

Produção de flavonóides em mudas micorrizadas de *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz var. *ferrea* adubadas com fósforo⁽¹⁾.

Fábio Sérgio Barbosa da Silva⁽²⁾; Francineyde Alves da Silva⁽³⁾; Leonor Costa Maia⁽⁴⁾

⁽¹⁾ Trabalho executado com recursos da Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco – FACEPE e do CNPq

⁽²⁾ Professor Adjunto; Universidade de Pernambuco-Campus Petrolina; Br 203, Km 02, Campus Universitário, Petrolina, PE; fs.barbosa@yahoo.com.br; ⁽³⁾ Doutoranda do PPG em Biologia de Fungos; Universidade Federal de Pernambuco; Cidade Universitária, Recife, PE, 50670-420; francineydealves@uol.com.br; ⁽⁴⁾ Professora Titular; Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco; Rua Nelson Chaves, s/n, Recife, PE, 50670-420; leonorcostamaia@yahoo.com.br.

RESUMO: Os FMA podem induzir melhoria na nutrição, principalmente em P e aumento da produção de compostos bioativos em plantas medicinais. *Libidibia ferrea*, planta nativa da Caatinga muito utilizada pela população como medicamento, também forma associação com FMA. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi determinar os benefícios da inoculação micorrízica e da adubação fosfatada na maximização da produção de flavonóides totais foliares em mudas de *L. ferrea*. Plântulas com duas folhas definitivas foram transferidas para potes com 1,2 Kg de solo contendo cinco níveis de P (3; 4,8; 13; 31; 55 mg/dm⁻³) e receberam ou não (controle) solo-inóculo, contendo 300 esporos (Mix de FMA: *Claroideoglomus etunicatum* + *Gigaspora albida* + *Acaulospora longula*) e mantidas em telado experimental por 225 dias. O extrato etanólico vegetal foi obtido a partir de 500 mg de folhas e os flavonóides totais quantificados. A inoculação micorrízica não afetou a produção de flavonóides nos níveis de P testados. Nas plantas associadas aos FMA, a produção de flavonóides se manteve mesmo nas doses mais altas de P; por outro lado, no tratamento controle, houve redução linear na produção desses compostos. O uso combinado de P e FMA não incrementa a produção de flavonóides totais em mudas *L. ferrea*.

Termos de indexação: associação micorrízica, compostos secundários, fósforo.

INTRODUÇÃO

A associação micorrízica induz aumento no crescimento da planta devido à absorção de nutrientes do solo, principalmente o fósforo (P) (Smith & Read, 2008), que participa da constituição de moléculas vegetais (Taiz & Zeiger, 2009). Em solo pobre em P, os benefícios da micorrização são mais evidentes (Moreira e Siqueira, 2002); no entanto, níveis elevados de P no solo prejudicam a

associação (Carneiro et al., 2004), suprimindo os benefícios à planta hospedeira. Dentre os benefícios dos FMA é mencionado o aumento na produção de compostos secundários pelas plantas (Ratti et al., 2010; Cecarelli et al., 2010; Pedone-Bonfim et al., 2013). Alguns mecanismos, embora não muito claros, foram propostos para explicar como os FMA modulam a produção de compostos secundários em plantas medicinais (Kapoor et al., 2004, Toussaint et al., 2007; Copetta et al., 2006), e dentre esses encontra-se a melhor nutrição com P.

Libidibia ferrea (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz var. *ferrea* (= *Caesalpinia ferrea* var. *ferrea* Mart. ex Tul.) (Fabaceae), planta medicinal nativa da Caatinga, conhecida popularmente como pau-ferro, forma associação com FMA (Gatai et al., 2011). A planta é usada como anti-inflamatório, analgésico (Carvalho et al., 1996), anticancerígeno (Nakamura et al., 2002), antibacteriana (Sampaio et al., 2009) e tais atividades estão associadas à presença de compostos secundários como flavonóides, fenóis e taninos (Souza et al., 2006). Porém, não há registro de que os níveis de P no solo influenciem o acúmulo de flavonóides em folhas de mudas de *L. ferrea* micorrizadas. Portanto, o objetivo deste trabalho foi verificar os benefícios da inoculação micorrízica e da adição de P na maximização da produção de flavonóides totais foliares em mudas de *L. ferrea*.

MATERIAL E MÉTODOS

O solo utilizado no experimento foi coletado em área de caatinga nativa (Km 152, Petrolina-PE).

Sementes de *L. ferrea* tiveram a dormência quebrada com escarificação química com ácido sulfúrico (20 minutos) (Biruel, et al., 2007) e foram postas para germinar em copinhos com vermiculita granulação média.

