTA

INDUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CALOS DE
Amburana cearensis (Allen.) A.C E *Poincianella*
pyramidalis (Tul.) L.P. Queiroz

EVELYN SOPHIA SILVA COSTA

INDUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CALOS DE

Amburana cearensis (Allen.) A.C E *Poincianella
pyramidalis* (Tul.) L.P. Queiroz

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, da Universidade Estadual de Feira de Santana, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof. Dr. Jose Raniere Ferreira de Santana (UEFS).
Coorientadora: Dra. Ana Valéria vieira de Souza (EMBRAPA).

Feira de Santana – BA
2018

BANCA EXAMINADORA

Júnia Nascimento Costa Vasconcelos
Profa. Dra. Jéssica Nascimento Costa Vasconcelos
(Faculdade Regional de Alagoinhas - UNIRB)

Maria Maiany de Oliveira
Profa. Dra. Maria Maiany de Oliveira
(Secretaria de Educação - PE)

José Raniere F. de Santana
Prof. Dr. José Raniere Ferreira de Santana
(Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS)
Orientador e Presidente da Banca

Ficha Catalográfica - Biblioteca Central Julieta Carteado - UEFS

C871i Costa, Evelyn Sophia Silva

Indução e caracterização de calos de *Amburana cearensis* (Allen.) A.C E
Poincianella pyramidalis (Tul.) L.P. Queiroz / Evelyn Sophia Silva Costa. -
2018.

47 f.: il.

Orientador: José Raniere Ferreira de Santana.

Coorientadora: Ana Valéria Vieira de Souza.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Feira de
Santana, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais,
2018.

1. *Amburana cearensis* (Allen.). 2. *Poincianelle Pyramidali*. 3. Cumaru.
4. Catingueira. I. Santana, José Raniere Ferreira de, orient. II. Souza, Ana
Valéria Vieira de, coorient. III. Universidade Estadual de Feira de Santana.
IV. Título.

CDU: 582.736.3

Dedico este trabalho, Aos meus pais, Joselma e José Carlos meus heróis, meu noivo Rodrigo e toda a minha família pelo amor, dedicação, ensinamentos, pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida e por me fazer acreditar que tudo é possível, basta perseguir os sonhos. Amo vocês!!!

Dedico.

AGRADECIMENTO

A Deus por iluminar meu caminho e me dar forças para seguir sempre em frente.

Aos meus pais e irmãos pela educação base para minha vida, incentivo e apoio nos meus estudos.

Ao meu noivo Rodrigo Lucio, pessoa incrível, amável, compreensivo e dedicado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Raniere Ferreira de Santana por sua dedicação, paciência e apoio ao longo desta jornada.

A Dra. Ana Valéria Vieira de Souza, pelos ensinamentos durante os meus primeiros passos na vida acadêmica, um exemplo como pessoa e pesquisadora.

Aos meus amigos por seu apoio, incentivo, companheirismo e paciência que sempre me incentivaram e estavam presentes nos momentos mais difíceis dessa jornada.

Aos funcionários e docentes do programa de pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), que contribuíram para o meu crescimento e me deram apoio.

A Embrapa Semiárido por ter concedido o Campo Experimental para desenvolvimento dos trabalhos e por ter despertando em mim o interesse e o amor pela carreira científica.

A CAPES pelo apoio financeiro.

A todos os meus amigos que cultivei no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Semiárido que me acolheram e nos momentos de dúvidas souberam me ajudar, a técnica do laboratório Ângela K. N. dos Santos pela contribuição e ajuda.

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para esta dissertação tornar-se realidade, o meu MUITO OBRIGADO.

“ Deus não vai evitar que anoiteça,

Mas sempre trará o luar...”

Autor: desconhecido

RESUMO

Objetivou-se com este trabalho estabelecer um protocolo para a indução e iniciação da embriogênese somática de *Amburana cearensis* (amburana) e *Poincianella Pyramidali* (catingueira), estabelecendo o tempo adequado para a repicagem dos calos e caracterizá-los quanto aos aspectos morfológicos, além de realizar a análise fitoquímica da catingueira. Para a indução de calos foram utilizados como explantes segmentos foliares de amburana e para a espécie catingueira, segmentos cotiledonares, todos com cerca de 1,0 cm² provenientes de plantas previamente germinadas *in vitro*. Para a amburana os explantes foram cultivados em meio WPM suplementados com diferentes concentrações de 2,4-D ou picloram (0,0; 5,0; 10,0; 20,0 e 40,0 µM), já para a catingueira os explantes foram cultivados em meio MS/2 suplementados com diferentes associações de picloram (0,0; 2,5; 5,0; 10,0 e 20,0 µM) x BAP (0,0; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0 µM). Após 30 dias de cultivo *in vitro*, avaliou-se a porcentagem de calos formados, a curva de crescimento de ambas as espécies foi determinada através do peso fresco (g) dos calos. A triagem fitoquímica foram realizados para estabelecer o perfil fitoquímico dos extratos de catingueira cultivados em diferentes ambientes. A análise de regressão apresentou resposta quadrática para a produção de calos para ambas as espécies. Após 30 dias a melhor produção de calos para a espécie amburana foi observado na concentração de 23,83 µM de 2,4-D com 84,71% de calos formados, já para a espécie catingueira a maior produção foi observado na presença de 19,53 µM de picloram + 10 µM de BAP com 98,68% de calos formados. Os calos apresentaram crescimento sigmoidal e características friáveis para ambas as espécies. Foi possível identificar pela análise fitoquímica a presença de apigenina. Calos com características friáveis, assim como, a presença do composto apigenina nos calos de catingueira sugere trabalhos futuros para a produção *in vitro* dessas espécies e a exploração desse compostos através de técnicas biotecnológicas.

Palavras-chave: cumaru, catingueira, calogênese, Anatomia vegetal, metabolitos secundários.

ABSTRACT

(INDUCTION AND CHARACTERIZATION OF CALLUSES OF
Amburana cearensis (Allen.) A.C E *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L.P.Queiroz)

The objective of this work was to establish a protocol for the induction and initiation of somatic embryogenesis of *Amburana cearensis* (amburana) and *Poincianella Pyramidali* (catingueira), establishing adequate time for callus replication and characterizing them as morphological aspects, besides performing the analysis phytochemistry of the catingueira. For the callus induction, leaf segments of amburana and cotyledonary segments for the catingueira were used as explants, all with about 1.0 cm² of plants previously germinated in vitro. For amburana, explants were cultured in WPM medium supplemented with different concentrations of 2,4-D or picloram (0.0, 5.0, 10.0, 20.0 and 40.0 µM). for the catingueira, explants were cultured in MS / 2 medium supplemented with different associations of picloram (0.0, 2.5, 5.0, 10.0 and 20.0 µM) x BAP (0.05, 1.0 , 5.0, 10.0 µM). After 30 days of in vitro culture, the percentage of calli formed was evaluated, the growth curve of both species was determined by the fresh weight (g) of the calli. Phytochemical screening was performed to establish the phytochemical profile of catingueira extracts grown in different environments. The regression analysis showed a quadratic response for callus production for both species. After 30 days the best callus production for the amburana species was observed in the concentration of 23.83 µM of 2,4-D with 84,71% of callus formed. For the catingueira species the highest production was observed in the presence of 19,53 µM picloram + 10 µM BAP with 98.68% callus formation. Callus with friable characteristics, as well as the presence of the apigenin compound in catingueira callus suggests future work for the in vitro production of these species and the exploitation of these compounds through biotechnological techniques.

Key words: cumaru, catingueira, calogenesis, plant anatomy, secondary metabolites.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	10
CAPÍTULO 1 – Indução, caracterização e curva de crescimento de calos derivados de explantes foliares de <i>Amburana cearensis</i> (Allen.) A. C. Smith	
1.1 Introdução	20
1.2 Material e Métodos	21
1.3 Resultados e Discussão	22
1.4 Conclusão	29
1.5 REFERÊNCIAS	30
CAPÍTULO 2 – Indução, caracterização fitoquímica e morfo-anatômica de calos de <i>Poincianella pyramidalis</i> (Tul.) L.P.Queiroz	
2.1 Introdução	34
2.2 Material e Métodos	35
2.3 Resultados e Discussão	37
2.4 Conclusão	44
2.5 REFERÊNCIAS	45
CONCLUSÃO GERAL	48

INTRODUÇÃO GERAL

A família Fabaceae inclui cerca de 19.325 espécies, que se encontram distribuídas em 727 gêneros, sendo classificada como a terceira maior família de plantas no mundo e uma das famílias botânicas de maior importância econômica. No Brasil consiste como a mais representativa da Caatinga, por ser constituída por 120 gêneros e 603 espécies, com aproximadamente, 140 endêmicas e distribuídas entre suas três subfamílias Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoidea. A importância da família Fabaceae não está apenas associada ao grande número, distribuição e formas vegetais de suas espécies, mas também à sua importância econômica atribuído aos usos medicinais, ornamentais, madeireiros, alimentícios, entre outros (ANDRADE, 2008; QUEIROZ, 2009).

A subfamília Papilionoideae se destaca como a maior, tanto para fins econômicos como em número de espécies, com 478 gêneros e 13.800 espécies, seguida pela Mimosoideae com 78 gêneros e 3.270 espécies e Caesalpinioideae com 171 gêneros e 2.250 espécies. As espécies representantes são constituídas por ervas anuais ou perenes, eretas, prostradas, difusas, trepadeiras, lianas, subarbustos, arbustos e árvores de pequeno, médio ou grande porte (ANDRADE, 2008; LEWIS et al., 2005).

Dentre os gêneros que compõem as subfamílias Papilionoideae e a Caesalpinioideae, destacam-se *Amburana* Schwacke & Taub constituída pelas espécies, *A. acreana* Ducke e *A. cearensis* A.C. Sm., e o *Poincianella*.

A espécie *Amburana cearensis* A.S. Smith (subfamília: Faboideae) é uma árvore frondosa, típica da Caatinga nordestina, conhecida popularmente como amburana, amburana-de-cheiro, cerejeira, cerejeira-rajada, cumaru-do-ceará, cumaré, cumarú, cumarú-das-caatingas, cumarúde-cheiro, imburana, imburana-de-cheiro, umburana (MAIA, 2012). Embora nativa do sertão brasileiro, esta espécie pode ser encontrada em praticamente toda América do Sul (do Peru à Argentina). A árvore pode atingir até 20 m de altura e 50 cm de diâmetro, caracterizando-se por possuir flores rosas, vagem achatada e escura, além da casca aromática com odor peculiar de cumarina. Suas sementes são escuras, aladas (Figura 1), e exalam também um forte cheiro de cumarina, cujo aroma é semelhante ao de baunilha (SANTOS et al., 2009).

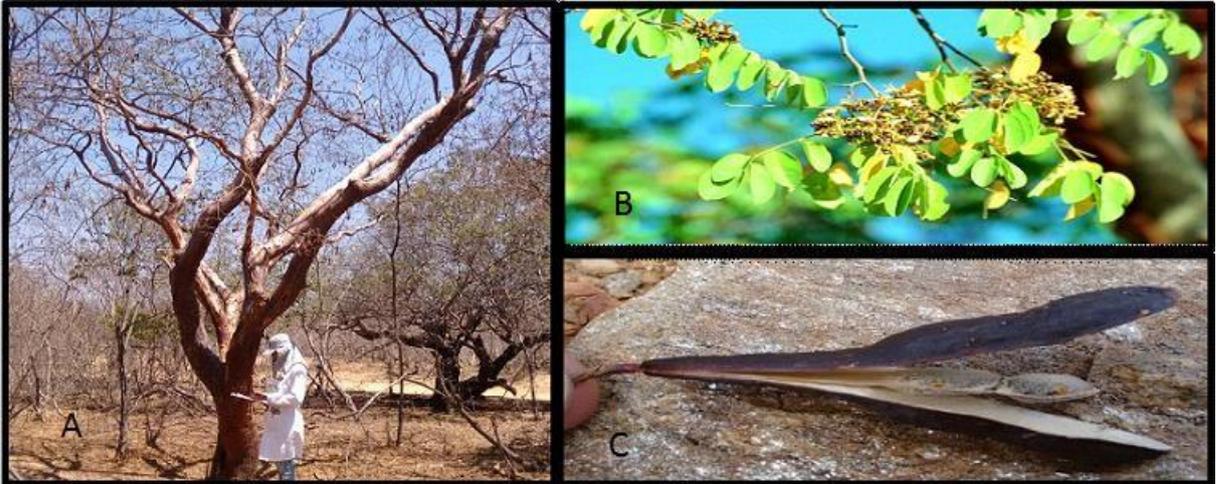


Figura 1. Exemplar de *Amburana cearensis* (A), coleta realizada em Jutai, Lagoa Grande – PE. Aspectos de ramos com folhas (B), vagens e sementes(C). Fonte: Autora (2018).

