INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA
PROGRAMA DE PÓS-GADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DE FLORESTAS TROPICAIS

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, MORFOFUNCIONAL E BIOTECNOLÓGICA DE ESPÉCIES DO GÊNERO *CARAPA*

GLEISSON DE OLIVEIRA NASCIMENTO

Manaus, Amazonas
Agosto, 2017

GLEISSON DE OLIVEIRA NASCIMENTO

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, MORFOFUNCIONAL E BIOTECNOLÓGICA DE ESPÉCIES DO GÊNERO *CARAPA*

ORIENTADOR: Dr. José Francisco de Carvalho Gonçalves

Coorientador: Dr. Alberdan Silva Santos

Tese apresentada ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências de Florestas Tropicais.

Manaus, Amazonas

Agosto, 2017

N244 Nascimento, Gleisson de Oliveira

Caracterização molecular, morfofuncional e biotecnológica de espécies do gênero *Carapa* / Gleisson de Oliveira Nascimento. --- Manaus: [s.n.], 2017.
163 f.: il.

Tese (Doutorado) --- INPA, Manaus, 2017.
Orientador: José Francisco de Carvalho Gonçalves
Coorientador: Alberdan Silva Santos
Área de concentração: Silvicultura Tropical

1. Andiroba . 2. Marcadores moleculares . 3. Óleos vegetais . I. Título.

CDD 583.78

Sinopse:

Atributos moleculares, morfofuncionais e atividade antifúngica como possibilidade de aplicação biotecnológica de espécies do gênero *Carapa* foram investigados com objetivo de identificar diferenças interespecíficas deste grupo taxonômico. Diante dessa abordagem, novas perspectivas conceituais e aplicadas foram apresentadas e discutidas para espécies de Carapas.

Palavras-chave: Andiroba, marcadores moleculares, metabólitos primários, óleos vegetais, perfil lipidômico e sementes florestais.

GLEISSON DE OLIVEIRA NASCIMENTO

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, MORFOFUNCIONAL E BIOTECNOLÓGICA DE ESPÉCIES DO GÊNERO *CARAPA*

Tese apresentada ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências de Florestas Tropicais.

Aprovada em 28 de agosto de 2017.

Dra. Patrícia Melchionna Albuquerque
(UEA)

Dra. Doriane Picanço Rodrigues
(UFAM)

Dr. Charles Roland Clement
(INPA)

Dra. Veridiana Vizoni Scudeller
(UFAM)

Dr. Ary Vieira de Paiva
(UFAC)

Dr. Alberdan Silva Santos
(Coorientador)

Dr. José Francisco de Carvalho Gonçalves
(Orientador)

Ao progresso da Ciência e Conservação da Natureza. Às memórias póstumas da minha querida avó Marina Alves de Oliveira,

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA pela oportunidade de finalização do curso de Doutorado e à contribuição ao avanço da pesquisa científica na Amazônia;

À Capes – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, expresso meus agradecimentos pela concessão de bolsas de estudos e apoio ao desenvolvimento científico e tecnológico brasileiro;

Agradeço também a Universidade Federal do Acre – UFAC, pelo apoio institucional para finalizar essa jornada de trabalho intensa, especificamente, expresso meus agradecimentos aos professores do curso de bacharelado em Engenharia Florestal desta instituição pela contribuição na minha formação acadêmica e pela boa recepção que me deram como membro da equipe docente;

Agradeço a Universidade Federal do Amazonas – UFAM pela disponibilidade de laboratórios e possibilidades de parcerias para o desenvolvimento deste trabalho, e na oportunidade, agradeço especialmente o Laboratório de Evolução Aplicada – LEA, que foi onde concentrei grande parte dos esforços para realização desta tese.

Aos meus pais, Francisco das Chagas dos Santos Nascimento e Maria de Fátima Alves de Oliveira, pela educação e apoio nessa jornada, e também agradeço meus irmãos Maria Thailine de Oliveira Nascimento, Luan de Oliveira Nascimento e Ian de Oliveira Nascimento pelo apoio e carinho, e todos os amigos que participaram direta ou indiretamente de mais essa conquista;

Meus agradecimentos ao Doutor Josimar Batista Ferreira pelo apoio inicial, incentivo e por acreditar no meu potencial;

Agradeço também a Sabrina Silva de Oliveira pelo apoio, carinho e companheirismo;

Agradecimento também aos amigos Pedro de Albuquerque Ferraz, Vinícius Fernandes de Souza e Patrícia Farias Souza que foram pessoas que convivi diretamente na cidade de Manaus. Agradeço a Josiane Celerino Carvalho pela força e ajuda nos experimentos, pois é uma pessoa que sempre esteve disposta ajudar todos os amigos do laboratório, sempre incentivando e somando forças na execução dos trabalhos;

Na oportunidade faço um agradecimento aos professores do Programa de Pós Graduação em Ciências de Florestas Tropicais, em especial ao meu orientador Prof. Doutor José Francisco de Carvalho Gonçalves pela paciência, confiar no meu esforço e apoiar

plenamente na condução do trabalho. E também agradeço meu coorientador Prof. Doutor Alberdan Silva Santos, professor Doutor da Universidade Federal do Pará – UFPA, pela compreensão e apoio no desenvolvimento desta pesquisa;

Também faço agradecimento para o Senhor Alberto Fialho Neves (Seu Cunha), Jair Sousa Garcia, Rosineide da Paz Machado, Diego Pereira de Souza, Rafaela Oliveira da Silva e a toda equipe do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal do INPA pela ajuda na execução e discussões filosóficas no decorrer dos trabalhos;

Estes são os meus sinceros agradecimentos a todos que de alguma maneira contribuíram durante as atividades deste trabalho.

Muito obrigado.

“Os fenômenos humanos são biológicos em suas raízes, sociais em seus fins e mentais em seus meios”.

Jean Piaget

RESUMO GERAL

Espécies vegetais pertencentes à família botânica Meliaceae, especificamente as incluídas no gênero *Carapa*, são importantes fontes de produtos primários, apresentam madeira de excelente qualidade e os óleos extraídos das sementes são amplamente utilizados na medicina tradicional e fabricação de cosméticos. Não obstante sejam consideradas como espécies diferentes, ainda há incertezas na definição autêntica das espécies pertencentes a esse grupo, principalmente, aquelas que apresentam similaridade morfológica. A precisa identificação corresponde a um passo importante para direcionar diferentes tipos de usos para as espécies, sobretudo no seu ambiente de crescimento. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo investigar a base molecular, morfofuncional, bioquímica e potenciais aplicações biotecnológicas em espécies vegetais do gênero *Carapa*, visando a obter informações no sentido de confirmar ou não as diferenças existentes entre espécies crípticas pertencentes a esse grupo taxonômico. Amostras de folhas, sementes e material fértil de espécies do gênero *Carapa* (*Carapa guianensis* e *C. vasquezii*) foram coletadas em diferentes regiões (Acre, Rondônia e Amazonas) para análises de DNA genômico, óleos, carboidratos e nutrientes minerais. Neste trabalho, realizou-se a caracterização molecular com a utilização de *primers* cloroplastídicos e nuclear (Psba-Trnh, Rbcl e ITS, respectivamente). Além disso, o perfil lipidômico foi caracterizado para espécies coletadas nas diferentes localidades consideradas neste estudo. Um estudo da mobilização das reservas primárias foi realizado no intuito de investigar as diferentes estratégias realizadas pelas espécies durante os eventos de germinação e crescimento inicial de plântulas. Adicionalmente, a aplicabilidade dos óleos em cultivo *in vitro* foi testada para espécies vegetais do gênero *Carapa*, no intuito de verificar a viabilidade da sua utilização no controle de fungos fitopatogênicos. Além disso, verificou-se a possibilidade de estabelecer protocolos de propagação *in vitro* a partir de embriões zigóticos e segmentos nodais das espécies. Portanto, neste trabalho determinou-se, por meio de marcadores moleculares e perfil lipidômico, que as diferentes unidades taxonômicas apresentam tendência de formação de grupos distintos, e que os grupos podem ser definidos, também, pelas procedências das amostras coletadas, provavelmente, pela influência do ambiente de crescimento (Capítulo I). As espécies do gênero *Carapa* estudadas apresentam divergências morfofuncionais que estão associadas, principalmente, às características morfológicas em sementes (comprimento do hilo), ápice das folhas e teores de metabólitos primários (carboidratos, lipídeos e proteínas) (Capítulo II). Quanto às diferentes estratégias de mobilização de reservas primárias e nutrientes, no geral, *C. guianensis* apresentou maiores valores para os teores de carboidratos, lipídeos, proteínas solúveis, macro e micro nutrientes. Em contrapartida, verificou-se menor variação de mobilização dos metabólitos primários em *C. vasquezii*, durante os estádios analisados (Capítulo III). Os percentuais de inibição do crescimento micelial de fungos fitopatogênicos foram promissores, e os maiores resultados foram atribuídos às concentrações acima de 62,5 µL/mL de óleos extraídos de sementes de *C. vasquezii* (Capítulo IV). O cultivo *in vitro* de *C. guianensis* e *C. vasquezii* possibilitou a obtenção de plântulas completas utilizando embriões zigóticos e a formação de calos, a partir da utilização de segmentos nodais (Capítulo V). Diante do exposto, os resultados sugerem algumas divergências quanto às características moleculares e morfofuncionais em espécies do gênero *Carapa*. A utilização de marcadores moleculares e químicos podem auxiliar na identificação e indicar a procedência das amostras coletadas. Os óleos extraídos de sementes dessas espécies apresentaram inibição do crescimento micelial fúngico. A propagação *in vitro* de Carapas tem potencial para produção de clones selecionados, havendo ainda a necessidade de aprimoramento do protocolo quanto à assepsia dos explantes.