Plântulas com duas folhas definitivas foram transferidas para potes com 1,2 Kg de solo contendo cinco níveis de P: 3 (nível natural) e adicionado de 4,8, 13, 31, 55 mg/dm³ de

superfosfato simples, e receberam, na região das raízes, solo-inóculo contendo 300 esporos do Mix de FMA *Claroideoglopus etunicatum* (W.N. Becker & Gerd.) C. Walker & A. Schüßler (UFPE 06), *Gigaspora albida* N. C. Schenck & G. S. Sm. (UFPE 01) e *Acaulospora longula* Spain & N. C. Schenck (UFPE 21). O experimento foi mantido em telado experimental (Universidade de Pernambuco – Campus Petrolina – PE) por 225 dias e irrigado diariamente,

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial de 2 x 5: dois tratamentos de inoculação (controle não inoculado e inoculado com Mix de FMA) e cinco tratamentos de P, em cinco repetições, totalizando 50 unidades experimentais.

O extrato vegetal foi obtido depositando-se 500 mg de folhas secas picotadas em frasco âmbar (100 mL) e adicionando-se 20 mL de etanol (95 %). A maceração durou 12 dias (25 °C) ao abrigo da luz, e ao final desse período o extrato foi filtrado em gaze e re-filtrado em papel de filtro qualitativo, sendo armazenado em frasco âmbar (- 4°C) (Brito et al. 2008).

A dosagem de flavonóides totais foi feita depositando em um balão volumétrico 1 mL do extrato etanólico, 0,6 mL de ácido acético glacial, 10 mL de solução piridina:metanol (2:8 v/v) e 2,5 mL de solução etanólica de cloreto de alumínio (5 %), completando em seguida o volume final de 25 mL com água destilada. Após repouso de 30 minutos a absorbância foi medida a 420 nm, utilizando rotina para preparo da curva-padrão (Araújo et al. 2008).

Análise estatística

Os resultados foram submetidos à ANOVA, análise de regressão e as médias comparadas pelo teste de Tukey (5 %), utilizando o programa Assistat 7.6.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos diferentes níveis de P testados, a inoculação micorrízica não afetou a produção de flavonóides (**Tabela 1**). Nas plantas associadas aos FMA, a produção de flavonóides se manteve mesmo nas doses mais altas de P; por outro lado, no tratamento controle, houve redução linear na produção desses compostos (**Tabela 1**). Embora um dos mecanismos propostos para explicar o aumento da produção de compostos secundários seja a nutrição melhorada das plantas micorrizadas e fertilizadas com fósforo (Kapoor et al., 2002a), tal mecanismo parece não se

aplicar às plantas de *L. ferrea* micorrizadas e adubadas com P, com relação à concentração de flavonóides. Freitas et al. (2004) também observaram que a micorrização de *Mentha arvensis* associada à aplicação de P, reduziu os teores de mentol e a qualidade dos óleos essenciais. No entanto, Pedone-Bonfim et al. (2013) verificaram que em *Anadenathera colubrina*, planta da caatinga, houve aumento na concentração de flavonóides totais em níveis elevados de P. Para Toussaint et al. (2007), o aumento na produção de ácido rosmarínico e ácido caféico em *O. basilicum* pode ter sido influenciado tanto pelo P como mediado diretamente pelo FMA. De acordo com Nell et al. (2009), em *S. officinalis* micorrizadas não foi alterada a produção de ácido rosmarínico, enquanto o alto teor de P aumentou a concentração desse composto nas folhas. Nas condições estudadas FMA e P podem não ter influenciado a ativação das vias metabólicas produtoras de flavonóides em *L. ferrea*.

A realização de outras análises fitoquímicas em plantas micorrizadas de *L. ferrea* é necessária para verificarmos se a adubação com P influencia o aumento das concentrações de taninos, fenóis e saponinas totais, assim como a atividade antioxidante.

CONCLUSÃO

Nas condições deste ensaio, o uso combinado de P e FMA não incrementa a produção de flavonóides totais foliares em mudas de *L. ferrea*.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela concessão da bolsa de estudos e ao CNPq pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, T.A.S.; ALENCAR, N.L.; AMORIM, E.L.C. & ALBUQUERQUE, U.P. A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. *Journal Ethnopharmacology*, 120: 72-80, 2008.

ASSISTAT 7.6 beta. Registro INPI 0004051-2. <http://www.assistat.com>

BIRUEL, R. P., AGUIAR, I.B. & PAULA, R.C. Germinação de sementes de pau-ferro submetidas a diferentes condições de armazenamento, escarificação química,



temperatura e luz. Revista Brasileira de Sementes 29: 151-159, 2007.

BRITO, H.O.; NORONHA, E.P.; FRANÇA, L.M.; BRITO, L.M.O. & PRADO, S.A. Análise da composição fitoquímica do extrato etanólico das folhas de *Annona squamosa* (ATA). Revista Brasileira de Farmácia, 89: 180-184, 2008.

