

Uso de *Acaulospora longula* maximiza a concentração de flavonoides totais na casca do caule de pau-ferro (*Libidibia ferrea*), em condições de campo⁽¹⁾

Emanuela Lima dos Santos⁽²⁾, Francineyde Alves da Silva⁽³⁾; Fábio Sérgio Barbosa da Silva⁽⁴⁾

- (1) Trabalho executado com recursos da Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE)
(2) Mestranda em Biologia Celular e Molecular Aplicada; Bolsista CAPES; Universidade de Pernambuco; Recife; Pernambuco; email: emanuela_lima07@hotmail.com.
(3) Professora Adjunto; Universidade de Pernambuco; email: francineydes71@gmail.com.
(4) Professor Adjunto; Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada – Universidade de Pernambuco; email: fabio.barbosa@pesquisador.cnpq.br

RESUMO: *Libidibia ferrea*, conhecida como pau-ferro, é bastante utilizada pela população, devido às propriedades terapêuticas que são conferidas pela presença de compostos bioativos em diversas partes da planta. A inoculação de fungos micorrízicos arbusculares em pau-ferro pode melhorar a produção de metabólitos, como flavonoides foliares. Porém, não há registros da produção desses biocompostos na casca do caule de *L. ferrea* micorrizada. Assim, o objetivo do trabalho foi verificar se a inoculação favorece o acúmulo de flavonoides na casca do caule de pau-ferro, em condições de campo. Foram coletadas cascas do caule de *L. ferrea*, inoculadas ou não com FMA, estabelecida em campo por 20 meses. O delineamento foi em blocos casualizado, com quatro tratamentos de inoculação: controle e inoculados com *Acaulospora longula*, *Claroideoglossum etunicatum* e *Gigaspora albida*, em seis repetições. Plantas inoculadas com *A. longula* concentraram mais flavonoides totais em relação ao controle. A tecnologia empregando *A. longula* é alternativa para incrementar os teores de flavonoides totais caulinares.

Termos de indexação: FMA, biocompostos.

INTRODUÇÃO

Libidibia ferrea (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz var. *ferrea*, é uma leguminosa arbórea da família Fabaceae (Córdula et al., 2014), conhecida como pau-ferro, jucá ou jucazeiro (Maia-Silva et al., 2012). Tal espécie é utilizada pela população no tratamento de doenças respiratórias, gastrointestinais, sanguíneas, entre outras. Nesse sentido, diversas partes do vegetal são utilizadas, como as folhas, a casca do caule, o fruto e as raízes (Gonzalez, 2005; Agra et al., 2007). Os benefícios relatados na medicina popular são atribuídos à presença de compostos bioativos, como taninos, fenóis, saponinas, antraderivados, destacando-se os flavonoides (Gonzalez, 2005; Silva et al., 2014b; Ferreira, 2012).

Os flavonoides são compostos fenólicos derivados de duas rotas do metabolismo secundário vegetal: a do ácido chiquímico e a do ácido malônico

(Vermerris & Nilcholson, 2006; Taiz & Zeiger, 2013). Esses compostos apresentam propriedades farmacológicas, como antiinflamatório, antiviral e antioxidante (Zuanazzi & Montanha, 2004).

Uma alternativa para otimizar a produção desses biocompostos é o uso da tecnologia micorrízica (Araim et al., 2009). Tal sistema utiliza os fungos micorrízicos arbusculares (FMA), que beneficiam as espécies vegetais, pois favorecem o crescimento (Silva et al., 2004), melhoram a absorção de nutrientes (Gupta et al., 2001; Nisha & Rajeshkumar, 2010), alteram a fisiologia vegetal (Gupta et al., 2001; Karadiannidis et al., 2011), além de incrementarem a produção de metabólitos primários e secundários (Kapoor et al., 2007; Damoradan et al., 2010).

Em plantas da caatinga, o aumento na produção de flavonoides foliares foi registrado (Pedone-Bonfim et al., 2013; Silva et al., 2014a). No entanto, não há relatos sobre a influência de FMA na otimização da produção dessas biomoléculas na casca do caule de pau-ferro.