Palavras-chave: Andiroba, marcadores moleculares, metabólitos primários, óleos vegetais, perfil lipidômico e sementes florestais.

ABSTRACT

Plant species belonging to the Meliaceae botanical family, specifically those of the *Carapa* genus, are important sources of primary products, presenting excellent quality wood and the oils extracted from the seeds are widely used in traditional medicine and in the manufacture of cosmetics. Despite considered as different species, there are still uncertainties in defining the plant species belonging to this group, especially those with morphological similarities. The precise identification is an important step to establish different types of uses for this species, especially in their growth environment. Thus, the objective of this study was to investigate the molecular, morpho-functional and biochemical bases, as well as potential biotechnological applications for plant species of the *Carapa* genus, aiming to obtain information in order to confirm or not the differences between cryptic species belonging to this taxonomic group. Leaf, seed and fertile *Carapa* (*Carapa guanensis* and *C. vasquezii* species) material samples were collected from different Amazon regions (Acre, Rodônia and Amazonas) for analyzing genomic DNA, oils, carbohydrates and mineral nutrients. In this work, molecular characterization was performed using two chloroplastidics and nuclear primers (Psba-trnH, rbcL and ITS, respectively). In addition, the lipid profile was characterized for plant species collected in the different locations considered in this study. A study of the primary reserve mobilization was conducted to investigate the different strategies of the species during germination and initial seedling growth. The applicability of the oils in *in vitro* cultivation was tested for plant species of the *Carapa* genus to verify the feasibility of its use in the control of phytopathogenic fungi. In addition, the establishment of *in vitro* propagation protocols from zygotic embryos and nodal segments of the species was possible. Therefore, it was proven by molecular markers and lipid profile that the different taxonomic units have a tendency to form distinct groups, and that the groups can also be defined by the origin of the samples, probably because of the influence of the growth environment (Chapter I). The studied species of the *Carapa* genus present morpho-functional divergences that are mainly associated to the morphological characteristics of seeds (hilum length), leaf apex and content of primary metabolites (carbohydrates, lipids and proteins) (Chapter II). Regarding the different strategies of primary and nutrient reserve mobilization, in general, *C. guianensis* showed higher values for carbohydrate, lipid, soluble protein, and macro and micro nutrient contents. In contrast, there was greater stability of primary metabolite mobilization in *C. vasquezii* during the analyzed stages (Chapter III). The percentages of mycelial growth inhibition of phytopathogenic fungi were promising, given that the highest results were attributed to concentrations above 62.5 μL/mL of oils extracted from *C. vasquezii* seeds (Chapter IV). The *in vitro* cultivation of *C. guianensis* and *C. vasquezii* made possible the obtaining of complete seedlings using zygotic embryos and callus formation using nodal segments (Chapter V). The results suggest a few divergences regarding the molecular and morpho-functional characteristics in plant species of the *Carapa* genus. The use of molecular and chemical markers can aid in the identification and indication of the origin of the samples. The oils extracted from seeds of these species showed inhibition of fungal mycelial growth. The *in vitro* propagation of Carapas has potential for the production of selected clones, with the need to improve the protocol regarding asepsis of the explants.

Keywords: Andiroba, molecular markers, primary metabolites, vegetable oils, lipid profile and forest seeds.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS xi
LISTA DE TABELAS xv
1 INTRODUÇÃO GERAL 17
2 HIPÓTESES 21
3 OBJETIVOS 22
3.1 Geral 22
3.2 Específicos 22
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 23
CAPÍTULO 1 Divergência molecular em espécies do gênero *Carapa* utilizando perfil lipidômico e marcadores DNA *barcoding* 26
CAPÍTULO 2 Divergência morfométrica e aspectos do metabolismo primário em espécies do gênero *Carapa* (Meliaceae) 59
CAPÍTULO 3 Dinâmica da mobilização de reservas primárias durante a germinação e crescimento inicial de plântulas em espécies do gênero *Carapa* na Amazônia Central 90
CAPÍTULO 4 Perfil lipidômico do óleo de espécies do gênero *Carapa* e implicações sobre o crescimento micelial e germinação de esporos de fungos fitopatogênicos 120
CAPÍTULO 5 Cultivo *in vitro* de embriões zigóticos e segmentos nodais de *Carapa guianensis* Aublet e *Carapa vasquezii* Kenfack de ocorrência na Amazônia Central 142
CONCLUSÃO GERAL 162

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1: Localização das áreas de coletas de folhas e sementes na região Amazônica para extração de DNA e análise do perfil lipidômico de plantas do gênero *Carapa*. 32

Figura 2: Diagrama de *Venn* indicando o número de moléculas do perfil lipodômico do óleo de espécies do gênero *Carapa*, de acordo com as regiões de coleta. Cg – AC: *Carapa guianensis* de procedência do Acre; Cg – AM: *C. guianensis* de procedência do Amazonas; Cv – AM: *C. vasquezii* de procedência do Amazonas. 43

Figura 3: Análise *barcoding gap* da distribuição do número absoluto de identificações falso positivas (cinza claro) e falso negativas (cinza escuro) em intervalo de 0,1 a 0,9% de probabilidade pela distância K2P. A: *Barcoding gap* para o gene psbA-trnH; B: *Barcoding gap* para o gene rbcL. 49

Figura 4: Reconstrução da árvore filogenética considerando duas unidades taxonômicas pertencentes ao gênero *Carapa* pelo método *Neighbor-Joining* e distância K2P de Kimura. 50

Figura 5: Diversidade de haplótipos de espécies do gênero *Carapa* na região Amazônica..... 53

CAPÍTULO 2

Figura 1: Localização das áreas de coleta de sementes de espécies do gênero *Carapa*. 63

Figura 2: Material botânico utilizado como fonte de caracterização das espécies do gênero *Carapa*. 64

Figura 3: Caracterização morfológica de folhas (A), flores (B), frutos (C) e sementes (D) em *Carapa guianensis* Aulb. 76