Do ponto-de-vista econômico, *A. cearensis* apresenta valiosa importância comercial dada às suas várias aplicações. Sua madeira é utilizada na fabricação de móveis, portas, janelas e caixotaria devido à sua reconhecida durabilidade. As sementes são utilizadas como aromatizante e repelente de insetos para roupas e estantes (MAIA, 2012). Do ponto de vista medicinal, as cascas e sementes são utilizadas, com frequência, por meio de chás, no tratamento de asma, bronquites, gripes e resfriados. O decocto da casca também é usado para tratar dores reumáticas (CANUTO et al., 2010). Industrialmente, a forma farmacêutica disponível é o xarope de cumaru, o qual é produzido pelo Programa Farmácias Vivas, Farmácia-Escola/UFC e por laboratórios farmacêuticos privados como o Selachii e Bionatus (CANUTO et al., 2008).

A eficácia do uso popular de *A. cearensis* é assegurada por estudos farmacológicos feitos a partir do extrato hidroalcoólico da casca do caule e de alguns de seus constituintes químicos, os quais demonstraram atividades analgésica, broncodilatadora e anti-inflamatória (AGRA et al., 2007). A casca do caule é basicamente constituída de cumarina, responsável pelo seu odor peculiar, flavonóides, glicosídeos fenólicos (amburosídeos) ácidos fenólicos (ex.: vanílico e protocatecuico), além de quantidades abundantes de sacarose (CANUTO e SILVEIRA, 2006). Pesquisas realizadas revelaram que a cumarina, o isocampferídio e o amburosídeo possuem efeitos anti-inflamatório, antioxidante e broncodilatador, sendo indicados como princípios ativos da planta (LEAL et al., 2009). Para CANUTO et al., (2010), as análises fitoquímicas já registradas, representam um avanço importante no conhecimento científico sobre a espécie, visto sua eficácia terapêutica.

Por outro lado, a crescente demanda na exploração econômica de *A. cearensis*, causada pelo seu uso madeireiro e medicinal, tem provocado uma séria ameaça à sua sobrevivência,

visto que segundo a União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais esta espécie sofre risco de extinção (IUCN, 2014).

Poincianella pyramidalis (Tul.) L.P. Queiroz (Subfamília Caesalpinaceae) é uma espécie nativa da Caatinga, com ampla dispersão, distribuição e representatividade significativa no semiárido nordestino. É conhecida popularmente como catingueira e catinga-de-porco e ocorre nos estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia. Pode atingir acima de 10m de altura e diâmetro de até 50 cm nas várzeas úmidas ou no Semiárido (MAIA, 2012; GOMES-COPELAND et al., 2017) (Figura 2).



Figura 2: Exemplar de *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L.P. Queiroz (A), Aspectos de ramos com folhas, flores e vagens (B). **Fonte:** <http://nordesterural.com.br/alimentar-os-rebanhos-caprinos-e-ovinos-com-feno-de-catingueira>.

Caracteriza-se por possuir flores amarelas e folhas compostas. Os frutos são vagens achatadas de cor escura, com ápice pontiagudo e deiscente (OLIVEIRA et al., 2016). As sementes são achatadas, ovaladas, lustrosas, de cor castanho-claro e ocorrem em número 5 a 7 sementes por vagem (MAIA, 2012). De acordo com esses autores a casca dessa espécie possui tonalidade entre cinza-claro e castanho na planta madura, o cerne do tronco muitas vezes apodrece deixando a planta oca servindo de abrigo para insetos e animais pequenos.

A catingueira apresenta grande potencial econômico devido ao uso madeireiro, na fabricação de carvão e lenha e uso forrageiro, uma vez que suas folhas jovens servem de alimento para os animais (SILVA et al., 2013). Estudos revelaram que suas folhas, flores e

cascas são ricas em taninos totais e compostos fenólicos totais, especialmente, biflavonoides bioativos, flavonóides, além do ácido gálico, o que proporciona elevada atividade antioxidante da espécie e reforça o uso no tratamento das infecções catarrais, diarreias e disenterias (OLIVEIRA et al., 2016). Resultados publicados de pesquisas realizadas com esta espécie, reportaram que o extrato etanólico tem sido usado contra linhagens resistentes de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, bem como o extrato apresentou atividades de moluscicidas, antimicrobianos, antiinflamatórios e antinociceptivos (LIMA et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2016).

Tanto a catingueira quanto a amburana, são espécies amplamente utilizadas pela população do Semiárido, devido à multiplicidade de potenciais de uso. Contudo, não existe um programa local voltado à produção de mudas para distribuição ou recomposição de populações naturais na Caatinga. As duas espécies tem sido exploradas de maneira extrativista e são fortes representantes da pressão antrópica existente neste bioma. Cascas e plantas adultas são alvos da coleta indiscriminada e sementes de *A. cearensis* são coletadas para comercialização em feiras livres. Apesar de não apresentarem complexidade quanto à propagação sexuada, a cada ano aumenta a dificuldade para encontrar sementes nas populações naturais. Atualmente não é possível observar plantas jovens dessa espécie nas populações naturais. Além da coleta extrativista predatória, os animais também se alimentam das sementes e, em alguns locais já é possível observar plantas centenárias mortas, devido à condição de escassez de chuva e seca que atingiu o semiárido nos últimos anos.

Nesse sentido e, principalmente, considerando a importância dessas duas espécies para a população nordestina, nota-se a urgência para o estabelecimento de programas de pesquisas com enfoque na produção de mudas. Técnicas biotecnológicas como a cultura de tecidos vegetais pode ser grande aliada nesse contexto, uma vez que possibilita a produção de plantas em larga escala de maneira rápida e eficaz, a obtenção de material isento de patógenos e viabiliza a conservação de importantes genótipos (GEORGE, 2008). A multiplicação de plantas pode representar uma alternativa a fim de minimizar os impactos causados pela exploração antrópica e extrativista. Essa vantagem pode ser relevante em situações especiais como vale destacar para *A. cearenses* e a *P. pyramidallis*.

Dentre as técnicas da cultura de tecidos vegetais, destaca-se a micropropagação, que baseia-se no princípio da totipotência das células e se dá via organogênese ou embriogênese

somática. Ambos os processos podem ocorrer de forma direta, quando o desenvolvimento é a partir de células diferenciadas do tecido vegetal sem passar pelo estágio de calos (conjunto de células aglomeradas), ou indireta quando há prévia formação de calos, os quais sofrem sucessivas diferenciações seguindo a mesma sequência do desenvolvimento zigótico. A via indireta é a mais comum nesse processo (LEMOS, 2010).

A embriogênese somática é o processo pelo qual células somáticas desenvolvem estruturas semelhantes a embriões zigóticos, por meio de uma sequência ordenada de estádios embriogênicos característicos, sem ocorrência de fusão dos gametas (ZIMMERMAN, 2014). Durante o desenvolvimento, os embriões somáticos passam por estádios similares àqueles observados na embriogênese zigótica (globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar), caracterizando-se como estruturas bipolares sem nenhuma conexão vascular com o tecido matriz. Essas características aliadas à bipolaridade diferem os embriões somáticos dos propágulos resultante dos processos organogênese (GUERRA et al., 1998; ZIMMERMAN, 2010).

No entanto, o bom desempenho da resposta morfogênica depende dos fatores endógenos como o tipo de explante, a idade do material cultivado *in vitro* e dos fatores exógenos, relacionados às condições de cultivo, além da composição do meio de cultura. Os processos que estão associados ao material cultivado baseiam-se na totipotencialidade celular, que consiste na capacidade das células vegetais regenerarem um indivíduo completo. Essa mesma competência pode não está inata ou existente no momento em que o explante foi retirado da planta matriz, mas pode ser induzida *in vitro* a depender do meio de cultura e reguladores vegetais utilizados, além das condições ambientais (LEMOS, 2010). Uma vez induzido essa competência essas células irão seguir uma rota morfogênica específica, estando determinadas.

Quanto ao fator exógeno, para que o sucesso do cultivo *in vitro* seja alcançado, é necessário que o meio nutritivo seja apropriado as necessidades do explante (GUEYE et al., 2009), fornecendo substâncias essenciais para o desenvolvimento do material *in vitro*. A sacarose atua como fonte de energia, regulador osmótico ou como fonte de esqueletos carbônicos para os vários processos biossintéticos implicados na diferenciação e crescimento de suas células (THORPE, 2008). Já os reguladores vegetais (hormônios vegetais sintéticos), têm como função inibir ou estimular processos bioquímicos e/ou fisiológicos vitais, exercendo essa função por meio de reconhecimento de receptores específicos, presentes nas células (CARNEIRO et al., 2014).

A concentração e composição dos reguladores vegetais é um fator determinante na morfogênese *in vitro* e as citocininas e auxinas são os reguladores mais utilizados. A adição dos reguladores vegetais ao meio de cultura dependerá dos objetivos do cultivo e possíveis necessidades *in vitro*, em que precisará ser otimizada e adaptada a depender da espécie a ser estudada. As citocininas são utilizadas na multiplicação e desenvolvimento de brotações múltiplas, responsável pelo processo de divisão celular e quebra de dominância apical (NAVROSKI et al., 2012).

As auxinas são frequentemente usadas quando o propósito for o alongamento celular, expansão dos tecidos e divisão celular na indução de calos a partir de um explante e na formação de raiz (CID e TEIXEIRA, 2014). As auxinas mais utilizadas são o ANA (ácido naftaleacético), AIA (ácido indolacético), AIB (ácido indolbutírico) 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e o picloram, sendo esses dois últimos junto ao TDZ (tidiazuron) são os mais recomendados no processo de indução de embriogênese somática (ARNOLD, 2008).

Outras substâncias são fundamentais também para o sucesso da embriogênese somática como é o caso das vitaminas. Na planta a produção das vitaminas são diferentes nos órgãos e, por isso se dá a necessidade da adição dessa substância ao meio de cultura para se nutrir o explante, tem-se também o carvão ativo e o PVP (polivinilpirrolidona), utilizados para prevenir a oxidação fenólica (CID e TEIXEIRA, 2014).

Considerando o potencial de exploração econômica das duas espécies em estudo, a significativa pressão antrópica e o risco de erosão genética a que estão submetidas, objetivou-se com este trabalho estabelecer a iniciação da indução da embriogênese somática para posterior obtenção de plantas *in vitro* de *A. cearensis* e *P. pyramidalis*, assim como verificar o perfil fitoquímico da espécie *P. pyramidalis* em diferentes condições de cultivo.

REFERÊNCIAS

- AGRA, M. F.; BARACHO, G.S.; NURIT K.; BASÍLIO, I. J.; COELHO, V. P. Medicina and posisonous diversity of the flora of “Cariri Paraibano”. **Journal of Ethnopharmacology**, Brasil. v. 111, p. 383-395, 2007.
- ANDRADE, A. L. P. A. **Subfamilia Faboideae (Fabaceae Lindl.) no Parque Estadual do Guartelá, Município de Tibagi, Estado do Paraná**. 2008 Dissertação (Mestrado em Ciências Biológica). Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR.
- ARNOLD, S. Somatic Embryogenesis. In: GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; KLERK, G-J. **Plant Propagation by Tissue Culture**. 3ed. Dordrecht: Springer, 2008. p. 335-354.
- CANUTO, K. M.; SILVEIRA, E. R.; BEZERRA, A. M. E.; LEAL, L. K. A. M.; VIANA, G. D. B. Uso de plantas jovens de *Amburana cearensis* AC Smith: alternativa para preservação e exploração econômica da espécie. **Embrapa Semiárido-Documentos (Infoteca-e)**, 2008.
- CANUTO, K. M.; SILVEIRA, E. R. Constituintes químicos da casca do caule de *Amburana cearensis* AC Smith. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 12-41, 2006.
- CANUTO, K. M.; SILVEIRA, E. R.; BEZERRA, A. M. E. Estudo fitoquímico de espécimens cultivados de cumaru (*Amburana cearensis* AC Smith). **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 662-666, 2010.
- CARNEIRO F.S.; OLIVEIRA, S.R.; QUEIROZ, D.; PASSOS, A.R.; NASCIMENTO, M.N.; SANTOS, K.S. Embriogênese somática em *Agave sisalana* Perrine: indução, caracterização anatômica e regeneração. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 44, n. 3, 2014.
- CID, L. P. B.; TEXEIRA, J. B. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. In: CID, L. P. B. **Cultivo in vitro de plantas**. 3ed. Brasília: Embapa, 2014. p. 17 – 51.
- GEORGE, Edwin F.; HALL, Michael A.; DE KLERK, Geert-Jan. Plant tissue culture procedure-background. In: **Plant propagation by tissue culture**. 3ed. Dordrecht: Springer, 2008. p. 1-28.
- GOMES-COPELAND, LEDO, A. S.; DAVID, J. P.; ARAÚJO, A. G.; ALMEIDA, F. T. C. *In vitro* callogenesis of *Poincianella pyramidalis* (catingueira). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 4, p. 525-528, 2017.
- GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Org). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa- CNPH, 1998. v.2. p.533-568.
- GUEYE, B.; SAÏD-AHMED, H.; MORCILLO, F.; BORGEL, A.; SANÉ, D.; HILBERT, J. L.; BLERVACQ, A. S. Callogenesis and rhizogenesis in date palm leaf segments: are there similarities between the two auxin-induced pathways. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 98, n. 1, p. 47-58, 2009.
- IUCN – Internacional Union for Conservação of Nature. **The IUCN Red List of threatened species**. 2014. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org>. Acesso em 07/08/17.
- LEAL, L. K. A. M.; CANUTO, K. M.; DA SILVA COSTA, K. C.; NOBRE_JÚNIOR, H. V.; VASCONCELOS, S. M.; SILVEIRA, E. R.; DE BARROS VIANA, G. S. Effects of amburoside A and isokaempferide, polyphenols from *Amburana cearensis*, on rodent inflammatory processes and myeloperoxidase activity in human neutrophils. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 104, n. 3, p. 198-205, 2009.