Diante disso, o objetivo do trabalho foi verificar se a inoculação micorrízica favorece o acúmulo de flavonoides na casca do caule de pau-ferro, em condições de campo.

MATERIAL E MÉTODOS

Para avaliação, utilizou-se experimento que foi montado no início de fevereiro de 2013 e que está sendo mantido no Campo Experimental do Laboratório de Enzimologia e Fitoquímica Aplicada à Micologia-LEFAM, UPE *Campus* Petrolina, e as avaliações conduzidas após 20 meses da montagem do experimento.

Preparo da área experimental:

Na montagem do experimento, a área foi arada, gradada e coveada (40 x 40 x 40 cm), sendo depositados em cada cova 5 litros de vermicomposto e 150 g de superfosfato simples. Utilizou-se espaçamento de 5 m entre plantas x 5 m na fileira (densidade de 96 plantas) e a irrigação foi feita por gotejamento semi-automático (8,4 L H₂O planta⁻¹ h⁻¹) em dias alternados. Cada parcela foi constituída por 4 plantas.

Produção da mudas de *Libidibia ferrea* inoculadas ou não com FMA:

Mudas de pau-ferro foram produzidas em solo contendo 1,2 Kg de solo + 5 % de vermicomposto e inoculadas ou não com solo-inóculo contendo 200 esporos de cada FMA (*Claroideoglossum etunicatum*, *Gigaspora albida* e *Acaulospora longula*). Após 225 dias em telado experimental, em fevereiro de 2013, as mudas de pau-ferro foram transplantadas ao campo, com área total de 2.900 m², situado na Universidade de Pernambuco *Campus Petrolina*.

Inóculos de FMA

Foram testados três isolados de FMA: *Gigaspora albida* N.C. Schenck & G.S. Sm. (UFPE 01), *Acaulospora longula* Spain & N.C. Schenck (UFPE 21) e *Claroideoglossum etunicatum* (W. N. Becker & Gerdemann) C. Walker & A. Schussler (UFPE 06). Tais fungos foram cedidos pelo Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco; os FMA foram multiplicados em solo com 10% de vermicomposto, tendo painço (*Panicum miliaceum* L.) hospedeiro; o inóculo produzido foi armazenado a 4 °C até o momento da utilização.

Delineamento experimental

Em blocos casualizados com quatro tratamentos de inoculação (plantas pré-inoculadas com *C. etunicatum*, plantas pré-inoculadas com *G. albida*, plantas pré-inoculadas com *A. longula* e plantas não inoculadas – controle), em 6 repetições.

Preparação do extrato das plantas:

As cascas do caule foram coletadas, após 20 meses da montagem do experimento, e secas em estufa (45 °C por 3 dias). A partir de 500 mg de cascas do caule, foi preparado extrato por maceração, utilizando metanol 70 %; as cascas foram maceradas no extrator metanólico por 10 dias a 20 °C (Brito et al., 2008). O extrato foi filtrado em gaze e refiltrado em papel filtro qualitativo, sendo armazenado em frasco âmbar em *freezer*.

Flavonoides totais

Para quantificação dos flavonoides foram colocados 1 mL do extrato metanólico, 0,6 mL de ácido acético glacial, 10 mL de solução de piridina/metanol (2:8 v:v) e 2,5 mL de solução metanólica de cloreto de alumínio (5 % v/p) em um balão volumétrico de 25 mL e o volume completado com água destilada. Após 1800 segundos em repouso foi feita a leitura no espectrofotômetro (420 nm), utilizando-se rotina para curva padrão (Araújo et al., 2008).