Figura 4: Caracterização morfológica de folhas (A), flores (B), frutos (C) e sementes (D) em *Carapa vasquezii* Kenfack..... 77

Figura 5: Análise de Componentes Principais (PCA) de variáveis morfométricas considerando os valores médios para 10 sementes de 20 matrizes pertencentes à espécie *Carapa guianensis* (10) e *C. vasquezii* (10) que ocorrem na Reserva Adolpho Ducke, Manaus, Amazonas. 78

Figura 6: Teor de reservas primárias (lipídeos, açúcares solúveis, amido e proteínas) – A e teor de umidade – B em sementes de duas espécies do gênero *Carapa*.....79
Figura 7: Agrupamento utilizando a análise de cluster por meio da matriz de distância com o método de UPGMA (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages*) relacionando as variáveis teor de lipídeos, amido, açúcares solúveis e massa seca das sementes para duas espécies do gênero *Carapa*.....82
Figura 8: Análise dos Componentes Principais (PCA) considerando as variáveis carboidratos (amido e açúcares solúveis), teor de lipídeos, carbono, potássio, zinco, fósforo, cálcio, ferro, manganês a partir da massa seca de sementes de duas espécies de Carapa (Cg: *C. guianensis* e Cv: *C. vasquezii*).....84

CAPÍTULO 3

Figura 1: Localização da área de coleta de sementes de espécies do gênero *Carapa*, Manaus, Amazonas, Brasil.....95
Figura 2: Estádios da germinação e crescimento inicial de plântulas com destaque para os eventos pré e pós germinativos.....96
Figura 3: Acúmulo de água em função do tempo de imersão das sementes (A) e germinação acumulada (B) de *C. guianensis* e *C. vasquezii* coletadas na Reserva Florestal Adolpho Ducke.....104
Figura 4: Estádios da germinação e crescimento inicial de plântula de *C. guianensis* destacando-se cada estrutura - te: tegumento; hi: hilo; rp: raiz primária; pc: pecíolo cotiledonar; rs: raiz secundária; pl: plúmula; ep: epicótilo; ca: catáfilo; eo: eofilo.....105
Figura 5: Estádios da germinação e crescimento inicial de plântula de *C. vasquezii* destacando-se cada estrutura - te: tegumento; hi: hilo; rp: raiz primária; pc: pecíolo cotiledonar; rs: raiz secundária; pl: plúmula; ep: epicótilo; ca: catáfilo; eo: eofilo.....106
Figura 6: Dinâmica da mobilização de reservas do metabolismo primário durante a germinação e crescimento inicial de plântulas de *C. guianensis* e *C. vasquezii*. ...107
Figura 7: Perfis proteicos dos diferentes estádios da germinação e crescimento inicial de plântulas de *C. guianensis* e *C. vasquezii* na ausência e presença de *β*-mercaptoetanol. 110

Figura 8: Dinâmica da atividade enzimática durante a germinação e crescimento inicial de plântulas de *C. guianensis* e *C. vasquezii*. 111
Figura 9: Dinâmica da mobilização de macronutrientes durante a germinação e crescimento inicial de plântulas de *C. guianensis* e *C. vasquezii*. 113
Figura 10: Dinâmica da mobilização de micronutrientes durante a germinação e crescimento inicial de plântulas de *C. guianensis* e *C. vasquezii*. 114

CAPÍTULO 4

Figura 1: Local de coleta de sementes para as análises da atividade antifúngica de óleos de duas espécies do gênero *Carapa*. Reserva Florestal Adolpho Ducke, Manaus, Amazonas, Brasil. 123
Figura 2: Perfil lipidômico das principais substâncias encontradas no óleo de *Carapa guianensis* Aubl. por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas. 130
Figura 3: Perfil lipidômico das principais substâncias encontradas no óleo de *Carapa vasquezii* Kenfack por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas. 132
Figura 4: Diagrama de *Venn* com indicação do número de substâncias compartilhadas dos óleos entre as diferentes espécies do gênero *Carapa*. 133
Figura 5: Efeito de diferentes dosagens de óleos de espécies do gênero *Carapa* sobre o crescimento fúngico de espécies fitopatogênicas. 135
Figura 6: Germinação de esporos fúngicos submetidos à ação de óleos de *Carapa*. 137

CAPÍTULO 5

Figura 1: Local de coleta de sementes para o ensaio de cultivo *in vitro* de embriões zigóticos e segmentos nodais de duas espécies do gênero *Carapa*. 146
Figura 2: Protocolo para o cultivo *in vitro* de embriões zigóticos e segmentos nodais de duas espécies do gênero *Carapa*. 147
Figura 3: Número médio de embriões germinados de *C. guianensis* (Cg) e *C. vasquezii* (Cv) em meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962). 149
Figura 4: Crescimento da raiz primária sob o efeito de diferentes dosagens de reguladores de crescimento em *C. guianensis* (Cg) e *C. vasquezii* (Cv). 151

Figura 5: Raiz primária em cultivos *in vitro* de embriões zigóticos submetidos a diferentes concentrações de reguladores de crescimento. 152
Figura 6: Crescimento da parte aérea de *Carapa guianensis* (Cg) e *C. vasquezii* (Cv) sob o efeito de diferentes dosagens de hormônios indutores do crescimento. 153
Figura 7: Ajuste da probabilidade de surgimento da parte aérea (epicótilo) em função do crescimento da raiz primária. A: *C. guianensis*; B: *C. vasquezii*. 154
Figura 8: Número de raízes secundárias sob o efeito de diferentes dosagens de reguladores de crescimento em *C. guianensis* (Cg) e *C. vasquezii* (Cv). 155
Figura 9: Plantas completas cultivadas *in vitro* utilizando meio de cultivo MS suplementado com reguladores de crescimento. A: *C. guianensis*. B: *C. vasquezii*. 156
Figura 10: Cultivo *in vitro* de segmentos nodais de duas espécies do gênero *Carapa* utilizando diferentes dosagens de reguladores de crescimento. 158

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1: Perfil lipidômico do óleo de espécies do gênero *Carapa* de diferentes procedências da região Amazônica, Brasil. 37

Tabela 2: Compostos químicos presentes no óleo extraído de sementes de espécies do gênero *Carapa* de amostras provenientes de dois locais de coleta da Amazônia (Acre e Amazonas). 44

Tabela 3: Análise da diversidade genética de sete (7) povoamentos de *C. guianensis* e *C. vasquezii* que ocorrem na Amazônia utilizando dois marcadores moleculares (psbA-trnH + rbcL). 47

Tabela 4: Análise de Variância Molecular (AMOVA) para sete (7) povoamentos de *C. guianensis* e *C. vasquezii* que ocorrem na Amazônia utilizando dois marcadores moleculares (psbA-trnH + rbcL). 48

Tabela 5: Análise de Variância Molecular (AMOVA) para sete (7) povoamentos de *C. guianensis* e *C. vasquezii* que ocorrem na Amazônia utilizando a região psbA-trnH. 52

CAPÍTULO 2

Tabela 1: Resultados das análises químicas de solo do ambiente de crescimento, folhas e sementes de matrizes de *C. guianensis* e *C. vasquezii* coletados nos estados do Acre e Amazonas, Brasil. 67

Tabela 2: Valores médios para variáveis morfométricas e massa úmida em sementes e frutos de espécies do gênero *Carapa*. 75

Tabela 3: Perfil lipidômico dos compostos majoritários do óleo extraído de sementes de duas espécies do gênero *Carapa* de amostras provenientes de diferentes regiões da Amazônia. 81

CAPÍTULO 3

Tabela 1: Características morfométricas dos estádios germinativos em espécies do gênero *Carapa*. 97

CAPÍTULO 4

Tabela 1: Perfil lipidômico dos compostos majoritários presentes no óleo de *Carapa guianensis* Aubl. por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas. Amostras coletadas na Reserva Adolpho Ducke, Manaus, Amazonas, Brasil. 128