- LEMOS, E.E.P. Organogênese. In: CID, L.P.B. (Org.). **Cultivo in vitro de plantas**. Brasília, EMBRAPA. 2010 p.103-127.
- LEWIS G.; SCHRIRE B.; MACKINDER B., LOCK M. (Org) **Legumes of the world** , Kew: Royal Botanic Gardenspg. 2005. 577p.
- LIMA, J.L.S.; FURTADO, D. A.; PEREIRA, J.P.G.; BARACUHY, J.G.V.; XAVIER, H. S. Plantas medicinais de uso comum no Nordeste do Brasil. **Campina Grande**, v. 35, 81p. 2006.
- MAIA, G. N. **Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades**. Ed. Fortaleza: Printcolor Gráfica e Editora, 2ed. 2012. p.173-182; 159-166.
- NAVROSKI, M. C.; WALDOW. D.A.G.; PEREIRA, M.O.; PEREIRA, A.O. Calogênese *in vitro* de segmentos apicais caulinares e internodais em segurelha (*Satureja hortensis* L.). **Revista Agro@biente on-line**, [S.l.], v. 6, n. 3, p. 228-234, dec. 2012.
- OLIVEIRA, J. C. S.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Biflavonoids from the bark roots of *Poincianella pyramidalis* (Fabaceae). **Phytochemistry Letters**, v. 16, p. 18-22, 2016.
- QUEIROZ, L. P. **Leguminosas da caatinga**. Feira de Santana. Universidade Estadual de Feira de Santana. Kew: Botanic Gardens, 2009.
- SANTOS, A. P. B.; NASCIMENTO, M. F. S.; SANTOS, F. S. E. **Guia de campo de árvores**. Petrolina - PE, v.1, 64p, 2009.
- SILVA, T. S.; NEPOMUCENO, C. F.; BORGES, B. P. S.; ALVIM, B. F. M.; SANTANA, J. R. F. Multiplicação *in vitro* de *Caesalpinia pyramidalis* (Leguminosae). **Sitientibus série Ciências Biológicas**, v. 13, p. 1-6, 2013.
- THORPE, T.; STASOLLA, C.; YEUNG, E.C.; KLERK, G-J.; ROBERTS, A.; GEORGE, E.F. The Components of Plant Tissue Culture Media II: Organic Additions, Osmotic and pH Effects, and Support Systems. In: GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; KLERK, G-J (Org). **Plant Propagation by Tissue Culture**. 3ed. Dordrecht: Springer, 2008. P.205-226.
- ZIMMERMAN, M. J. Embriogênese somática. In: CID, L. P. B. (Org). **Cultivo in vitro de plantas**. Brasília, EMBRAPA. 2010. p. 66-102.
- ZIMMERMAN, M. J. Embriogênese somática. In: CID, L. P. B. (Org). **Cultivo in vitro de plantas**. 3ed. Brasília, EMBRAPA. 2014. p. 69-103.

Indução, caracterização e curva de crescimento de calos derivados de explantes foliares de *Amburana cearensis* (Allen.) A. C. Smith

RESUMO

Amburana-de-cheiro [*Amburana cearensis* (Allen.) AC Smith (Fabaceae)] é uma espécie arbórea nativa da Caatinga, que apresenta grande valor econômico principalmente devido às propriedades farmacêuticas, possuindo atividade anti-inflamatória, antimicrobiana, anticoagulante, vasodilatadora, espasmolítica e antitrombótica. No entanto, a crescente demanda na sua exploração econômica, têm provado perdas significativas e ameaça a sua sobrevivência, uma vez que impossibilita a sua propagação natural e reduz o número de suas populações naturais. Sendo assim, é significativa a importância de se estabelecer pesquisas com alternativas para a sua produção de mudas em larga escala. O objetivo do trabalho foi induzir calos a partir de segmentos foliares de amburana, estabelecendo o tempo adequado para repicagem e caracteriza-los quanto os aspectos morfológicos. Após os ajustes da curva quadrática, os melhores percentuais de calogênese foram obtidos na concentração de 23,83 μM de 2,4-D com 84,71% de calos formados, apresentando crescimento sigmoide e estruturas com características globulares e friáveis. A produção de calos com características friáveis, sugere a possibilidade da realização de trabalhos futuros visando a produção de plantas *in vitro* através das vias morfogênicas como a organogênese e/ou embriogênese.

Palavras-chave: cumaru, medicinal plants, Caatinga, calogenesis

ABSTRACT

(Induction, characterization and growth curve of callus derived from leaf explants of *Amburana cearensis* (Allen.) A. C. Smith)

Amburana cearensis (Allen.) AC Smith (Fabaceae)] is an arboreal species native to the Caatinga, which presents great economic value mainly due to the pharmaceutical properties, possessing anti-inflammatory, antimicrobial, anticoagulant, vasodilator, spasmolytic activity and antithrombotic. However, the increasing demand in their economic exploitation, have proven significant losses and threat to their survival, since it prevents their natural propagation and reduces the number of their natural populations. Thus, the importance of establishing research with alternatives for large-scale seedling production is significant. The objective of the work was to induce callus from leaf segments of *amburana cearensis* (*amburana*), establishing adequate time for replication and characterizing them as morphological aspects. After the adjustments of the quadratic curve, the best percentages of calogenesis were obtained in the concentration of 23.83 μM of 2,4-D with 84,71% of callus formation, showing sigmoidal growth and structures with globular and friable characteristics. The production of calli with friable characteristics suggests the possibility of carrying out future works aiming at the production of plants in vitro through the morphogenic pathways such as organogenesis and / or embryogenesis.

Key words: cumaru, medicinal plants, Caatinga, calogenesis

INTRODUÇÃO

Amburana cearensis (Allen.) A. C. Smith (Fabaceae) é uma planta arbórea, nativa da Caatinga, onde é conhecida por vários nomes como amburana, imburana, cumuru, amburana-de-cheiro, entre outros. Apresenta relevante potencial fitoterápico por apresentar atividade antiinflamatório, antimicrobiana, anticoagulante, vasodilatadora, espasmolítica e antitrombótica. No Estado do Ceará já é utilizada para a produção industrial do fitoterápico “xarope de cumaru” destinado ao tratamento de afecções pulmonares, asma, bronquite, coqueluche e tosses (ALMEIDA et al., 2010; CANUTO et al., 2010).

Suas cascas e sementes são basicamente constituídas de cumarina, responsável pelo seu odor peculiar, flavonóides, glicosídeos fenólicos (amburosídeos) ácidos fenólicos (ex.: vanílico e protocatecuico), além de quantidades abundantes de sacarose (CANUTO E SILVEIRA, 2006). Estudos anteriores sobre essa espécie evidenciaram a eficácia do seu uso popular por meio de estudos farmacológicos feitos a partir do extrato hidroalcoólico da casca do caule e de alguns de seus constituintes químicos, os quais demonstraram atividades analgésica, broncodilatadora e anti-inflamatória (AGRA ET AL., 2007).

Essa espécie se propaga através de semente, porém a coleta extrativista desse propágulo nas populações naturais e a comercialização em feiras livres nos diversos municípios do Semiárido tem acarretado na diminuição e perdas significativas de exemplares adultos na Caatinga e ameaça a sua sobrevivência (CANUTO ET AL., 2010). A significância desse aspecto demonstra a importância de se estabelecer pesquisas com alternativas para a sua propagação em larga escala.

Dentro da biotecnologia, técnicas como a cultura de células e tecidos vegetais tem se mostrado promissora na resolução de questões desta natureza, ou seja, propagação de espécies nativas com importância econômica relevante e passíveis de extinção. Estudos sobre micropropagação realizados por CAMPOS et al., (2013), buscaram avaliar a influência de citocininas na multiplicação via organogênese direta *in vitro* de diferentes explantes de *A. cearensis*, Contudo, os resultados foram insatisfatórios nesse sentido e evidenciaram a necessidade da busca por outras técnicas que possam viabilizar a produção de mudas em larga escala.

Nesse contexto, a técnica da cultura de células pode representar uma alternativa interessante, uma vez que o explante é submetido a sucessivas desdiferenciações celulares,

caracterizada pela fase de indução de calos (aglomerado de células) e na etapa final do processo, viabilizar a produção de mudas *in vitro*. O uso de meios de cultivo apropriados e suplementados com reguladores vegetais do tipo auxinas, podem favorecer a multiplicação via organogênese indireta, através de diferentes divisões celulares, as quais conduzem a formação de novas plantas em larga escala. As auxinas 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e o picloram são consideradas mais potentes para a indução de calos, devido o seu efeito na indução da divisão celular (CARNEIRO et al., 2014), quando comparadas ao ácido naftalenoacético (ANA) e o 3indolacético (AIA).

Sendo assim, objetivou-se com esta pesquisa estabelecer a indução de calos *in vitro* em explantes de *A. cearensis* visando desenvolver um futuro protocolo de micropropagação via embriogênese e/ou organogênese indireta, uma vez que pesquisas anteriores mostraram a dificuldade para a propagação *in vitro* da espécie por meio da organogênese direta.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Semiárido e as sementes de *Amburana cearenses*, utilizadas para o estabelecimento das espécies *in vitro*, foram obtidas no Laboratório de Sementes da mesma instituição.

Indução de calogênese

Os calos foram induzidos a partir de segmentos foliares obtidos de plantas estabelecidas *in vitro*, após 45 dias de cultivo, baseado pela metodologia de Campos et al., (2013). Os explantes foram colocados em potes plásticos de polietileno autoclaváveis contendo 40 mL de meio de cultura WPM (Wood Plant Medium, elaborado por LLOYD; McCOWN, 1980), suplementado com 15 g L⁻¹ de sacarose e 4 g L⁻¹ de ágar para gelificação. Foram utilizadas cinco concentrações de 2,4-D (0,0; 5,0; 10,0; 20,0; 40,0 µM) ou cinco concentrações de picloram (0,0; 5,0; 10,0; 20,0; 40,0 µM). O pH do meio de cultura foi aferido para 5,9 antes da autoclaveagem a 120 °C durante 15 minutos. Em seguida, os frascos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25±2 °C em ausência de luz.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Cada tratamento foi constituído de três repetições e quatro explantes por repetição. Após 30 dias de cultivo *in vitro*, avaliou-se a percentagem de calos formados, coloração e textura (friável ou compacto). Foi

utilizado o melhor tratamento para a indução de calogênese dentre os citados anteriormente, para realizar as análises da curva de crescimento.

Obtenção da curva de crescimento dos calos

A partir dos resultados obtidos nos experimentos anteriores, foi definido o melhor tratamento para indução de calos. A curva de crescimento dos calos foi determinada pela quantificação da matéria fresca (g) dos calos formados, a partir do dia zero (explantos no dia da inoculação), em intervalo de três dias, por um período de 28 dias. O percentual de crescimento dos calos foi estabelecido a partir do peso da matéria fresca.

Análise estatísticas

Os dados quantitativos com diferentes concentrações de auxinas, foram analisados via análise de regressão, com o Programa de Análise Estatística de Sisvar (FERREIRA, 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito do 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) na indução de calos em segmentos foliares de *Amburana cearensis*.

A análise de regressão apontou um modelo quadrático ascendente ($p < 0,05$) para o efeito das concentrações de 2,4-D na indução de calos em explantes de segmentos foliares. Aos 30 dias de cultivo *in vitro*, a formação de calos ocorreu sobre a superfície dos explantes em todos os tratamentos testados, exceto no meio ausente de reguladores vegetais, em meio de cultura WPM.

À medida que se aumentou a concentração desta auxina a partir de 5 μM , já foi possível observar a formação de calos. Este aumento ocorreu até o ponto máximo de 23,83 μM de 2,4-D com (84,71%) de calos formados, concentrações superiores a essa promoveu um decréscimo na formação de calos para este tipo de explante. Na maior concentração testada, apenas 40% dos explantes formaram calos (Figura 1).

A diminuição na indução de calos à medida que se aumentou a concentração de 2,4D, pode estar relacionado à sua efetividade. Provavelmente, a alta concentração do 2,4-D no meio de cultura promoveu menor indução de calos porque a utilização desse regulador deve ser utilizado por tempo indutivo determinado. Longos períodos de exposição, podem ocasionar a

morte dos tecidos e células devido à presença de compostos fenólicos e elevadas concentrações podem oxidar e deteriorar o material vegetal (ZIMMERMAN, 2014).