Análise estatística

Os dados foram submetidos à ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey (5 %), utilizando-se o programa Assistat (7.7).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A inoculação com *A. longula* e com *C. etunicatum* foi eficiente em aumentar a concentração de flavonoides em 235,93 % e 185,53 %, respectivamente, em relação ao controle (**Tabela 1**). Resultados similares foram documentados por Silva et al. (2014a), em casa de vegetação, em mudas de *L. ferrea* micorrizadas. Entretanto, Lima (2014) não observou aumento na produção de flavonoides nas folhas de mudas micorrizadas de *Commiphora leptophloeos* (Mart.) J.B. Gillett e de ingazeira (*Inga vera* Willd), em relação ao controle.

Tabela 1. Concentração de flavonoides totais na casca do caule de plantas de pau-ferro, inoculadas ou não com FMA, 20 meses após inoculação, em Petrolina, PE

Tratamentos de inoculação	Taninos totais (mg g planta ⁻¹)
Controle	156,08c
<i>Acaulospora longula</i>	524,20a
<i>Claroideoglossum etunicatum</i>	445,66b
<i>Gigaspora albida</i>	177,75c

Médias (n= 5) seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem pelo teste de Tukey (5 %).

Outras plantas da caatinga, em fase de muda, tiveram aumento na produção de compostos bioativos nas folhas em função da inoculação com FMA, como *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan (Pedone-Bonfim et al., 2013) e *Myracodruon urundeuva* Allemão (Oliveira et al., 2013), como registrado para o casca do caule de pau-ferro (**Tabela 1**)

Maior concentração de flavonoides em plantas micorrizadas pode ter relação com alguns mecanismos, como por exemplo, aumento no aporte nutricional das plantas (Selvaraj et al., 2009), ativação de enzimas-chave das rotas que produzem esses biocompostos e transcrição dos genes envolvidos na produção dessas enzimas (Walter et al., 2000; Zhang et al., 2013).

O cultivo de plantas de pau-ferro inoculadas com *A. longula* pode ser alternativa para melhorar a qualidade da fitomassa, considerando a maior concentração de flavonoides importantes para a indústria farmacêutica.

CONCLUSÃO

- O uso de *A. longula* é eficiente em aumentar a produção de flavonoides na casca do caule das plantas de pau-ferro, em condições de campo.

AGRADECIMENTOS

À FACEPE e à CAPES.

REFERÊNCIAS

ARAIM, G.; SALLEM, A.; ARNASON, J.T.; CHAREST, C. Root colonization by arbuscular mycorrhizal (AM) fungus increases growth and secondary metabolism of purple coneflower, *Echinacea purpurea* (L.) Moench. *Agricultural and Food Chemistry*, 57: 2255-2258, 2009.

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 de local knowledge. *Journal of Ethnopharmacology*, 120: 72-80, 2008.

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.

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

DAMORADAN, P.N.; UDAIYAN, K.; JEE, H.J. Biochemical changes in cotton plants by arbuscular mycorrhizal colonization. *Research in Biotechnology*, 1: 6-14, 2010.

FERREIRA, M.R.A. Triagem antifúngica de extratos obtidos de espécies vegetais do nordeste brasileiro. Natal. Dissertação [Mestrado em Ciências Farmacêuticas] Universidade Federal do Rio Grande do Norte; 2012.

GUPTA, M.L.; PRASAD, A.; RAM, M.; KUMAR, S. Effect of the vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) fungus *Glomus fasciculatum* on the essential oil yield related characters and nutrient acquisition in the crops of different cultivars of menthol mint (*Mentha arvensis*) under field conditions. *Bioresource Technology*, 81: 77-79, 2001.

GONZALEZ, F.G. Estudo farmacognóstico e farmacológico de *Caesalpinia ferrea* Martius. Tese [Doutorado em Fármacos e medicamentos]- Universidade de São Paulo, 2005.

KAPOOR, R.; CHAUDHARY, V.; BHATNAGAR, A.K. Effects of arbuscular mycorrhiza and phosphorus application on artemisinin concentration in *Artemisia annua* L. *Mycorrhiza*, 17: 581-587, 2007.

KARAGIANNIDIS, N.; THOMIDIS T.; LAZARI, D.; PANOU-FILOTHEOU, E.; KARAGIANNIDOU, C. Effect of three Greek arbuscular mycorrhizal fungi in improving the growth, nutrient concentration, and production of essential

oils of oregano and mint plants. *Scientia Horticulturae*, 129: 329-334, 2011.