Tabela 2: Perfil lipidômico dos compostos majoritários presentes no óleo de *Carapa vasquezii* Kenfack por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas. Amostras coletadas na rodovia AM – 010, Km 42, Manaus, Amazonas, Brasil. 130

Tabela 3: Ajuste de modelo não linear (função quadrática) para o efeito da inibição de óleos de espécies do gênero *Carapa* sobre o crescimento micelial de quatro espécies fitopatogênicas de importância econômica. 134

Tabela 4: Efeito antifúngico de óleos provenientes de sementes de duas espécies do gênero *Carapa* sobre fungos fitopatogênicos. 135

CAPÍTULO 5

Tabela 1: Efeito de diferentes concentrações de reguladores de crescimento sobre o crescimento de plântulas a partir do cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de *C. guianensis* e *C. vasquezii*. 156

1 INTRODUÇÃO GERAL

Na Amazônia, a gestão florestal de espécies de usos múltiplos tem grande potencial, pois mais de 40% das espécies de interesse madeireiro também fornecem produtos não madeireiros (Herrero-Jauregui *et al*., 2009). Espécies vegetais como as pertencentes à família botânica Meliaceae, especificamente, aquelas do gênero *Carapa*, são importantes fontes de múltiplos produtos (Dembélé *et al*., 2015), por apresentarem madeira de excelente qualidade, e utilizadas, praticamente, todas as partes da planta para fins medicinais (Brito *et al*., 2013; Roma *et al*., 2015). O gerenciamento dos recursos florestais transformando-os em serviços e produtos como fonte de benefícios econômicos é uma forma de incentivar a persistência e conservação da biodiversidade refletindo efeitos para os diversos grupos sociais envolvidos, como proprietários rurais, povos da floresta, etnias indígenas, enfim, a sociedade em geral, mantendo de forma sustentável a fauna silvestre e a diversidade florística (Klimas *et al*., 2012; Abreu *et al*., 2014).

A floresta Amazônica apresenta diversidade de plantas associada com longa tradição fitoterápica, e muitas dessas plantas são utilizadas sob a forma de extratos brutos, infusões ou emplastros para o tratamento de infecções comuns (Vieira *et al*., 2012). Assim, algumas moléculas presentes como componentes dessas substâncias podem ser protótipos de interesse para a descoberta de novos produtos de interesse para a bioindústria (Ferreira *et al*., 2015).

Devido aos diversos usos e propriedades farmacêuticas do óleo de andiroba (*Carapa* ssp.) e à excelente qualidade de sua madeira (Brito *et al*., 2013; Dembélé *et al*., 2015; Roma *et al*., 2015), sua exploração é intensa e inevitável, mas se o uso desse potencial não for conduzido técnica e adequadamente poderá ocasionar prejuízos nesse grupo taxonômico, como a redução de populações comprometendo a diversidade genética e, até mesmo, ocasionando impactos negativos sobre a fauna que sobrevive da alimentação de sementes dessas espécies (Abreu *et al*., 2014).

Do ponto de vista químico, a caracterização e padronização do óleo de andiroba, que apresenta propriedades únicas, representa uma demanda importante para garantir a qualidade e aplicação com diferentes finalidades (Cabral *et al*., 2013). No entanto são poucas as informações sistematizadas sobre o processamento, e necessita-se de maior compreensão, no que se refere a formas de aplicação mais sustentáveis e lucrativas do óleo de andiroba (Plowden, 2004). Não obstante as potenciais aplicações do óleo serem amplas, as informações

sobre outras possibilidades de uso, como por exemplo a atividade antifúngica de compostos presentes em espécies da família Meliaceae, são escassas na literatura (Paritala *et al*., 2015).

Desde sua primeira descrição em 1775, aproximadamente 40 nomes foram referenciados às espécies pertencentes ao gênero *Carapa* (Kenfack, 2011a). Não obstante apenas quatro espécies serem de fato reconhecidas: *Carapa akuri* Poncy, Forget & Kenfack, *C. megistocarpa* A. H. Gentry & Dodson, *C. guianensis* Aubl. e *C. procera* C. DC., esta última com distribuição transatlântica (Forget *et al*., 2009), o consenso geral existente na comunidade científica ao longo dos estudos realizados em nível de caracterização dessas espécies é que existe grande variabilidade tanto morfológica quanto molecular entre dois grandes complexos de espécies pertencentes ao gênero (*C. guianensis* e *C. Procera*) (Kenfack, 2011b).

Uma revisão global sobre o gênero *Carapa* realizada por Kenfack em 2011, fundamentada em análises morfológica e filogenética, permitiu a classificação de 27 espécies pertencentes a esse grupo taxonômico (11 espécies ocorrem na América e 16 na África), e na Amazônia brasileira, o autor sugere a ocorrência de três dessas espécies: *C. guianensis, C. surinamensis e C. vasquezii* (Kenfack, 2011c). Essas espécies apresentam grande similaridade fenotípica e, por essa razão, são consideradas espécies crípticas (Kenfack, 2011a; Duminil *et al*., 2012). Entretanto, existem diferenças determinantes em estruturas do ápice das folhas, flores e sementes importantes para diferenciá-las (Kenfack, 2011a).

A insuficiência de ferramentas metodológicas de precisão que auxiliem na distinção das espécies pode subestimar ou superestimar a riqueza específica de determinados grupos taxonômicos, principalmente, aquelas espécies vegetais consideradas simpátricas, como por exemplo, espécies pertencentes ao gênero *Carapa* (Duminil *et al*., 2012). Nesse sentido, trabalhos realizados na Amazônia já consideraram a ocorrência de quatro espécies vegetais pertencentes ao gênero *Carapa*, como por exemplo, Ferraz *et al*. (2002) quando investigaram os aspectos botânicos, ecológicos e tecnológicos de sementes e plântulas de *C. guianensis* e *C. procera*. Scotti-Saintagne *et al*. (2013) investigaram eventos de introgressão genética em *C. guianensis* e *C. surinamensis*. Mas evidências fundamentadas em descrições morfológicas dão conta da existência de três espécies na Amazônia brasileira (*C. guianensis*, *C. surinamensis* e *C. vasquezii*), e a última é uma nova espécie vegetal descrita por Kenfack (2011b).

As incertezas no conhecimento sobre o estado da biodiversidade é uma limitação crítica para compreensão dos possíveis impactos negativos da exploração desordenada sobre o complexo de organismos existentes, dificultando assim, a implementação de metas e

estratégias adequadas de conservação (Mihoub *et al*., 2017). Nesse sentido, a utilização sustentável dos recursos de forma a garantir a conservação da natureza, em nível global, é tema preocupante, uma vez que, o avanço desordenado da agricultura e pecuária intensiva podem significar ameaças para a conservação das florestas naturais (Nepstad *et al*., 2009).

Outro fator importante que tem efeito significativo na dinâmica florestal, com viés negativo, é a exploração seletiva de espécies de uso múltiplo. O fato é que grande parte do conhecimento sobre conservação de recursos vegetais decorre de estudos em pequenas escalas (Socolar *et al*., 2016). Um aspecto relevante para entender a dinâmica de florestas é ter conhecimentos sobre a riqueza e a diversidade de espécies, porém esses parâmetros são apresentados na maioria das situações por meio de extrapolações realizadas com o monitoramento de parcelas permanentes (Steege *et al*., 2013). Essa forma de quantificação pode subestimar o número de espécies, e limitar a realização de estudos com caráter multidisciplinar que estabeleçam relações entre características filogenéticas, aspectos funcionais e dados de inventários morfológicos das espécies de interesse para estudos de ampla abrangência (Baker *et al*., 2017). A busca por novas espécies em uma área continental de aproximadamente 6,29 milhões de Km^2, como a Amazônia, e que apresenta hiperdominância de uma quantidade reduzida de espécies (227 spp.) representando cerca de 50% do total de indivíduos é um trabalho árduo, principalmente pelas dificuldades de acesso no interior da floresta e coletas de materiais férteis que auxiliem na identificação precisa das espécies (Steege *et al*., 2013; Baker *et al*., 2017).