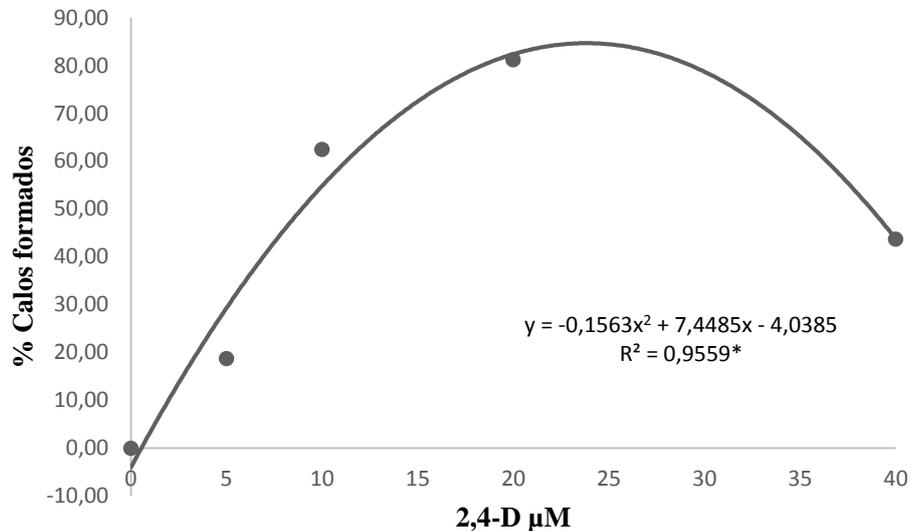


Figura 3: Porcentagem de calos formados em segmentos foliares de *A. cearensis*, submetido a diferentes concentrações de 2,4-D. *significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F. Petrolina-PE, 2018.

Os efeitos positivos induzidos pelo regulador 2,4-D na formação de calos em amburana possivelmente se deve ao fato que essa auxina é o regulador indutor da calogênese mais eficiente. Este regulador tem o papel de produzir o aumento dos níveis endógenos de auxinas e estimular o início da desdiferenciação seguido da divisão e multiplicação celular (CARNEIRO et al., 2014).

VASCONCELOS et al., (2012), relataram maior percentual de explantes responsivos (82,50%) quando folhas de aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.) foram cultivadas na concentração de 6,78 μM de 2,4-D. Já GOMES-COPELAND et al., (2017), constataram que o percentual de calos em explantes de segmentos foliar de catingueira (*P. pyramidalis*) ocorreu nas concentrações de 22,24 μM de 2,4D. Entretanto resultados contrários foram reportados por REIS et al., (2008), estudando a indução de calos de paricá (*Schizolodium parahyba* var. *amazonicum*), os tratamentos isentos de reguladores vegetais induziram maior percentual de calogênese.

A auxina 2,4-D pode ser a mais recomendada para a indução de calos, porém não existe um padrão de qual concentração é mais eficiente, uma vez que o genótipo pode influenciar diretamente o processo *in vitro*. Outros fatores como o tipo de explante utilizado, e as condições

de cultivo também influenciam no efeito dos reguladores vegetal e no sucesso do cultivo *in vitro* (INÁCIO, 2010; LEMOS et al., 2010).

Efeito do picloram na indução de calos em segmentos foliares de *Amburana cearensis*.

Ao avaliar o efeito de diferentes concentrações do picloram na indução de calos em amburana, os resultados obtidos não apresentaram diferença estatística significativa (Figura 4).

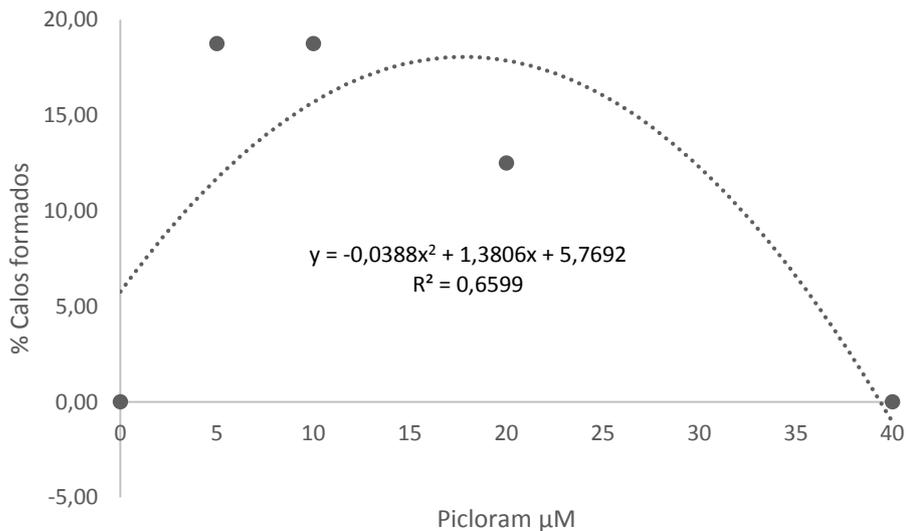


Figura 4: Porcentagem de calos formados, segmentos foliares de *A. cearensis*, submetido a diferentes concentrações de picloram. ^{NS} Não significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F. Petrolina-PE, 2018.

Assim como para o 2,4-D, na ausência do Picloram não foi possível obter calos nos segmentos foliares da amburana. Para esta auxina, o maior percentual de formação de calos na superfície do explante ocorreu na concentração de 17,79 µM (18,05%) (Figura 4). O picloram é uma auxina que tem sido utilizada para a induzir e ou manter calos e culturas em suspensão. A baixa formação de calos encontrados nesse trabalho, nas concentrações superiores a 20,0 µM, pode ser atribuído ao fato de que as concentrações desse regulador para a indução de calos são geralmente menores das concentrações necessárias de outros reguladores (BARBOZA et al., 2014).

Os resultados obtidos neste estudo comprovam a afirmação do autor supracitado, pois quando compara-se o 2,4-D e o picloram, observa-se que ocorreu maior formação de calos na primeira auxina e em concentrações maiores (Figuras 3 e 4).

MOLINA et al., (2015), estudando o efeito do picloram na indução de calos em tipa colorada (*Pterogyne nitens* Tul.), observaram que em baixas concentrações de 3,31µM e 4,14

μM foi possível obter indução de calos com 93,78% e 95,22%, respectivamente. Resultados similares foram observados no trabalho de PADILHA (2013), quando verificou que a adição de baixas concentrações da auxina picloram mostrou-se mais efetiva na indução de calos a partir de explantes foliares de bocaiúva.

Para a amburana, observou-se que os calos formados tanto na presença do 2,4-D como no picloram apresentaram no início da cultura, texturas friáveis e de tonalidade branca a bege. Entretanto, no decorrer do seu desenvolvimento ocorreu o aparecimento de calos com formatos globulares com coloração entre o bege claro ao marrom escuro (Figura 5). Essas estruturas são caracterizadas por CALDAS et al., (1998), como o primeiro estágio de diferenciação do tecido seguidos pelos estádios cordiforme, torpedo e cotiledonar. Essa mesma estrutura pode ser caracterizada tanto a presença de organogênese como embriogênese somática, podendo apenas serem comprovadas através de análises da morfologia interna (TREVIZAM, 2011).

Houve a indução de raízes após 28 dias do material cultivado no meio de cultura em todos os tratamentos, podendo ser um indicativo que o material também possui potencial organogênico (Figura 5. F). Essa interação entre os diferentes reguladores, concentrações e a totipotencialidade das células utilizadas afetam a calogênese e as rotas morfogênicas em tecidos vegetais *in vitro*. Assim, o emprego das auxinas no cultivo *in vitro* pode atuar tanto na indução de calos quanto na formação de raízes (GUEYE et al., 2009; LAVANYA et al., 2014).

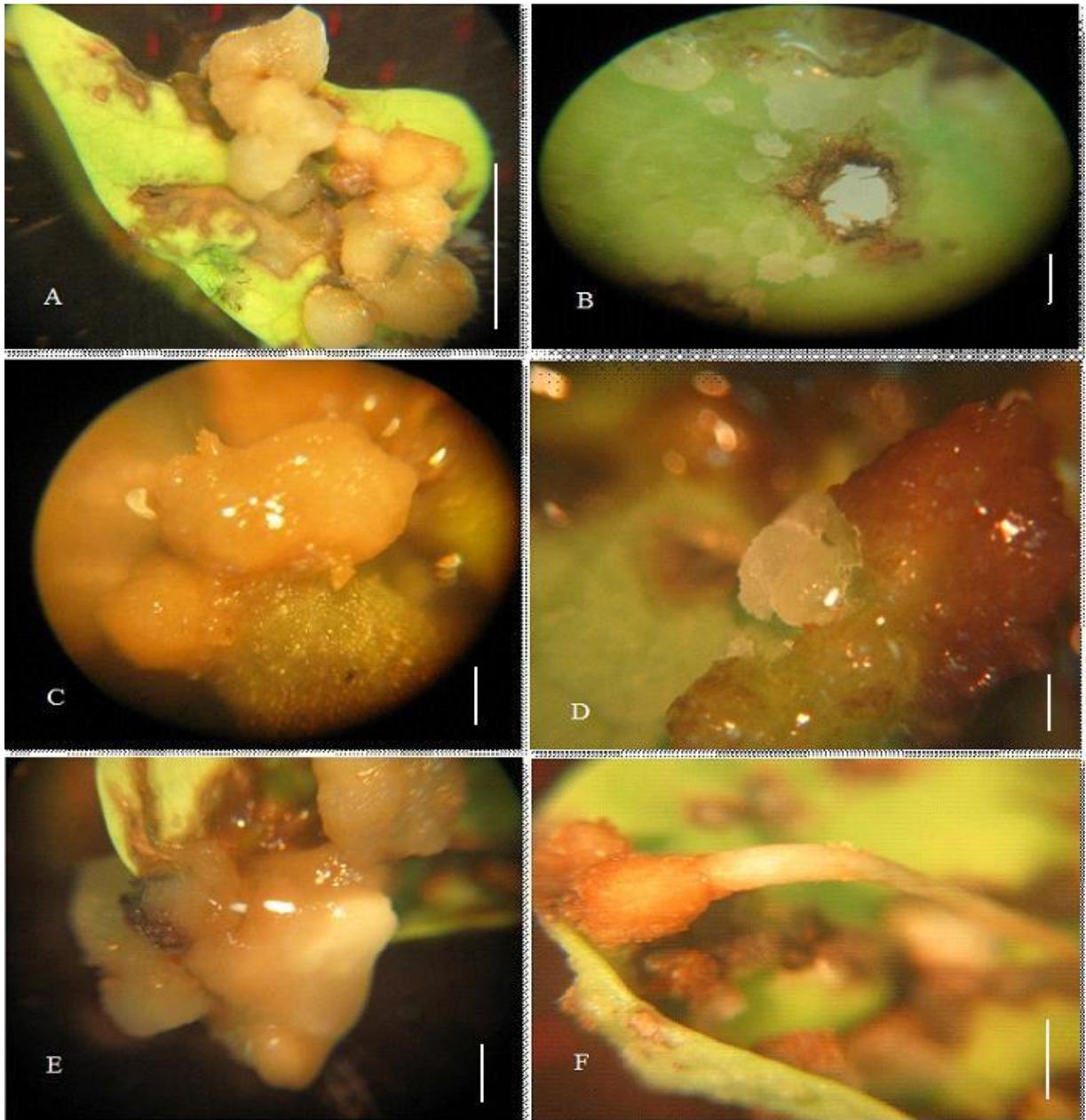


FIGURA. 5. Calos de *Amburana cearensis* em explantes foliares cultivados em meio WPM e suplementados com 20,0 μM de 2,4-D. Aspecto friáveis (A e B), aspecto globulares (C e D) e emissão de raiz (E e F); Barras: A – 1cm; (B, C, D, E e F) 1mm, EMBRAPA, Petrolina, PE, 2018.

A presença de calos com aspectos globulares foi pré-requisito para a embriogênese somática em macaúba. Com 60 dias de cultivo, na presença de 9 μM de picloram, os calos apresentaram aspectos globulares e cor amarelada. Essas estruturas se fragmentaram e eventualmente embriões somáticos se formaram a partir dessas massas embriogênicas (MOURA, 2007). Calos com estruturas globulares também foram formados durante o processo de embriogênese somática indireta de palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq.) (CORRÊA, 2014).

Estruturas globulares de calos obtidos nesse trabalho foram semelhantes ao dos obtidos em calos embriogênicos de *Byrsonima intermedia* A. Juss. (NOGUEIRA et al., 2008), os quais foram induzidos em meio de cultura MS na presença de 2,4-D, por 60 dias com três subcultivos no mesmo meio. Os calos mudaram seu aspecto de friáveis e, após dois subcultivos, ocorreu o aparecimento de estruturas globulares.

Curva de crescimento

Neste trabalho, foi observado que o crescimento dos calos segue com o padrão sigmoidal, apresentando seis fases distintas: lag, exponencial, linear, desaceleração, estacionária e decréscimo.

Para a *Amburana cearensis*, a fase lag ocorreu antes do 3º dia de inoculação, essa fase é caracterizada por não obter ganho no número de células e ocorre o início da mobilização de metabolitos e a síntese de proteínas sem qualquer divisão celular (GUERRA et al., 2007).

O crescimento exponencial iniciou-se antes do dia 5º, se estendendo até o 9º dia após a inoculação. Esse resultado permite inferir que ocorreu intensa divisão celular durante esse período, assim como grande absorção de solutos pelas células ocasionando a expansão dos tecidos. Resultados semelhantes foram reportados para murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.), em que a fase exponencial foi iniciada no 20º dia e se estendeu até o 40º de inoculação (NOGUEIRA et al., 2008).