CARNEIRO, M.A.C; SIQUEIRA, J.O. & DAVIDE, A.C. Fósforo e inoculação com fungos micorrízicos arbusculares no estabelecimento de mudas de embaúba (*Cecropia pachystachya* Trece). Pesquisa Agropecuária Tropical, 34: 119-125, 2004.

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

CECCARELLI, N.; CURADI, M.; MARTELLONI, L.; SBRANA, C.; PICCIARELLI, P. & GIOVANNETTI, M. Mycorrhizal colonization impacts on phenolic content and antioxidant properties of artichoke leaves and flower heads two years after field transplant. Plant Soil, 335: 311-323, 2010.

COPPETA, A., LINGUA, G. & BERTA, G. Effects of three AM fungi on growth, distribution of glandular hairs, and essential oil production in *Ocimum basilicum* L. var. genovese. Mycorrhiza, 16: 485-494, 2006.

FREITAS, M.S.M., MARTINS, M.A. & VIERA, I.J.C. Produção e qualidade de óleos essenciais de *Mentha arvensis* em resposta à inoculação de fungos micorrízicos arbusculares. Pesquisa Agropecuária Brasileira 9: 887-894, 2004.

GATTAI, G.S., PEREIRA, S.V., COSTA, C.M.C., LIMA, C.E.P. & MAIA, L.C. Microbial activity, arbuscular mycorrhizal fungi and inoculation of woody plants in lead contaminated soil. Brazilian Journal of Microbiology, 42: 859-867, 2011

KAPOOR, R., GIRI, B. & MUKERJI, K.G. *Glomus macrocarpum*: a potential bioinoculant to improve essential oil quality and concentration in Dill (*Anethum graveolens* L.) and Carum (*Trachyspermum ammi* (Linn.) Sprague). World Journal of Microbiology & Biotechnology, 18: 459-463, 2002a.

KAPOOR, R., GIRI, B. & MUKERJI, K.G. Improved growth and essential oil yield and quality in *Foeniculum vulgare* mill on mycorrhizal inoculation supplemented with P-fertilizer. Bioresource Technology, 93: 307-311, 2004.

MOREIRA, F. M. S. & SIQUEIRA, J. O. Micorrizas. In: Microbiologia e bioquímica do solo. Lavras, UFLA, 2002. 625p.

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

NELL, M., VÖTSCH, M., VIERHEILIG, H., STEINKELLNER S., ZITTERL-EGLSEER, K., FRANZ, C., NOVAKA, J.. Effect of phosphorus uptake on growth and secondary metabolites of garden sage (*Salvia officinalis* L.). Journal of the Science of Food and Agriculture, 89: 1090-1096, 2009.

PEDONE-BONFIM M.V.L., LINS, M. A., COELHO, I. R., SANTANA, A. S., SILVA, F.S.B., & MAIA, L. C. Mycorrhizal technology and phosphorus in the production of primary and secondary metabolites in cebil (*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan) seedlings. Journal of the Science of Food and Agriculture, 93: 1479-1484, 2013.

RATTI, N., VERMA, H. N. & GAUTAM, S. P.. Effect of *Glomus* species on physiology and biochemistry of *Catharantus roseus*. Indian Journal of Microbiology 50: 355-360, 2010.

SAMPAIO, F.C., PEREIRA, M.S.V., DIAS, C. S., COSTA, V. C.O., CONDED, N. C.O. & BUZALAFE, M.A.R. In vitro antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. Journal of Ethnopharmacology, 124: 289-294, 2009.

SMITH, S.E. & READ D.J. Mycorrhizal symbiosis. 3rd edition. Academic Press, 2008. 787p.

SOUZA, A.B., SOUZA, L.M.S., CARVALHO, J. C. T. & MAISTRO, E.L. No clastogenic activity of *Caesalpinia ferrea* Mart. (Leguminosae) extract on bone marrow cells of Wistar rats. Genetics and Molecular Biology, 29: 380-383, 2006.

TAIZ, L. & ZEIGER, E Fisiologia vegetal. 4^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 819p.

TOUSSAINT, J. P., SMITH, F.A. & SMITH, S.E. Arbuscular mycorrhizal fungi can induce the production of phytochemicals in sweet irrespective of phosphorus nutrition. Mycorrhiza, 17: 291-297, 2007.

Tabela 1. Produção de flavonóides foliares totais (mg.g planta^{-1}) em mudas de pau-ferro associadas ou não a FMA e cultivadas em solo com níveis crescentes de P (superfosfato simples)

Tratamentos de inoculação	Níveis de P (mg.dm^{-3})					Ajuste
	3	4,8	13	31	55	
Controle	117,06 aA	69,41 bA	68,03 bA	74,38 bA	75,66 bA	$Y=228,2-153,99x$; ($R^2=0,99^{**}$)
FMA	89,47 aA	63,40 bA	75,81 abA	65,57 abA	75,79 abA	Ns

Ns: não significativo; ** ($p < 0,01$).

Médias seguidas da mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem pelo teste de Tukey (5 %).