Uma abordagem multidisciplinar, a partir de bases conceituais, com vista em potenciais aplicações realizada pela integração de dados genéticos, funcionais, morfológicos e aplicação biotecnológica de espécies de múltiplos usos é uma questão que desperta interesse científico, na medida em que pode ratificar ou não questões taxonômicas, pela definição de agrupamento das diferentes espécies, além de relacionar essas espécies, de forma precisa, ao seu potencial de uso e definir prioridades de conservação (Baker *et al*., 2017). Portanto, a definição de espécies é um passo importante para nortear os diferentes usos e compreender a distribuição espacial de grupos de indivíduos (Duminil *et al*., 2006). Do ponto de vista taxonômico a delimitação de espécies tem sido aperfeiçoada com a aplicação de técnicas modernas como o uso de marcadores moleculares e químicos que contribuem para minimizar as incertezas na identificação das entidades morfológicas, especialmente quando se trata de complexos de espécies, como é o caso entre aquelas pertencentes ao gênero *Carapa* (Scotti-Saintagne *et al*., 2013). Nesse sentido, marcadores DNA *barcoding*, junto a características do perfil químico são métodos que podem contribuir na delimitação de espécies vegetais devido

à precisão, quando comparados com a utilização exclusiva de métodos tradicionais de identificação (Duminil *et al*., 2012; Milhomem-Paixão *et al*., 2016; Baker *et al*., 2017).

As espécies vegetais contempladas neste trabalho são consideradas crípticas, ou seja, de baixa divergência fenotípica (Scotti-Saintagne *et al*., 2013), exceto para estruturas como flores e sementes (Kenfack, 2011a). Dessa forma, partindo da importância tanto ecológica quanto econômica das espécies do gênero *Carapa* e sua ampla distribuição na Amazônia tropical (Kenfack, 2011c), tem-se como justificativa, um estudo contemplando abordagem de natureza molecular, morfofuncional e bioquímica em espécies do gênero *Carapa*. Além disso, nesta tese, sugere-se aplicação do óleo a partir da investigação da atividade antifúngica, e protocolo para a propagação *in vitro* dessas espécies, associando resultados de diferentes populações de ocorrência na Amazônia.

2 HIPÓTESES

a) Espécies do gênero *Carapa* apresentam divergência molecular suficientemente capaz de possibilitar a separação de grupos utilizando o perfil lipidômico e marcadores DNA *barcoding*;
b) Há diferenças interespecíficas quanto à morfometria e componentes do metabolismo primário que são influenciados também pelas propriedades químicas do sítio de crescimento considerando sementes de espécies do gênero *Carapa*;
c) Existe diferença entre espécies do gênero *Carapa* quanto à mobilização de reservas do metabolismo primário e nutrientes minerais durante o processo de germinação e crescimento inicial de plântulas;
d) Óleos extraídos de sementes de espécies vegetais do gênero *Carapa* apresentam efeito antifúngico sobre o crescimento micelial de fungos fitopatogênicos;
e) Há diferença quanto ao percentual de germinação e crescimento de plântulas de espécies vegetais do gênero *Carapa* quando cultivadas *in vitro* a partir de embriões zigóticos e segmentos nodais submetidos ao meio MS suplementado com diferentes concentrações de reguladores de crescimento (AIA, BAP e suas interações e TDZ).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

O objetivo geral desta tese foi de investigar a base molecular, morfofuncional e bioquímica, com ênfase no perfil lipidômico e nos bioensaios com fungos fitopatogênicos, além do cultivo *in vitro* de espécies do gênero *Carapa*, visando a obter informações no sentido de confirmar ou não as diferenças existentes entre espécies crípticas pertencentes a esse grupo taxonômico e potenciais aplicações biotecnológicas das espécies.

3.2 Específicos

a) Investigar a divergência genética em espécies do gênero *Carapa* utilizando o perfil lipidômico e marcadores moleculares DNA *barcoding*;
b) Identificar diferenças nas características morfométricas e componentes do metabolismo primário em espécies vegetais do gênero *Carapa* utilizando as sementes como principal fonte de estudo;
c) Investigar a dinâmica de mobilização dos componentes do metabolismo primário e nutrientes minerais durante as fases de germinação até a formação de folhas expandidas em plântulas de espécies do gênero *Carapa*;
d) Avaliar a atividade antifúngica do óleo de sementes de espécies do gênero *Carapa*;
e) Investigar a viabilidade do cultivo *in vitro* de embriões zigóticos e segmentos nodais submetidos a diferentes concentrações de reguladores de crescimento em plantas (AIA, BAP e TDZ).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abreu, J.C. de; Guedes, M.C.; Guedes, A.C.L.; Batista, E. das M. 2014. Estrutura e distribuição espacial de andirobeiras (*Carapa* spp.) em floresta de várzea do estuário amazônico. *Ciência Florestal*, 24(4): 1009-1019.

Baker, T.R.; Pennington, R.T.; Dexter, K.G.; Fine, P.V.A.; Fortune-Hopkins, H.; Honorio, E.N.; *et al*. 2017. Maximising synergy among tropical plant systematists, ecologists, and evolutionary biologists. *Trends in Ecology & Evolution*, 32(4): 258-267. https://doi.org/10.1016/j.tree.2017.01.007.

Brito, N.B.; Souza Junior, J.M. de; Leão, L.R.S.; Brito, M.V.H.; Rêgo, A.C.M.; Medeiros, A.C. 2013. Efeito do óleo de andiroba (*Carapa guianensis*) na função hepática de ratos submetidos à isquemia e reperfusão normotérmica do fígado. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, 40(6): 476-479.

Cabral, E.C.; Cruz, G.F. da; Simas, R. de C.; Sanvido, G.B.; Gonçalves, L. de V.; Leal, R.V.P.; *et al*. 2013. Typification and quality control of the Andiroba (*Carapa guianensis*) oil via mass spectrometry fingerprinting. *Analytical Methods*, 5: 1385-1391.

Dembélé, U.; Lykke, A.M.; Koné, Y.; Témé, B.; Kouyaté, A.M. 2015. Use-value and importance of socio-cultural knowledge on Carapa procera trees in the Sudanian zone in Mali. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 11(14): 1-10.

Duminil, J.; Caron, H.; Scotti, I.; Cazal, S.O.; Petit, R.J. 2006. Blind population genetics survey of tropical rain- forest trees. *Molecular Ecology*, 15: 3505-3513.

Duminil, J.; Kenfack, D.; Viscosi, V.; Grumiau, L.; Hardy, O.J. 2012. Testing species delimitation in sympatric species complexes: the case of an African tropical tree, Carapa spp. (Meliaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 62: 275-285. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.09.020.

Ferraz, I.D.K.; Camargo, J.L.C.; Sampaio, P. de T.B. 2002. Sementes e plântulas de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl. e *Carapa procera* D. C.): aspectos botânicos, ecológicos e tecnológicos. *Acta Amazônica*, 32(4): 647-661.

Ferreira, M.C.; Vieira, M. de L.A.; Zani, C.L.; Alves, T.M. de A.; Sales Junior, P.A.; Murta, S.M.F.; *et al*. 2015. Molecular phylogeny, diversity, symbiosis and discover of bioactive compounds of endophytic fungi associated with the medicinal Amazonian plant Carapa guianensis Aublet (Meliaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 59: 36-44.

Forget, P.M.; Poncy, O.; Thomas, R.S.; Hammond, D.S.; Kenfack, D. 2009. A new species of Carapa (Meliaceae) from Central Guyana. *Brittonia*, 61(4): 366-374.

Herrero-Jauregui, C.; Garcia-Fernandez, C.; Sist, P.; Casado, M.A. 2009. Conflict of use for multi-purpose tree species in the State of Para Eastern Amazonia, Brazil. *Biodiversity and Conservation*, 18: 1019-1044.