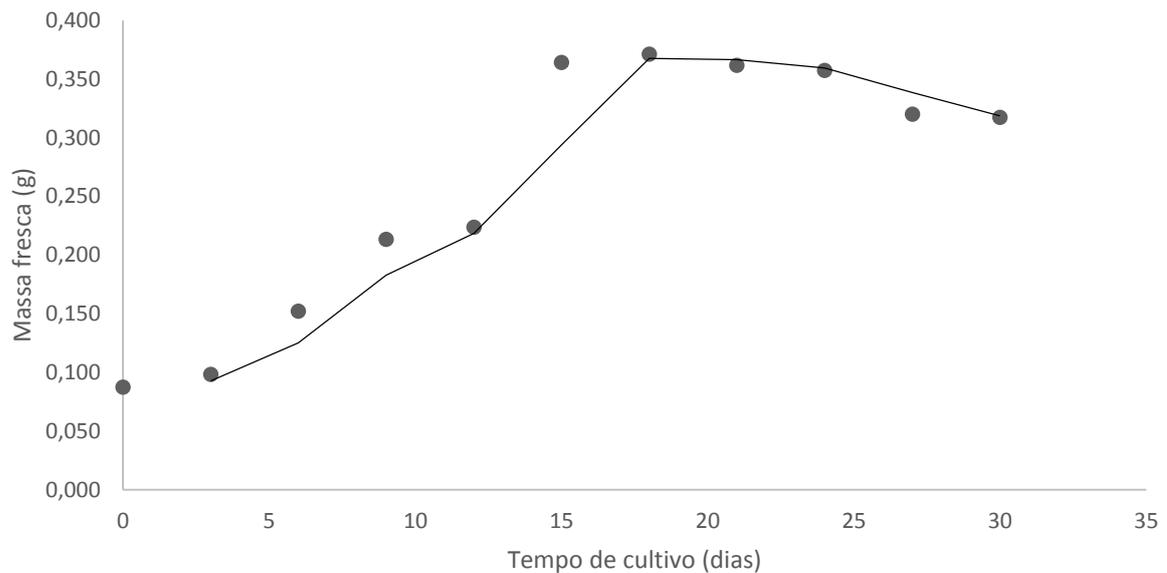


FIGURA. 6. Curva de crescimento de calos formados a partir de explantes foliares de *A. cearenses* inoculado em meio de cultura WPM suplementado com 23,83 μM de 2,4-D, durante 30 dias de inoculação EMBRAPA, Petrolina, PE, 2018.

A fase linear foi observada entre 12º e 15º dia da inoculação. Nesta fase o ciclo celular é ativo a um aumento na área celular, porém ocorre diminuição na divisão celular até atingir o máximo de crescimento dos calos, cerca de 84,71% para 2,4-D. Esse comportamento foi similar ao verificado para a cultura de calos de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.) que apresentou a fase linear entre 35º e 56º dias de inoculação (VASCONCELOS et al., 2012). Antes do final dessa fase deve ser realizado a repicagem dos calos para outro meio, quando as células ainda estão em divisão.

O intervalo de desaceleração e estacionária do crescimento ocorreu entre o dia 18º e 24º dias de inoculação. NOGUEIRA et al., (2008), analisando a curva de crescimento de muricipequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.), observou que entre o 60º e o 80º ocorreu a fase de desaceleração e estacionária de 80º a 100º dia após a inoculação. Essa fase é caracterizada pelo início da redução dos nutrientes, seguida pela fase estacionária quando ocorre a diminuição de oxigênio no interior das células dos calos e acúmulo de substâncias tóxicas.

A partir do 27º e 30º dia de cultivo, a cultura entrou na fase de declínio, quando não há mais divisão celular. As células começam a morrer, devido o acúmulo de substâncias tóxicas e exaustão do meio de cultura.

A indução de calogênese em segmentos foliares de *A. cearensis* foi obtida tanto na presença do 2,4-D como do picloram com características morfológica parecidas. Porém nos

tratamentos acrescidos de 2,4-D a porcentagem de calos responsivos apresentaram valores superiores aos encontrados nos tratamento acrescido de picloram, com crescimento exponencial durante o período de 28 dias.

CONCLUSÃO

Os resultados encontrados evidenciam que é possível a indução de calos friáveis com extruturas globolares indicativas de potencial embriogênico e/ou organogênico em segmentos foliares da espécie *A. cearensis*, utilizando os reguladores 2,4-D e picloram com destaque para a auxina 2,4-D.

A ocorrência de raízes no material cultivado *in vitro* pode confirmar pelo menos o potencial organogênico de calos de *A. cearensis*. Contudo, ainda permanece a necessidade de realização de trabalhos futuros visando estabelecer a regeneração indireta via organogênese ou embriogênese.

REFERÊNCIAS

- AGRA, M. F.; BARACHO, G.S.; NURIT K.; BASÍLIO, I. J.; COELHO, V. P. Medicina and posisonous diversity of the flora of “Cariri Paraibano”. **Journal of Ethnopharmacology**, Brasil. v. 111, p. 383-395, 2007.
- ALMEIDA, J. R.G.S.; GUIMARÃES, A. G.; SIQUEIRA, J. S.; SANTOS, M. R. V.; LIMA, J. T.; NUNES, T. X.; QUINTANS L. J. *Amburana cearensis* uma revisão química e farmacológica. **Scientia Plena**, v. 6, n. 11, 2010.
- BARBOZA, T.J.S.; LAGE, D.A.; MOSS, V. B.; SOUZA, C.A.; ALBARELLO, N. Efeito de diferentes meios nutritivos e fitoreguladores visando à otimização da calogênese de *Annona mucosa* (Jacq.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 4, p. 905-911, 2014.
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES AC; CALDAS LS; BUSO J.A (Org). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa.1998. p. 87-132.
- CAMPOS, V. C. A.; BRITO, A. L.; GUTIERREZ, I. E. M. D.; SANTANA, J. R. F. D.; SOUZA, A. V. V. D. Micropropagation of umburana de cheiro. **Ciência Rural**, v. 43, n. 4, p. 639-644, 2013.
- CANUTO, K. M.; SILVEIRA, E. R. Constituintes químicos da casca do caule de *Amburana cearensis* AC Smith. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1241, 2006.
- CANUTO, K. M.; SILVEIRA, E. R.; BEZERRA, A. M. E. Estudo fitoquímico de espécimens cultivados de cumaru (*Amburana cearensis* AC Smith). **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 662-666, 2010.
- CARNEIRO F.S.; OLIVEIRA, S.R.; QUEIROZ, D.; PASSOS, A.R; NASCIMENTO, M.N.; SANTOS, K.S. Embriogênese somática em *Agave sisalana* Perrine: indução, caracterização anatômica e regeneração. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 44, n. 3, 2014.
- CORRÊA, T. R. **Clonagem e controle genético da embriogênese somática em palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq.)**. 2014. Tese (doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciências e Agrotecnologia**. V. 35, n.6, p. 1039 – 1042, 2011.
- GOMES-COPELAND, K. P. G.; LEDO, A. S.; DAVID, J. P.; ARAÚJO, A. G. ALMEIDA, F. T. C. *In vitro* callogenesis of *Poincianella pyramidalis* (catingueira). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Brasil, v. 27, n. 4, p. 525-528. 2017.
- GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; MELLO, J.C.P; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Orgs.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ªed.Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC. 2007. p.13-28.
- GUEYE, B.; SAÏD-AHMED, H.; MORCILLO, F.; BORGEL, A.; SANÉ, D.; HILBERT, J. L.; BLERVACQ, A. S. Callogenesis and rhizogenesis in date palm leaf segments: are there similarities between the two auxin-induced pathways. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 98, n. 1, p. 47-58, 2009.

- INÁCIO, M. C. **Estudo agrônômico, químico e biológico de Cochlospermum regium (Mart. ex. Scharank): uma planta medicinal do cerrado.** Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP–Câmpus de Botucatu, SP. 132 p. 2010.
- LAVANYA, A. R.; MUTHUKRISHNAN, S.; MUTHUKUMAR, M.; BENJAMIN, J. F.; KUMAR, T. S.; KUMARESAN, V.; RAO, M. V. Indirect organogenesis from various explants of *Hildegardia populifolia* (Roxb.) Schott & Endl.–A threatened tree species from Eastern Ghats of Tamil Nadu, India. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 12, n. 2, p. 95-101, 2014.
- LEMOS, E.E.P. Organogênese. In: CID, L.P.B. (Org.). **Cultivo in vitro de plantas.** Brasília, EMBRAPA. 2010. p.103-127.
- LLOYD, G.; McCOWN, B. 1980. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* ssp. **HortScience**. 15(3):416-420.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**. 15:493-497.
- MOLINA, M. V.; AVILÉS, Z.; BONOMO, M. L. C.; DÍAZ, L. Efecto del picloram en la inducción de embriogénesis somática en *Pterogyne nitens* Tul." tipa colorada"/[Picloram effect on the induction of somatic embryogenesis in *Pterogyne nitens* Tul." tipa colorada"]. **International Journal of Innovation and Applied Studies**, v. 11, n. 3, p. 771, 2015.
- MOURA, E. F. **Embriogênese somática em macaúba: indução, regeneração e caracterização anatômica.** 2007, 66 p. 2007. Tese de Doutorado. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – UFV, Minas Gerais. 2007.
- NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; LIMA, E. C.; SOARES, G. A.; OLIVEIRA, L.M.; SANTOS, B. R.; EMRICH, E.R.; CASTRO, A. H. F. Curva de crescimento e análises bioquímicas de calos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 10, n. 1, p. 44-48, 2008.
- PADILHA, J. H. D. **Indução de embriões somáticos a partir de segmentos foliares de *Acrocomia aculeata* (Lodd.) Ex Mart.** Trabalho de conclusão de curso. – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 2013.
- REIS, I. N. R.S.; LAMEIRA, O. A.; CORDEIRO, I. M. C. C. Efeito do 2,4-D na Indução de Calos in vitro de Paricá (*Schizolobium parahyba* var. *amazonicum* (Huber ex Ducke) Barneby). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. S2, p.498-500, 2008.
- TREVIZAM, R.; BRONDANI, G. E.; SOUZA, R.; DE ALMEIDA, M. Morfologia de calos de *Eucalyptus urophylla* cultivados *in vitro* sob concentrações de boro e cálcio. **FLORESTA**, v. 41, n. 3, p. 563 – 574, 2011.
- VASCONCELOS, J. N. C.; CARDOSO, N. S. N.; OLIVEIRA, L. M.; SANTANA, J. R. F.; FERNANDEZ, L. G.; BELLO KOBLITZ, M. G.; SILVA, M. L. C. Indução, caracterização bioquímica e ultra-estrutural de calos de aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.). **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 4, p. 592-597, 2012.
- ZIMMERMAN, M. J. Embriogênese somática. In: CID, L. P. B (Org.). **Cultivo in vitro de plantas.** 3ed. Brasília, EMBRAPA. 2014. p. 69-103.

Indução, curva de crescimento e análise fitoquímica de calos de *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L.P.Queiroz

RESUMO

O objetivo do trabalho foi induzir calos a partir de segmentos cotiledonares de *Poincianella Pyramidalis* (catingueira), estabelecendo o tempo adequado para repicagem e maior síntese dos metabólitos secundários *in vitro*, e realizar a caracterização fitoquímica dessas estruturas. Para a indução de calos, os explantes foram segmentos cotiledonares isolados de plantas germinadas *in vitro* e cultivadas em meio MS/2 suplementados com diferentes associações de picloram (0,0; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0 μM) x BAP (0,0; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0 μM). A curva de crescimento foi realizada através do peso fresco (g) dos calos obtidos em intervalos de 3 dias a partir do dia de inoculação, durante 60 dias. Triagem fitoquímica e análises cromatográficas foram realizados para estabelecer o perfil fitoquímico dos extratos de catingueira cultivados em vários ambientes. A análise de regressão apresentou resposta quadrática para a produção de calos, e após 30 dias a maior produção de calos foi observada na presença de 19,53 μM de picloram + 10 μM de BAP com 98,68% de calos formados, ou seja, a razão auxina/citocinina 2:1 proporcionou maior formação de calos e estrutura friáveis. Os calos apresentaram crescimento sigmoidal. Plantas cultivadas *ex vitro* e *in vitro* mantiveram o mesmo perfil fitoquímico, porém os calos apresentaram um perfil distinto, em que foi possível identificar pela análise fitoquímica qualitativa reação positiva para a presença de naftoquinonas. Por meio das análises do cromatograma foi possível observar a presença de apigenina. A produção de calos com características friáveis, assim como, a presença do composto apigenina nos calos de catingueira sugere a possibilidade da realização de trabalhos futuros visando a produção de plantas *in vitro* através das vias morfogênicas como a organogênese e/ou embriogênese e a exploração desse composto usando a abordagens biotecnológicas.

Palavras-chave: plantas medicinais, calogênese, metabólitos secundários.