LIMA, C. S. Tecnologia micorrízica para maximização da produção de biomoléculas foliares em mudas de umburana-de-cambão e de ingazeira. Dissertação [Mestrado em biologia celular e molecular] Universidade de Pernambuco, 2014.

MAIA-SILVA, C.; SILVA, C.I.; HRNCIR, M.; QUEIROZ, R.T.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. Jucazeiro. In: Guia de Plantas visitadas por abelhas na caatinga. 1.ed. Fortaleza: Editora Fundação Brasil Cidadão, 2012. p. 43-45.

MOREIRA, F.M.S. & SIQUEIRA, G.O. Micorrizas- Microbiologia e bioquímica do solo. Lavras, 2002.

NISHA, M.C. & RAJESHKUMAR, S. Influence of Arbuscular mycorrhizal fungi on Biochemical changes in *Wedilla Chinensis* (Osbeck) Merril. *Ancient Science*, 3: 26-29, 2010.

OLIVEIRA, M.S.; CAMPOS, M.S.; ALBUQUERQUE, U.P.; SILVA, F.S.B. Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) affects biomolecules content in *Myracrodruon urundeuva* seedlings. *Industrial Crops and Products*, 50: 244-7, 2013.

PEDONE-BONFIM, M.V.L.; LINS, M.A.; COELHO, I.R.; SANTANA, A.; 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.

SELVARAJ, T.; NISHA, M.C.; RAJESHKUMAR, S. Effect of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi on some growth parameters and phytochemical constituents of *Pogostemon patchouli* Pellet. *Maejo International Journal Science and Technology*, 3: 222-234, 2009.

SILVA, M.A.; CAVALCANTE, U.M.T.; SILVA, F.S.B.; SOARES, S.A.G.; MAIA, L.C. Crescimento de mudas de maracujazeiro-doce (*Passiflora alata* Curtis) associadas a fungos micorrízicos arbusculares (Glomeromycota). *Acta Botanica Brasilica*, 18: 981-985, 2004.

SILVA, F.A.; SILVA, F.S.B.; MAIA, L.C. Biotechnical application of arbuscular mycorrhizal fungi used in the production of foliar biomolecules in ironwood seedlings [*Libidibia ferrea* (Mart. Ex Tul.) L. P. Queiroz var. *ferrea*]. *Journal of Medicinal Plant Research*, 8: 814-819, 2014a.

SILVA, F.A.; FERREIRA, M.R.A.; SOARES, L.A.L.; SAMPAIO, E.V.S.B.; SILVA, F.S.B.; MAIA, L.C. Arbuscular mycorrhizal fungi increase gallic acid production in leaves of Field grown *Libidibia ferrea* (Mart. Ex Tul.) L.P. Queiroz. *Journal of Medicinal Plant Research*, 8: 1110-1115, 2014b.

TAIZ, L. & ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 954p.



VERMERRIS, W. & NICHOLSON, R. Phenolic compound biochemistry, Springer, 2006. p. 267

WALTER, M.H.; FESTER, T.; STRACK, D. Arbuscular mycorrhizal fungi induce the non-mevalonate methylerythritol phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis correlated with accumulation of the 'yellow pigment' and other apocarotenoids. *The Plant Journal*. 21:571-578, 2000.

ZHANG, R-Q.; ZHU, H-H.; ZHAO, H-Q.; YAO, Q. Arbuscular mycorrhizal fungal inoculation increases phenolic synthesis in clover roots via hydrogen peroxide, salicylic acid and nitric oxide signaling pathways. *Journal of Plant Physiology*, 170:74–9, 2013.

ZUANAZZI, J.A.S & MONTANHA, J.A. Flavonoides. In: SIMOES, C.M.O; SCHENKEL, E.P; GOSMAN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETRONICK, P.R. org. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. 5ed. Florianópolis: UFSC, 2004.p.601-603.