Kenfack, D. 2011a. *Carapa vasquezii* (Meliaceae): a new species from western Amazonia. *Brittonia*, 63(1): 7-10.

Kenfack, D. 2011b. Resurrection in *Carapa* (Meliaceae): a reassessment of morphological variation and species boundaries using multivariate methods in a phylogeneticcontext. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 165: 186-221.

Kenfack, D. 2011c. A synoptic revision of Carapa (Meliaceae). *Harvard Papers in Botany*, 16(2): 171-231.

Klimas, C.A.; Cropper Jr, W.P.; Kainer, K.A.; Wadt, L.H. de O. 2012. Viability of combined timber and non-timber harvests for one species: a *Carapa guianensis* case study. *Ecological Modelling*, 246: 147-156.

Mihoub, J.B.; Titeux, N.; Brotons, L.; Brummitt, N.A.; Schmeller, D.S. 2017. Setting temporal baselines for biodiversity: the limits of available monitoring data for capturing the full impact of anthropogenic pressures. *Scientific Reports*, 7: 1-11. https://doi.org/10.1038/srep41591.

Milhomem-Paixão, S.S.R.; Fascineli, M.L.; Roll, M.M.; Longo, J.P.F.; Azevedo, R.B.; Pieczarka, J.C.; Salgado, H.L.C.; Santos, A.S.; Grisolia, C.K. 2016. The lipidome, genotoxicity, hematotoxicity and antioxidant properties of andiroba oil from the Brazilian Amazon. *Genetics and Molecular Biology*, 39(2): 248-256. https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2015-0098.

Nepstad, D.; Soares-Filho, B.S.; Merry, F.; Lima, A.; Moutinho, P.; Carter, J.; *et al*. 2009. The end of deforestation in the Brazilian Amazon. *Science*, 326(5958): 1349-1351.

Paritala, V.; Chiruvella, K.K.; Thammineni, C.; Ghanta, R.G.; Mohammed, A. 2015. Phytochemicals and antimicrobial potentials of mahogany family. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 25: 61-83. https://doi.org/10.1016/j.bjp.2014.11.009.

Plowden, C. 2004. The ecology and harvest of andiroba seeds for oil production in the Brazilian Amazon. *Conservation & Society*, 2(2): 251-270.

Roma, G.C.; Camargo-Mathias, M.I.; Nunes, P.H.; Remédio, R.N.; Faria, A.U. de; Bechara, G.H. 2015. Effects of andiroba (*Carapa guianensis*) oil in ticks: ultrastructuralanalysis of the Synganglion of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille,1806) (Acari: Ixodidae). *Acta Tropica*, 141: 7-15.

Scotti-Saintagne, C.; Dick, C.W.; Caron, H.; Vendramin, G.G.; Guichoux, E.; Buonamici, A.; *et al*. 2013. Phylogeography of a species complex of lowland Neotropical rain forest trees (Carapa, Meliaceae). *Journal of Biogeography*, 40: 676-692. https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2011.02678.x.

Socolar, J.B.; Gilroy, J.J.; Kunin, W.E.; Edwards, D.P. 2016. How should beta-diversity inform biodiversity conservation? *Trends in Ecology & Evolution*, 31(1): 67-80.

Steege, H.T.; Pitman, N.C.A.; Sabatier, D. 2013. Hyperdominance in the Amazonian tree flora. *Science*, 342(6156): 324-333.

Vieira, M.L.A.; Hughes, A.F.S.; Gil, V.B.; Vaz, A.B.M.; Alves, T.M.A.; Zani, C.L.; Rosa, C.A.; Rosa, L.H. 2012. Diversity and antimicrobial activities of the fungal endophyte community associated with the traditional Brazilian medicinal plant Solanum cernuum Vell. (Solanaceae). *Canadian Journal of Microbiology*, 58: 1-13.

Capítulo 1

Divergência molecular em espécies do gênero *Carapa* utilizando perfil lipidômico e marcadores DNA *barcoding*. Manuscrito em preparação para *Plant Molecular Biology*.

Divergência molecular em espécies do gênero *Carapa* utilizando perfil lipidômico e marcadores DNA *barcoding*

RESUMO

A identificação autêntica de espécies nativas ainda é um desafio em ambientes de florestas naturais, uma vez que há dificuldades na obtenção de material fértil que possa contribuir para identificação morfológica com precisão. Dessa forma, este trabalho foi conduzido com o objetivo de estimar a divergência inter e intraespecífica por meio do perfil lipidômico e utilização de marcadores moleculares DNA *barcoding*, considerando-se duas unidades taxonômicas do gênero *Carapa*, associando-as às regiões de ocorrência no intuito de auxiliar sua caracterização taxonômica e contribuir para a conservação dos recursos vegetais. Amostras de sementes e folhas de 53 indivíduos foram coletadas e identificadas morfologicamente em duas unidades taxonômicas: *Carapa guianensis* (Amazonas – 15 e Acre – 16) e *Carapa vasquezii* (Amazonas – 21 e Rondônia – 1). Os óleos extraídos das sementes foram esterificados e analisados seu perfil lipidômico por meio da técnica de Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas – CG/EM a partir de 3 indivíduos de *C. guianensis* e 3 de *Carapa vasquezii*. As amostras de DNA possibilitaram a amplificação e sequenciamento de duas regiões específicas do genoma psbA-trnH e rbcL, as quais foram utilizadas para teste de *barcoding gap* e reconstrução de uma árvore filogenética para verificar a divergência entre as espécies de *Carapa* identificadas morfologicamente. Adicionalmente, foram realizadas análises de diversidade genética (diversidade nucleotídica e haplotípica) e estrutura populacional (F_{ST}) dentro e entre as duas espécies do gênero *Carapa*, considerando o contexto da distribuição em diferentes regiões da Amazônia. Análises do perfil lipidômico possibilitaram a identificação de 42 moléculas presentes nos óleos *C. guianensis* e *C. vasquezii*, 20 compostos foram compartilhados entre as espécies independentemente da região de coleta em que as matrizes encontravam-se estabelecidas, 2 compostos ocorreram somente em óleos de *C. guianensis* provenientes do Acre, 3 foram observados em amostras de óleos de *C. guianensis* e *C. vasquezii* provenientes do Amazonas e 17 compostos somente em amostras de óleos de *C. vasquezii*. Para o perfil lipidômico, verificou-se maior diversidade de compostos pertencentes à classe dos terpenoides em *C. vasquezii*. As regiões psbA-trnH e rbcL possibilitaram a obtenção de fragmentos de 462 e 568 pb, respectivamente, que após concatenados, foram obtidos 1031 pb para um conjunto de 53 indivíduos. Estes evidenciaram a ocorrência de 16 haplótipos distintos em 7 povoamentos considerados para as duas espécies (*C. guianensis* e *C. vasquezii*), 999 sítios conservados e 32 sítios polimórficos, e a maioria deles encontrados em *C. vasquezii*. Neste trabalho, determinou-se que existe diferença significativa entre as espécies do gênero *Carapa* ($F_{ST=}$0,87; p=0). A análise de *barcoding gap* possibilitou constatar que a região rbcL é promissora para estudos de códigos de barras na delimitação das duas espécies do gênero *Carapa* em níveis entre 0,1 a 0,2% de distância genética. A árvore filogenética, para os marcadores concatenados (psbA-trnH+rbcL), apresentou dois grupos: *C. guianensis* e *C. vasquezii*, o que sugere a separação interespecífica das unidades taxonômicas. Além disso, ocorreu a separação de dois subgrupos conforme região de coleta Amazonas e Acre. Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que as duas espécies identificadas morfologicamente *C. guianensis* e *C. vasquezii* constituem grupos biológicos geneticamente divergentes.

Palavras-chave: Andiroba; árvore filogenética; genética de populações; lipídios.