ABSTRACT

(Induction, growth curve and phytochemical analysis of *Poincianella pyramidalis*

(Tul.) L.P. Queiroz calluses)

The objective of this study was to induce callus from cotyledonary segments of *Poincianella Pyramidalis* (catingueira), establishing the adequate time for cutting and greater synthesis of secondary metabolites *in vitro*, and to perform the phytochemical characterization of these structures. For callus induction, the explants were cotyledonary segments isolated from plants germinated *in vitro* and cultured in MS/2 medium supplemented with different associations of picloram (0.0; 2.5; 5.0; 10.0; 20.0 μM) x BAP (0.0, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0 μM). The growth curve was determined by the callus fresh weight (g) obtained at 3 day intervals from the day of inoculation, during 60 days. Phytochemical screening and chromatographic analysis were performed to establish the phytochemical profile of catingueira extracts grown in various environments. The regression analysis showed quadratic response for callus production, and after 30 days, the highest callus production was observed in the presence of 19.53 μM of picloram + 10 μM BAP with 98.68% callus formation, that is, the 2:1 auxin / cytokinin ratio provided increased formation of friable callus and structure. The callus showed sigmoidal growth. Plants grown *ex vitro* and *in vitro* maintained the same phytochemical profile, but the callus presented a distinct profile due to a positive reaction for the presence of naphthoquinones, which was possible to identify by qualitative phytochemical analysis. Through the analysis of the chromatogram it was possible to observe the presence of apigenin. The production of callus with friable characteristics, as well as the presence of the apigenin compound in catingueira callus suggest the possibility of future studies aimed at the production of plants *in vitro* by means of morphogenic pathways such as organogenesis and/or embryogenesis and the exploitation of this compound using biotechnological approaches.

Key words: medicinal plants, callogenesis, secondary metabolites.

INTRODUÇÃO

Poincianella pyramidalis (Tul.) L.P. Queiroz (Fabaceae), é uma espécie arbórea nativa da Caatinga, conhecida popularmente como catingueira, catinga-de-porco e catingueira-das-folhas-largas (MAIA, 2012). Atualmente encontra-se entre as espécies da Caatinga mais exploradas pela população local, em função das propriedades medicinais e forrageiras, além de ser fonte de lenha e carvão (FERREIRA et al., 2004; FIGUEIRÔA et al., 2005; SANTOS et al., 2008).

Suas folhas, flores e cascas possuem elevada quantidade de taninos e compostos fenólicos totais, especialmente flavonóides, conferindo-lhe atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, antinociceptivas, como também elevada atividade antioxidante. Na medicina popular, é utilizada no tratamento de disenterias, diarreia e infecções. Seu extrato também está sendo usado contra linhagens resistentes de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (LIMA et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2016; SILVA et al., 2013).

No entanto, sua exploração, principalmente devido seu potencial medicinal, vem sendo realizada de forma extrativista e predatória e, por isso a preservação de indivíduos da catingueira em seu habitat natural vem sendo comprometida. Diante dessa realidade, a busca por técnicas biotecnológicas que viabilize a produção de mudas em larga escala ou mesmo a produção de metabólitos secundários de interesse farmacêutico em condições *in vitro* pode ser interessante, uma vez que pode viabilizar a utilização de vias sustentáveis de exploração dos recursos genéticos vegetais (GEORGE et al., 2008).

A cultura de células ou calos de plantas medicinais tem sido apontada como um sistema modelo que possibilita estudos futuros em diferentes áreas, como a embriogênese somática e/ou a produção de metabólitos secundários *in vitro*, haja vista os compostos bioativos alvos dessas plantas são obtidos a partir de coleta indiscriminada e predatória. Por esses motivos, pesquisas visando a indução de calogênese podem ser vantajosas tanto do ponto de vista econômico como sustentável (YESILCELIK et al., 2010). Pesquisas com plantas medicinais já foram realizadas neste contexto visando o estabelecimento de calogênese e produção de metabólitos secundários em segmentos foliares de *Cissus sicyoides* L. (RODRIGUES et al., 2010) e em células em suspensão de *Cordia verbenacea* (AMEIRA et al., 2009).

Pesquisas com a espécie *P. pyramidalis* vêm sendo realizadas em diferentes áreas da ciência, com destaque para multiplicação *in vitro* e estudos sobre os metabólicos secundários (SILVA et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2016). Pode-se relatar ainda o trabalho realizado por GOMES-COPELAND et al., (2017), visando a indução de calogênese *in vitro*. Os autores avaliaram o efeito do 2,4-D na indução dos calos e observaram que é possível induzir essas estruturas a partir de diferentes tipos de explantes na presença da referida substância. Contudo, os calos obtidos eram compactos. Quando o objetivo for o desenvolvimento de embriões somáticos ou a obtenção de compostos bioativos, os calos formados devem apresentar características friáveis (RODRIGUES et al., 2010).

Mas os resultados obtidos com essas pesquisas ainda são incipientes quando comparados à necessidade do estabelecimento de metodologias viáveis voltadas à sua propagação, ou mesmo à obtenção de metabolitos secundários de interesse industrial em condições *in vitro*, haja vista o potencial de exploração econômica da espécies.

Neste contexto, objetivou-se com este trabalho induzir calos a partir de segmentos cotiledonares de *P. pyramidalis*, estabelecendo o tempo adequado para repicagem e maior síntese dos metabólitos secundários *in vitro*, e realizar a caracterização fitoquímica dessas estruturas.

MATERIAL E METODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Semiárido e as sementes de *Poincianella pyramidalis* (Tul.) LP Queiroz, utilizadas para o estabelecimento das espécies *in vitro*, foram obtidas no Laboratório de Sementes da mesma instituição.

Indução de calogênese

Os calos foram induzidos a partir de segmentos cotiledonares obtidos de plantas estabelecidas *in vitro*, após 45 dias de cultivo, baseado pela metodologia de CAMPOS et al., (2013). Os explantes foram colocados em potes plásticos de polietileno autoclaváveis contendo 40 mL de meio de cultura MS/2 (MURASHIGE E SKOOG, 1962), suplementado com 15 g L⁻¹ de sacarose e 4 g L⁻¹ de ágar para gelificação. Foram utilizadas cinco concentrações de picloram (0,0; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0µM) e seis concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) (0,0;

0,5; 1,0; 2,5; 5,0 e 10,0 μM). O pH do meio de cultura foi aferido para 5,9 antes da autoclaveagem a 120 °C durante 15 minutos. Em seguida, os frascos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C em ausência de luz.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial de 5x6 (5 concentrações de picloram x 6 concentrações de BAP). Cada tratamento foi constituído de três repetições e quatro explantes por repetição. Após 30 dias de cultivo *in vitro*, avaliou-se a percentagem de explantes responsivos.

Obtenção da curva de crescimento dos calos

A curva de crescimento dos calos foi determinada pela quantificação da matéria fresca (g) dos calos formados, a partir do dia zero (explantes no dia da inoculação), em intervalo de três dias, por um período de 60 dias.

Análise fitoquímica

Preparo do extrato

Para obtenção do extrato bruto foram utilizadas partes aéreas de plantas obtidas *in vitro* com 45 dias de idade, partes aéreas de plantas germinadas em casa de vegetação com 45 dias de idade e calos induzidos *in vitro* com 45 dias de idade, os quais foram submetidos a secagem durante um período de quatro dias a temperatura de 50° C em estufa com circulação de ar forçado. Para o preparo do extrato bruto, o material seco (10g) foi submetido a maceração em metanol (10 mL) através de 4 extrações consecutivas no intervalo de 72 horas cada. Posteriormente, a solução foi concentrada em um recipiente de vidro e mantida em capela de fluxo laminar para eliminação do solvente orgânico e obtenção do extrato bruto.

Triagem fitoquímica qualitativa

Para triagem fitoquímica da presença de alcaloides totais, antocianinas, antraquinonas, compostos fenólicos, cumarinas, derivados antracênicos, ligninas, mono, sesqui e diterpenos, naftoquinonas, saponinas, taninos condensados, taninos hidrolisados, triterpenos, esteroides e xantinas, foram investigadas de acordo com a metodologia descrita por WAGNER; BLADT (1996).

Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD)

Para determinação do perfil cromatográfico das amostras foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) Shimadzu® LC-20 equipado com um sistema quaternário de bombas modelo LC - 20ADVP, degaseificador modelo DGU - 20A, detector PDA modelo SPD - 20AVP, forno modelo CTO - 20ASVP, injetor automático modelo SIL - 20ADVP e controlador modelo SCL - 20AVP e acoplado a um detector de arranjo de diodos (DAD). Os dados obtidos são tratados através do software Shimadzu® LC solution 1.0 (Japão).

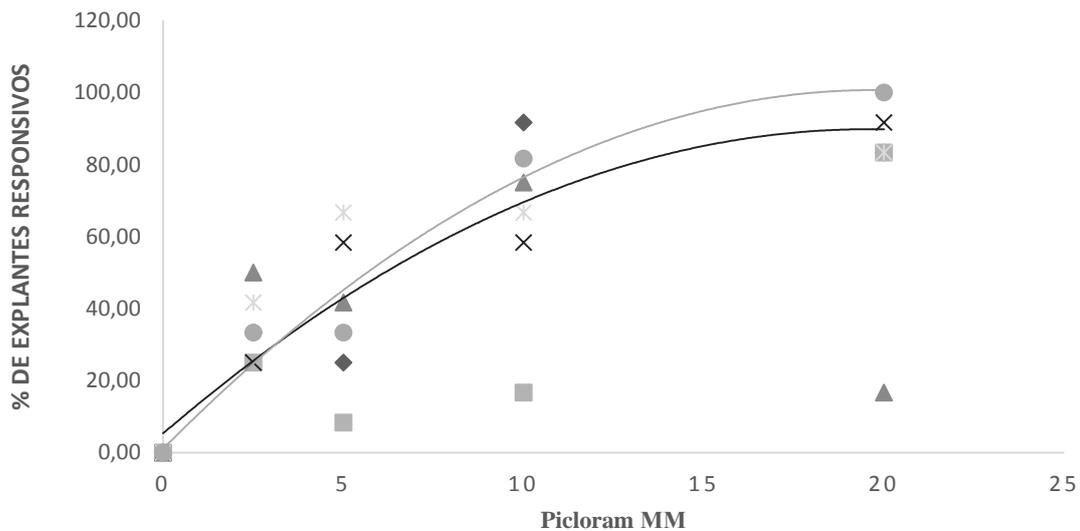
No método inicial a fase móvel utilizada foi composta de 2 solventes: solvente A – solução de ácido trifluoracético 0,01% diluído em água ultrapurificada e solvente B 100% acetonitrila, com fluxo de 0,8 mL/min-1. A fase estacionária foi uma coluna C18 Thermo Scientific® Hypersil com dimensões de 250 x 4,6 mm, com tamanho da partícula 5µm, mantida a 30°C. Foram realizados ensaios em triplicata, nos quais foram injetados 50 µL da amostra e feito o monitoramento nos comprimentos de onda de 340 nm. Paralelamente, foram analisadas, individualmente, 24 substâncias químicas de referência (SQRs), Sigma Aldrich®, caracterizando-se pelo alto grau de pureza (pureza > 98%), que foram usados para investigar sua presença no extrato etanólico da *P. pyramidalis*.

Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e às médias dos tratamentos quantitativos avaliados por regressão, com o Programa de Análise Estatística Sisvar (FERREIRA, 2011).

RESULTADOS E DISCURSOS

A análise de regressão apontou modelo quadrático ($p < 0,05$) da interação 'picloram x BAP' para porcentagem de calos responsivos em explantes de segmentos cotiledonares. À medida que se aumentou a concentração dos reguladores, houve aumento na formação dos calos. Aos 30 dias de cultivo *in vitro*, a formação de calos ocorreu sobre a superfície dos explantes em todos os tratamentos testados, exceto no meio ausente da auxina picloram e da citocinina BAP (Figura 1).



$$y \times 2,5 \mu\text{M BAP} = -0,22x^2 + 8,6207x + 5,3848 \quad R^2 = 0,9201^*$$

$$y \cdot 10 \mu\text{M BAP} = -0,2557x^2 + 10,09x + 1,1538 \quad R^2 = 0,963^*$$

Figura 1: Porcentagem de explantes responsivos de segmentos cotiledonares de *P. pyramidalis*, submetido a diferentes interações de Picloram e BAP * significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F. Petrolina-PE, 2018.

Para a porcentagem de explantes responsivos, na presença de 2,5 µM de BAP, houve 89,84% de indução de calos na concentração de 19,59 µM de picloram. Já nas concentrações de 19,53 µM de picloram na presença de 10 µM de BAP, este valor aumentou para 98,68% de calos formados, ou seja, a razão auxina/citocinina 2:1 proporcionou maior formação de calos (Figura 1), com estruturas friáveis e tonalidade entre transparente e bege claro (Figura 2). Isto ocorre porque a auxina picloram junto ao 2,4-D são mais potentes na indução dos calos com características friáveis do que as demais auxinas. Porém o BAP pode inibir ou retardar os efeitos fisiológicos degenerativos, o que implica no aumento da longevidade celular (WERNER et al., 2010; MORAIS et al., 2014). Para as demais interações 'picloram x BAP', os resultados não foram significativos.

De acordo com ZIMMERMAN (2014), meios de cultura suplementados com auxinas e baixas concentrações de citocinina como agente estressor, tem sido requerido para a indução de calos embriogênicos. Essa condição estressora pode resultar na produção de células capazes de desenvolver embriões somáticos. A indução de calos com características friáveis é um fator crucial no estabelecimento de culturas embriogênicas, por conter células arredondadas e com características meristemáticas. Essa friabilidade é induzida pela adição de compostos orgânicos ao meio de cultura, bem como pela alta relação auxina/citocinina (VASCONCELOS et al., 2012).

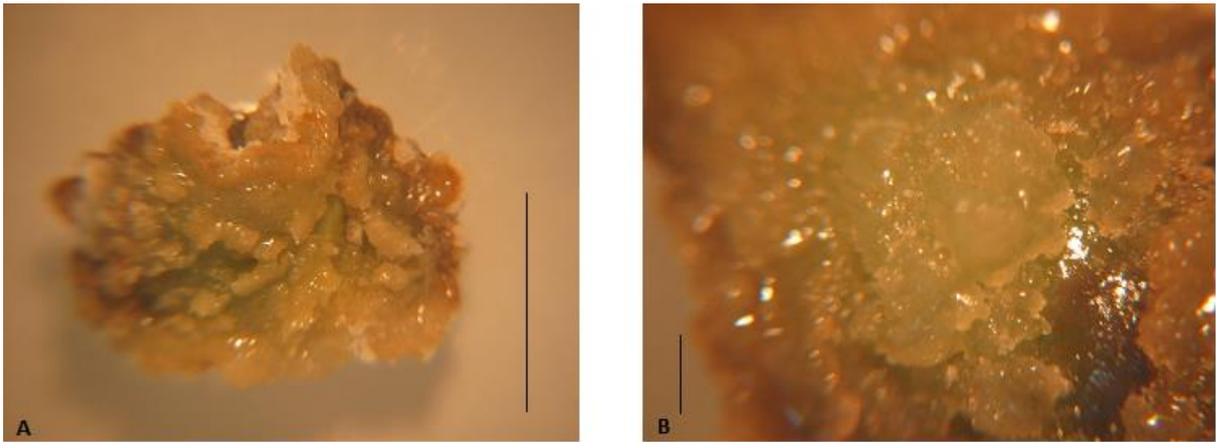


FIGURA 2. Calos de *Poincianella pyramidalis*(tul.), do explante segmento cotiledonar inoculados em meio MS/2 suplementado com 19,53 μ M picloram +10,0 μ M BAP (A; B): Petrolina – PE, 2018. Barras: 1 cm (A); 1 mm (B).

A interação entre os sistemas de cultura de tecidos apresenta variações a depender da composição do meio de cultura, reguladores vegetais empregados e a totipotência dos explantes utilizados, afetando diretamente a indução de calogênese de tecidos vegetais *in vitro* (CALDAS, 1998; LAVANYA et al., 2014). Assim a utilização das auxinas e citocininas no cultivo *in vitro* podem atuar na indução de calos com potenciais embriogênicos. Para a espécie *Poincianella pyramidalis* o balanço entre os reguladores picloram + BAP mostrou resultados satisfatórios.

Curva de crescimento

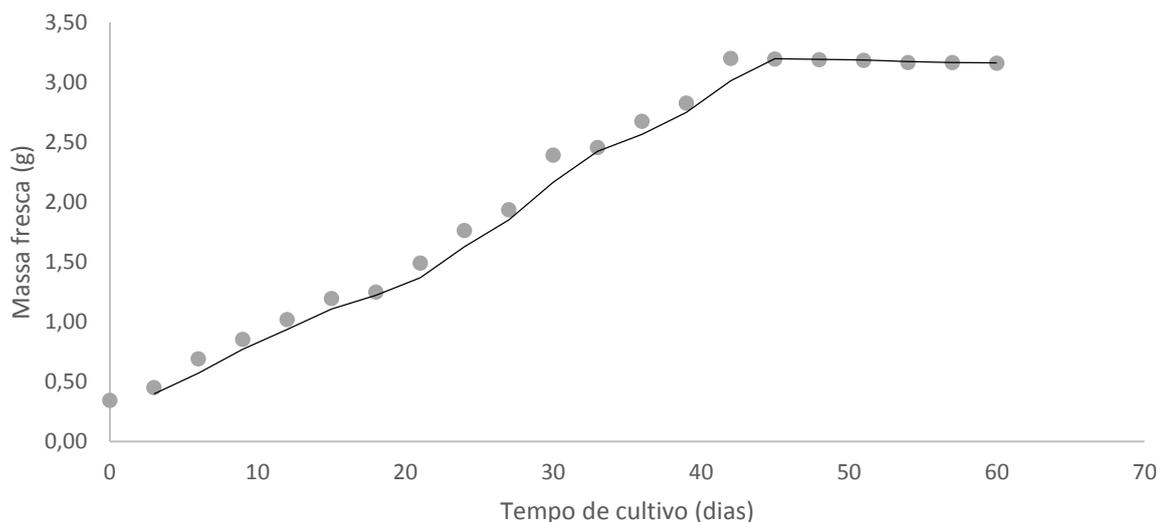


Figura 3. Curva de crescimento de calos formados a partir de explantes foliares de *P. pyramidalis* inoculado em meio de cultura WPM suplementado com 19,53 μ M de picloram e 10,0 μ M de BAP, aos 60 dias de inoculação EMBRAPA, Petrolina, PE, 2018.

Neste estudo foi possível observar quatro fases de crescimento (lag, linear, desaceleração e estacionária) (Figura 3). Para a espécie *P. pyramidalis* a fase lag ocorreu antes do 9º dia de cultivo, seguida pela fase Linear com tendência de ganho de matéria fresca até o 42º dia. A identificação dessa fase é importante pois sinaliza o momento correto para a repicagem e transferência dos calos para outro meio nutritivo enquanto as células ainda estão em divisão (VASCONCELOS et al., 2012).

O intervalo de desaceleração e a fase estacionária do crescimento ocorreu entre o dia 42º e 60º dias de cultivo. NOGUEIRA et al. (2008), analisando a curva de crescimento de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.), observaram que entre o 60º e o 80º ocorreu a fase de desaceleração e a fase estacionária foi observada entre 80º a 100º dia após o cultivo. Essa fase é caracterizada pelo início da redução dos nutrientes, seguida pela fase estacionária, quando ocorre a diminuição de oxigênio no interior das células dos calos e acúmulo de substâncias tóxicas.

Triagem fitoquímica qualitativa

A prospecção fitoquímica dos extratos etanólicos de *Poincianella pyramidalis* demonstrou a presença de metabólitos secundários agrupados em seis classes distintas: antraquinonas, compostos fenólicos, cumarinas, derivados antracênicos, naftoquinonas, triterpenos e esteroides (Tabela 1).

Investigações fitoquímicas realizadas anteriormente para a espécie em estudo, também confirmaram a presença de terpenos, fenilpropanóides, flavonóides e, em especial, biflavonóides (OLIVEIRA et al., 2016), o que corrobora os resultados obtidos nesta pesquisa.

Tabela 1: Triagem fitoquímica qualitativa dos materiais vegetais de *Poincianella pyramidalis* submetido à extração por maceração. Petrolina –PE, 2018.

METABÓLITOS	<i>P.pyramidalis</i> <i>ex vitro</i>	<i>P.pyramidalis</i> <i>in vitro</i>	Calos friáveis
Alcaloides gerais			
Antocianinas			
Antraquinonas	+	+	
Compostos Fenólicos	+	++	+
Cumarinas	+	+	+
Derivados Antracênicos	+	+	
Lignanas			
Mono, sesqui e diterpenos			
Naftoquinonas			+
Saponinas			
Taninos Condensados			
Taninos Hidrolisáveis			
Triterpenose Esteroides	+	++	+
Xantinas			

Legenda: (-) Não detectado; (+) Positivo; (++) moderadamente positivo; (+++) Fortemente positivo.

O extrato de calos cotiledonares apresentou um perfil distinto daquele observado para as plantas *ex vitro* e *in vitro*, o que mostra reação positiva para a presença de naftoquinonas e indica a produção desse metabólito por processos biotecnológicos. Naftoquinonas são metabólitos secundários produzidos por plantas, algas, fungos e animais que expressam diversas atividades biológicas como antibacteriana, anticoagulante e antitumoral. O uso em seres humanos está relacionado aos tratamentos de doenças parasitárias e vários tipos de câncer, sendo um dos compostos mais estudados pela indústria farmacêutica para esta aplicabilidade (NANCI et al., 2015).

Os resultados aqui reportados são relevantes por que fornecem informações essenciais sobre as classes dos metabólitos secundários que compõem os extratos obtidos para a espécie em estudo, o que evidencia a eficiência do sistema de cultivo *in vitro* na produção de substâncias bioativas de interesse farmacológico por meio da cultura de calos.

Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A análise quantitativa dos extratos evidenciou que algumas substâncias são mais produzidas para essa espécie quando as plantas são germinadas *in vitro*, apesar de apresentarem o mesmo perfil fitoquímico qualitativo (Figura 4). Foi possível identificar no cromatograma de *P. pyramidalis* um pico bem definido, por meio de semelhança entre tempos de retenção e espectro de absorção quando comparado com o pico no cromatograma do padrão testado, que mostrou-se equivalente a apigenina (Figura 5). A substância apigenina que foi encontrada no extrato de calos cotiledonares são flavanoides que agem como antioxidante (COOMBS et al., 2016).

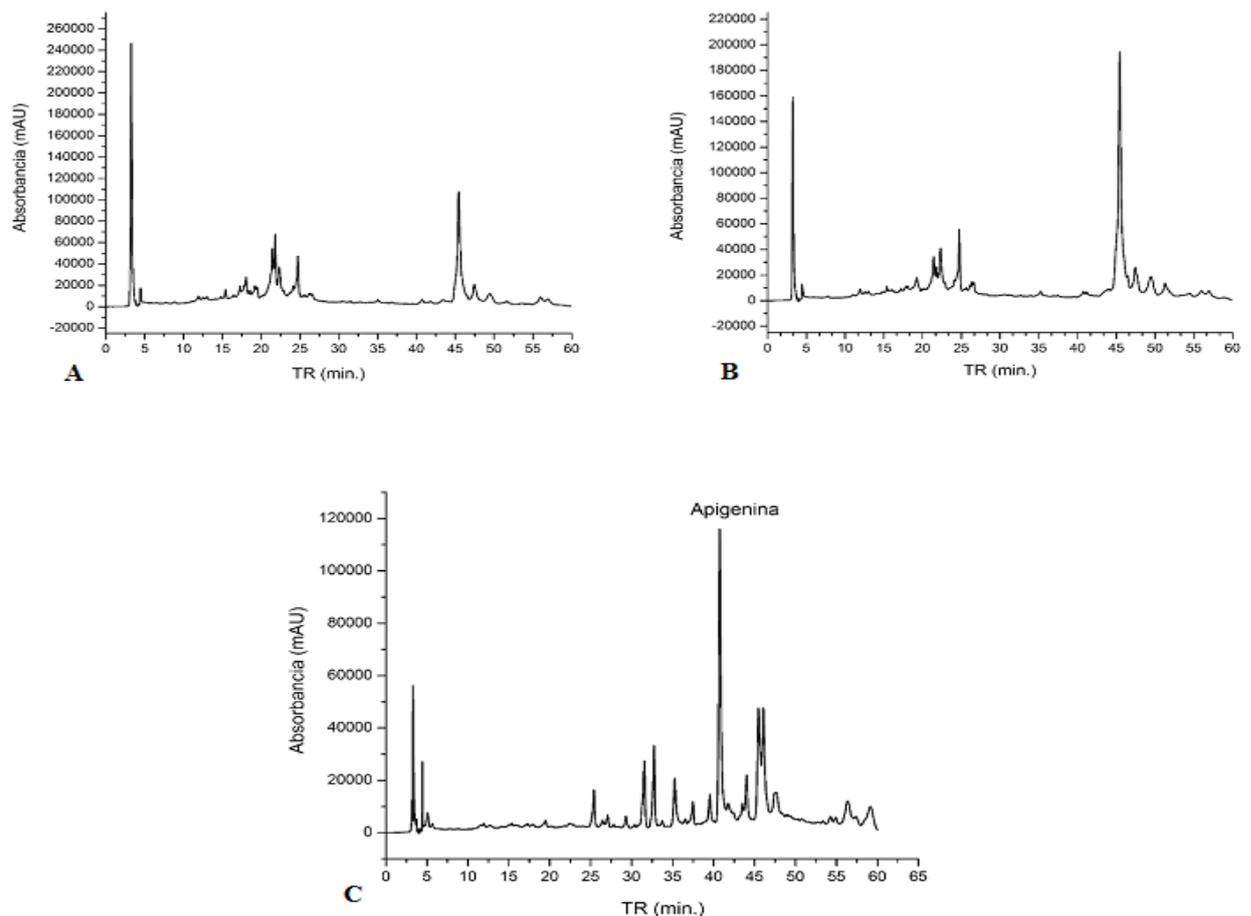


Figura 4: (A) - Cromatograma 340 nm dos extratos obtidos por maceração das partes aéreas de *P. pyramidalis ex vitro*; (B) - Cromatograma 340 nm dos extratos obtidos por maceração das parte aereas de *P. pyramidalis in vitro*; (C) - Cromatograma 340 nm dos extratos obtidos por maceração de calos codiledonares de *P. pyramidalis*.