Genetic divergence in *Carapa* using lipid profile and markers DNA barcoding

ABSTRACT
Authentic identification of native species is still a challenge in natural forest environments, since there are difficulties in obtaining botanical material that can contribute to accurate morphological identification. Thus, the objective this study was to estimate the inter and intraspecific divergence through the lipid profile and the use of molecular markers DNA barcoding, considering two taxonomic units in *Carapa* species, associating them to the regions of occurrence in order to assist their taxonomic characterization and to contribute with the conservation of plant resources. Seeds and leaves samples of 53 individuals were collected and identified morphologically in two taxonomic units: *Carapa guianensis* (Amazonas - 15 and Acre - 16) and *Carapa vasquezii* (Amazonas - 21 and Rondônia - 1). The oils extracted from the seeds were esterified and their lipid profile was analyzed by means of the Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry - GC/MS technique from 3 individuals of *C. guianensis* and 3 of C. *vasquezii*. DNA samples allowed the amplification and sequencing of two specific regions of the psbA-trnH and rbcL genome, which were used for barcoding-gap testing and reconstruction of a phylogenetic tree to verify the divergence between morphologically identified *Carapa* species. In addition, analyzes of genetic diversity (nucleotide and haplotype diversity) and population structure (F_{ST}) were carried out within and between the two species of the genus *Carapa*, considering the distribution context in different regions from Amazonian. Analysis of the lipid profile allowed the identification of 42 molecules present in the oils *C. guianensis* and *C. vasquezii*, being 20 compounds shared between the species independent of collection region in which the matrices were established, 2 compounds occurred only in oils of *C. guianensis* from Acre, 3 were observed in samples of oils of *C. guianensis* and *C. vasquezii* from Amazonas and 17 compounds only in samples of *C. vasquezii* oils. For the lipidomic profile it was verified a greater diversity of compounds belonging to the terpenoid class in *C. vasquezii*. The psbA-trnH and rbcL regions allowed obtaining fragments of 462 and 568 bp, respectively, that after concatenated, 1031 bp were obtained for a set of 53 individuals. These evidenced the occurrence of 16 distinct haplotypes in 7 populations considered for both species (*C. guianensis* and *C. vasquezii*), 999 sites being conserved and 32 polymorphic sites, most of them found in *C. vasquezii*. In this work, it was determined that there is a significant difference between the species of the genus *Carapa* (Fst = 0.87; p = 0). The barcoding gap analysis made it possible to verify that the rbcL region is promising for barcoding studies in the delimitation of the two species of the *Carapa* genus at levels between 0.1 and 0.2% of genetic distance. The phylogenetic tree, for the concatenated markers (psbA-trnH + rbcL), presented two groups: *C. guianensis* and *C. vasquezii*, which suggests the interspecific separation of the taxonomic units. In addition, two subgroups were separated according to the region of collection Amazonas and Acre states. The results obtained in this work suggest that the two species morphologically identified *C. guianensis* and *C. vasquezii* constitute genetically divergent biological groups.

Keywords: Andiroba; phylogenetic tree; population genetics; lipids.

1. INTRODUÇÃO

A identificação precisa das espécies é o passo inicial para investigar o seu potencial biotecnológico, e pode ser realizada com métodos moleculares, complementares a análises de preditores morfológicos (Kenfack, 2011; Saslis-Lagoudakis *et al*., 2015) que, muitas vezes, apresentam incertezas quanto aos resultados na identificação, e a situação torna-se ainda mais preocupante por conta da dificuldade de obtenção de material fértil em determinados períodos fenológicos das espécies vegetais e problemas de acesso, principalmente no dossel das florestas (Duminil *et al*., 2006).

Muitas das espécies vegetais que ocorrem nas florestas tropicais são utilizadas para consumo de alimentos e medicina popular, e grande parte da população mundial depende da medicina fitoterápica para cura de doenças (Verma e Singh, 2008). Espécies vegetais do gênero *Carapa*, por exemplo, são reconhecidas por apresentarem óleos amplamente utilizados na medicina e fabricação de cosméticos (Funasaki *et al*., 2016), e ainda apresentam madeira de excelente qualidade, o que lhe atribui características de espécies vegetais de múltiplos usos (Dembélé *et al*., 2015). Em contrapartida, o consumo de produtos medicinais à base de plantas pode apresentar riscos à saúde humana, uma vez que esses produtos são pouco regulados (Saslis-Lagoudakis *et al*., 2015). Produtos de origem vegetal podem ser fontes de toxicidade, e a segurança da qualidade pode ser comprometida por adulteração acidental, identificação incorreta das espécies vegetais e contaminação durante o processamento (Breemen *et al*., 2008). Para contornar as incertezas na delimitação das espécies e controle de qualidade dos produtos utilizados na medicina popular, podem ser utilizadas técnicas modernas como a utilização de marcadores moleculares DNA *barcoding* junto a marcadores químicos (Saslis-Lagoudakis *et al*., 2015). O código de barras do DNA é caracterizado como o uso de uma sequência curta de genes de uma região padronizada do genoma que pode ser usado para descobrir, caracterizar, distinguir espécies e até atribuir indivíduos não identificados a um determinado grupo de espécies (Newmaster *et al*., 2006).

A associação de informações genéticas por meio de marcadores DNA *barcoding* com os processos fisiológicos, especificamente a produtividade primária, incluindo o crescimento, reprodução, luz e assimilação de nutrientes, bem como a resposta da espécie vegetal ao ambiente de crescimento e características bioquímicas permitirá sugerir hipóteses dos processos de evolução ao longo do tempo e possibilitará a compreensão da dinâmica da diversidade biológica e processos biogeográficos nos ecossistemas de florestas tropicais

(Brousseau *et al*., 2014). Nesse sentido, o uso de técnicas moleculares para definição das espécies em conjunto com dados do perfil químico podem fornecer uma visão mais complexa para inferência de padrões de diversidade (Daïnou *et al*., 2014).

O uso de técnicas de identificação por meio de códigos de barras (*barcoding*) para delimitação de espécies possibilitou resultados robustos em animais para região citocromo c oxidase I (COI) (Herbet *et al*., 2003). A utilização de DNA *barcoding* em plantas ainda não é totalmente um consenso, devido às dificuldades de se obter uma região de código de barras universal (Vijayan e Tsou, 2010). Alguns marcadores moleculares apresentam potencial para delimitação de grupos vegetais, e inicialmente foram recomendadas sete (7) regiões cloroplastídicas (Pennisi, 2007; Ledford, 2008), quatro (4) de porções codificadoras (matK – enzima maturase K, rbcL – ribulose 1,5 bisfosfatase carboxilase/oxigenase, rpoB – subunidade β da RNA polimerase e RpoC1 – subunidade γ da RNA polimerase) e três (3) espaçadores não codificados (atpF-atpH, psbA-trnH e psbK-psbI) (CBOL Plant Working Group, 2009).

No entanto, a utilização desses marcadores moleculares apresentam limitações, o que implica a necessidade de busca por código de barras centrais de capacidade abrangente para diferenciar as espécies vegetais (Wilkinson *et al*., 2017), e além disso, alguns grupos de plantas podem apresentar dificuldade de amplificação de uma determinada região do genoma, e diferentemente de animais, as plantas apresentam baixa variabilidade interespecífica, e necessitam da utilização de um banco de dados complexo para que se possam fazer inferências com maior precisão científica (Stoeckle *et al*., 2011). A utilização de marcadores químicos também apresenta algumas desvantagens, como por exemplo, a dificuldade da definição de marcadores únicos para espécies que compartilham o mesmo ambiente, e além disso, a composição química, sobretudo do metabolismo primário, especificamente o perfil lipidômico, pode apresentar variabilidade em função da estação, condições de armazenamento e processamento da matéria prima, podendo levar à definição errônea das espécies (Saslis-Lagoudakis *et al*., 2015).