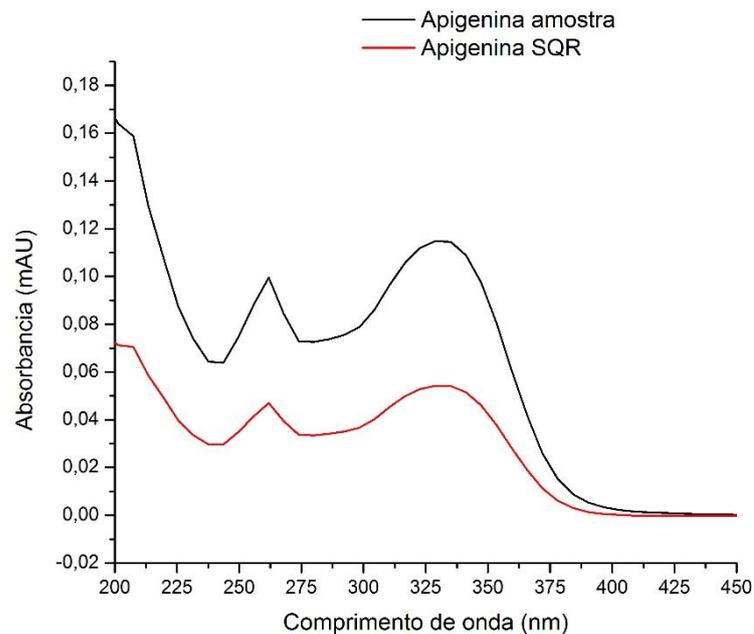


Figura 5: Cromatograma 340 nm do espectro de UV do extrato obtido por maceração de calos codiledonares de *P. pyramidalis*, espectros apigenina amostra e padrão.

Resultados similares foram mostrados por BAHIA et al. (2005), estudando o extrato clorofórmico das folhas de *P. pyramidalis* que relataram compostos fenólicos, dentre eles apigenina. Nos estudos realizados por MARTINS (2016) com a mesma espécie, através de análise por cromatografia líquida, foi possível identificar flavanóides como: rutina, epigallocatequina e scopoletina dotados de potencial biológico.

A apigenina é um dos compostos fenólicos encontrados em frutas e vegetais e, estudos já realizados demonstraram seu potencial antioxidante, antiinflamatório e antitumoral, assim como seu efeito na prevenção de diversas enfermidades, a exemplo de doenças cancerígenas. Seus benefícios vêm sendo relacionados com a sua atividade anti-inflamatória (COOMBS et al., 2016; SHUKLA et al., 2015).

Técnicas biotecnológicas como o cultivo *in vitro* de células e tecidos vegetais constitui uma alternativa viável para a produção de metabólitos secundários de interesse, especialmente para espécies que requerem períodos longos de cultivo e possuem baixos rendimentos dos metabólitos secundários nos seus tecidos. Além de constituir um sistema apropriado para a produção de compostos bioativos, possibilita a produção em grande escala, em espaços físicos reduzidos sem a dependência de fatores como solo e clima (MORAIS et al., 2012; RODRIGUES et al., 2010).

Diversos princípios ativos já foram obtidos via técnicas de cultura de células, a exemplo, os componentes 7,4'-diidróxi-5'-carboximetóxi isoflavona e 7,4'-diidróxi-5'-metil isoflavona em células cultivadas *in vitro* de *Cordia verbenacea* DC (AMEIRA et al., 2009); alcalóides indólicos em gêneros de *Tabernaemontana* e *Aspidosperma* (FUMAGALI et al., 2008), bem como a presença de heterosídeos cardiotônicos em calos de *Cissus sicyoides* L. (RODRIGUES et al., 2010).

A otimização da produção *in vitro* de metabólitos secundários potenciais para uso de indústrias químicas e farmacêuticas, pode ser realizada com o uso de biorreatores, os quais fornecem ao material cultivado, as condições ideais de temperatura, pH e oxigênio, além de viabilizar a redução de custos na produção em larga escala de compostos de interesse (ALBRECHT et al., 2015).

CONCLUSÕES

Os resultados encontrados confirmaram que é possível a indução de calos com textura friável em segmentos cotiledonares de catingueira utilizando picloram associado ao BAP. A multiplicação em larga escala, pode representar uma alternativa a fim de minimizar os impactos causados pela exploração antrópica e extrativista, assim como, a presença do composto apigenina nos calos de catingueira sugere a possibilidade da realização de trabalhos futuros visando exploração desse composto usando abordagens biotecnológicas para produção de substâncias bioativas *in vitro*.

REFERÊNCIAS

ALBRECHT, I.; RHODEN, S. A.; PAMPHILE, J.A. Indústria biofarmacêutica e seu processo produtivo. **Evidência-Ciência e biotecnologia**, v. 15, n. 1, p. 57-68, 2015.

AMEIRA, O. A.; PINTO, J.E.B.P.; CARDOSO, M.G.; ARRIGONI-BLANK, M.F. Estabelecimento de cultura de células em suspensão e identificação de flavonóides em *Cordia verbenacea* DC. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.11, n.1, p.7-11, 2009.

BAHIA, M. V.; SANTOS, J. B. D.; 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, 2005.

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES AC; CALDAS LS; BUSO JA. (Org). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa. 1998. p. 87-132.

COOMBS, M.R.P.; HARRISON, M.E E.; HOSKIN, D.W. Apigenin inibe a expressão induzível do ligando de morte programado 1 por células de carcinoma mamário humano e de rato. **Letras de câncer**. v. 380, n. 2, p. 424-433, 2016.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciências e Agrotecnologia**. V. 35, n.6, p. 1039 – 1042, 2011.

FERREIRA, G. C.; HOPKINS, M. J. G.; SECCO, R. R. Contribuição ao conhecimento morfológico das espécies de leguminosae comercializadas no estado do Pará, como “angelim” **Acta Amazonica**. v. 34, n. 2, p 219-232. 2004.

FIGUEIRÔA, F. A. R.; OLIVEIRA, A. V.; LIMA, L. C. L.; BARROS, R. F. M.; SCHLINDWEIN, C. P.; MARTINS, C. F.; KILL, L. H. P. (Org.) Espécies da flora nordestina de importância econômica potencial. Recife: APNE, 2005. p.101-133.

FUMAGALI, E.; GONÇALVES, R. A. C.; MACHADO, M. F. P. S.; VIDOTI, G. J.; OLIVEIRA, A. J. B. D. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 627 – 641, 2008.

- GEORGE, Edwin F.; HALL, Michael A.; DE KLERK, Geert-Jan. Plant tissue culture procedure-background. In: **Plant propagation by tissue culture**. 3ed. Dordrecht: Springer, 2008. p. 1-28.
- GOMES-COPELAND, K. P. G.; LEDO, A. S.; DAVID, J. P.; ARAÚJO, A. G. ALMEIDA, F. T. C. *In vitro* callogenesis of *Poincianella pyramidalis* (catingueira). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Brasil, v. 27, n 4, p. 525-528, 2017.
- LAVANYA, A. R.; MUTHUKRISHNAN, S.; MUTHUKUMAR, M.; BENJAMIN, J. F.; KUMAR, T. S.; KUMARESAN, V.; RAO, M. V. Indirect organogenesis from various explants of *Hildegardia populifolia* (Roxb.) Schott & Endl.–A threatened tree species from Eastern Ghats of Tamil Nadu, India. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 12, n. 2, p. 95-101, 2014.
- LIMA, J. L. S.; FURTADO, D. A.; PEREIRA, J. P.G.; BARACUHY, J. G. V.; XAVIER, H. S. Plantas medicinais de uso comum no Nordeste do Brasil. **Campina Grande**, v. 35, 81p. 2006.
- MAIA, G. N. **Caatinga**: árvores e arbustos e suas utilidades. Ed. Fortaleza: Printcolor Gráfica e Editora, 2. ed 2012. p. 159-166.
- MARTINS, P. L. A. S. Desenvolvimento de metodologia analítica para padronização de extrato de *Cesalpinia pyramidalis* Tul. Por quantificação de fénois totais por espectroscopia de absorção no uv- vis. 2016. Trabalho de conclusão de curso – UNIVASF, Petrolina – PE.
- MORAIS, T. P.; ASMAR, S.A.; LUZ, J.M.Q. Reguladores de crescimento vegetal no cultivo *in vitro* de *Mentha x Piperita* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v.16, n.2, supl. I, p.350-355, 2014.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tabacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**. 15:493-497.
- NANCI, L. C., FERREIRA, A. B.; NETTO-FERREIRA, J. C. Fotoquímica de Naftoquinonas. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 1, p. 403-463, 2015.
- NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; LIMA, E. C.; SOARES, G. A.; OLIVEIRA, L.M.; SANTOS, B. R.; EMRICH, E.R.; CASTRO, A. H. F. Curva de crescimento e análises

bioquímicas de calos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 10, n. 1, p. 44-48, 2008.

OLIVEIRA, J. C. S.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Biflavonoids from the bark roots of *Poincianella pyramidalis* (Fabaceae). **Phytochemistry Letters**, v. 16, p. 18-22, 2016.

RODRIGUES, F. R.; ALMEIDA, W. A. B. Calluses from *Cissus sicyoides* L. leaves. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 3, p. 333-340, 2010.

SANTOS, J. P.; ARAÚJO, E. L.; ALBUQUERQUE, U. P. Richness and distribution of useful woody plants in the semi-arid region of northeastern Brazil. **Journal of Arid Environments**, v.72, n.5, p.652-663, 2008.

SHUKLA, S.; KANWAL, R.; SHANKAR, E.; DATT, M.; CHANCE, M. R.; FU, P.; GUPTA, S. Apigenin blocks IKK α activation and suppresses prostate cancer progression. **Oncotarget**, v. 6, n. 31, p. 31216 - 31232, 2015.

SILVA, T. S.; NEPOMUCENO, C.F.; DOS SANTOS BORGES, B.P.; ALVIM, B.F.M.; DE SANTANA, J.R.F. multiplication of *Caesalpinia pyramidalis* (Leguminosae). **Sitientibus série Ciências Biológicas**, v. 13, p. 1-6, 2013.

VASCONCELOS, J. N. C.; CARDOSO, N. S. N.; OLIVEIRA, L. M.; SANTANA, J. R. F.; FERNANDEZ, L. G.; BELLO KOBLITZ, M. G.; SILVA, M. L. C. Indução, caracterização bioquímica e ultra-estrutural de calos de aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 4, p. 592-597, 2012.

WAGNER, H.; BLADT, S. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. Berlin Heidelberg: **Springer Verlag**, p. 384, 1996.

WERNER, E. T.; MILANEZ, C. R. D.; MENGARDA, L. H. G.; VENDRAME W. A.; CUZZUO, G. R. F. Controle da calogênese do pau-brasil in vitro. **Revista Árvore**, v. 33, n. 6, p. 1047 – 1051, 2010.

YESIL-CELIK TAS, OZLEM. ; GUREL, AYNUR.; VARDAR-SUKAN. Fazilet. Large scale cultivation of plant cell and tissue culture in bioreactors. **Transworld Research Network**, v. 1, p. 54, 2010.

ZIMMERMAN, M. J. Embriogênese somática. In: CID, L. P. B. **Cultivo in vitro de plantas**. 3ed. Brasília, EMBRAPA. 2014. p. 69-103.

CONCLUSÕES GERAIS

Amburana:

É possível estabelecer a formação de calos responsivos para a indução de embriogênese somática em *Amburana cearensis* na presença de 2,4-D, quando se utiliza segmentos foliares de plantas jovens germinadas em condições *in vitro*. Neste estudo, foi possível observar calos com estruturas globulares. Outros experimentos mais elaborados podem ser realizados de modo a viabilizar a obtenção das estruturas cordiforme, torpedo e cotiledonar, necessárias para a formação de embriões somáticos *in vitro* desta espécie.

Catingueira:

A interação auxina x citocinina foi favorável na indução de calos friáveis com características embriogênicas para a catingueira, sendo o Picloram + BAP, a condição mais efetiva quando comparada ao 2,4-D + Kin.

O emprego de técnicas biotecnológicas pode ser estabelecido futuramente para a promoção da organogênese e/ou embriogênese indireta, desta espécie. A multiplicação em larga escala, pode representar uma alternativa a fim de minimizar os impactos causados pela exploração antrópica e extrativista.

A detecção da presença de apigenina nos extratos dos calos obtidos *in vitro* de *P. pyramidalis*, foi um resultado extremamente relevante, uma vez que demonstrou e confirmou o potencial da espécie para exploração comercial das indústrias farmacêuticas. Esta substância apresenta potencial anticâncer e pesquisas farmacológicas utilizando como base técnicas biotecnológicas da cultura de células, pode ser uma via interessante, uma vez que poderá viabilizar sua produção *in vitro* em larga escala, por meio do uso de biorreatores.