A identificação equivocada de plantas de múltiplos usos de interesse econômico poderá negligenciar algum tipo de composto específico produzido pelas espécies, e pode, inclusive, ocasionar superestimativa ou, até mesmo, subestimar a diversidade de determinados grupos. Na última revisão do gênero *Carapa*, realizada por Kenfack (2011), sugeriu-se a existência de 27 espécies pertencentes a esse grupo taxonômico, com três (3) delas de ocorrência na Amazônia brasileira (*Carapa guianensis*, *C. surinamensis* e *C. vasquezii*). A penúltima foi elevada ao nível de espécie e a última descrita pela primeira vez nessa

oportunidade. Ademais, esse grupo taxonômico é composto por um complexo de espécies crípticas que compartilham características morfológicas (Kenfack, 2011) e apresentam consideráveis níveis de introgressão genética (Duminil *et al*., 2012; Scotti-Saintagne *et al*., 2013).

Dessa forma, ao assumir que espécies estreitamente relacionadas coexistem, é interessante confirmar que a divisão morfológica que motivou sua designação em diferentes taxas, também existe no nível molecular para garantir que nenhuma outra entidade reprodutiva tenha permanecido negligenciada (Duminil *et al*., 2006).

Este trabalho foi elaborado com objetivo de investigar a divergência molecular inter e intra específica por meio do perfil lipidômico e de marcadores moleculares DNA *barcoding*, considerando-se unidades taxonômicas do gênero *Carapa*, associando-as às regiões de ocorrência e a questões de natureza lipidômica no intuito de auxiliar sua caracterização taxonômica e contribuir para a conservação dos recursos vegetais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta do material de estudo

As amostras de tecido foliar e sementes de duas espécies pertencentes ao gênero *Carapa* (*C. guianensis* e *C. vasquezii*) foram coletadas em diferentes regiões da Amazônia brasileira (Acre - 07°38’07,8” S e 72°54’20,4” W, Amazonas – 02°55,719’ S e 59°58,613’ W e Rondônia – 08°50’24” S e 63°56’24” W), totalizando 53 amostras de indivíduos – Figura 1. As amostras de sementes foram coletadas no período de maior produção, e foi considerado de elevado regime pluviométrico nas regiões, nos meses de dezembro a fevereiro nos estados do Acre e Rondônia e março a abril no Amazonas. Materiais férteis foram coletados para identificação botânica e depositados no herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, sob o número de tombamento 261947 (*C. guianensis*) e 261953 (*C. vasquezii*).

Figura 1: Localização das áreas de coletas de folhas e sementes na região Amazônica para extração de DNA e análise do perfil lipidômico de plantas do gênero *Carapa*.

As amostras de sementes foram lavadas em água destilada imediatamente após serem coletadas e, em seguida, foram submetidas ao processo de extração de lipídeos. Já as folhas foram secas em papel filtro contendo sílica e, posteriormente, foram armazenadas a -20ºC para análises de extração de DNA.

2.2. Análise do perfil lipidômico do óleo extraído de sementes de duas unidades taxonômicas pertencentes ao gênero *Carapa*

A caracterização do perfil lipidômico dos compostos presentes nos óleos das sementes de espécies do gênero *Carapa* foi realizada por meio de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (Milhoem-Paixão *et al*., 2016), considerando no mínimo um indivíduo representante de cada espécie nas diferentes regiões de coleta (*C. guianensis* – dois indivíduos no Acre e um no Amazonas; *C. vasquezii* – três indivíduos no Amazonas). O óleo foi extraído diretamente das sementes e submetido ao processo de transesterificação em meio alcalino para análise das substâncias químicas, utilizando o método adaptado de Geris *et al*. (2007).

Alíquotas de 10 mg de cada amostra foram transferidas para tubos cônicos de polipropileno com tampa, devidamente identificados (TBx-1), seguido de aquecimento por 2 minutos em banho-maria a 40°C. A cada tubo foi adicionado 100 µL de metóxido de potássio 2N e mantido em banho ultrassônico por 2 minutos a 30°C±2. Em seguida, foram adicionados 200 µL de n-hexano, e foram, então, agitados suavemente por 10 segundos e centrifugados por 1 minuto a 10.000 rpm. A fase orgânica de cada amostra foi transferida para novos tubos (TBx-2).

Um volume de 110 µL de HCl 2N foi adicionado nos tubos (TBx-1) de cada amostra, agitando-se novamente por 10 segundos. Posteriormente, adicionou-se 200 µL da mistura CH_2Cl_2:n-hexano na proporção de 1:1 (v/v), e a solução foi novamente agitada por 10 segundos. Adicionou-se 1 mL de água deionizada para retirar o excesso de ácido da fase orgânica, e centrifugou-se nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante de cada solução foi transferido para novos tubos (TBx-2) e as amostras concentradas com fluxo de gás inerte a 35ºC/5 psi/20 min. As amostras concentradas foram submetidas ao processo de derivatização.

A derivatização das amostras foi realizada com N,O-bis (trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA) + 1% de trimetil-clorosilano (TMCS) para simular as moléculas livres que não foram transesterificadas e as demais que apresentavam hidroxilas livres. Nas amostras dos tubos (TBx-2), foram adicionadas 50 µL do derivatizante e os tubos foram incubados em banho de ultrassom por 20 minutos a 30ºC. Em seguida, os solventes foram evaporados a 35ºC/5 psi/20 min e, posteriormente, foi adicionado 500 µL de CH_2Cl_2:n-hexano na proporção de 1:1 (v/v) aos respectivos tubos, agitados, suavemente, por 10 segundos e o conteúdo transferido para frascos de vidro de 2 mL com tampa e septo e analisados por Cromatografia Gasosa Acoplada ao Espectrômetro de Massa – CG/EM.

As análises por espectrometria de massas foram realizadas através do uso de um Cromatógrafo Gasoso (CG), ThermoScientific Trace 1300 acoplado a um espectrômetro de massa (EM), ThermoScientific MS-ISQ Single Quadrupolo com autoamostrador AI 1310, equipado com coluna capilar ZB-5HT (30m x 0,25mm x 0,1µm) ou DB-5 (15m x 0,25mm x 0,1µm). Nessas análises, foi utilizado gás hélio como carreador a um fluxo de 1 mL.minuto^{-1}, com injeção de amostra de 1,0 µL no modo *Splitless*. O injetor foi conduzido em temperatura de 220°C e a programação de temperatura do forno iniciou-se com 50 até 200ºC (8ºC/minuto), mantendo-se por 1 minuto, elevando-se até 300ºC (15ºC/minuto), mantendo durante cinco minutos, e elevando-se novamente até 350ºC (15ºC/minuto), permanecendo por mais nove minutos. O MS-ISQ foi programado com interface a 280°C, fonte de ionização a 280°C, faixa de massa (40-1000 Da) com varredura de 1scan/s e ionização eletrônica a 70 eV.

As identificações das substâncias foram realizadas por meio da comparação dos espectros de massas dos compostos presentes nas amostras de óleos com os presentes nas bibliotecas comerciais NIST2011, WILEY2009, FAMES2011 e tempo de retenção de cada composto.

2.3. Análise do DNA genômico das amostras de folhas de espécies do gênero *Carapa*

2.3.1. Extração e quantificação do DNA

O DNA genômico total foi extraído pelo método CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) (Doyle e Doyle, 1987) com algumas modificações. As folhas foram coletadas e preservadas em sílica, maceradas e incubadas a 60°C por 30 minutos em 700 µL de CTAB 2% e 2 µL de β mercaptoetanol. Homogenatos foram extraídos com clorofórmio/álcool isoamílico (CIA), e, em seguida, o DNA foi precipitado com isopropanol a 4°C durante 15 minutos. O *pellet* de DNA formado foi lavado duas vezes com etanol 70 e 100%. Após secagem, o DNA foi ressuspendido em 50 µL de tampão TE (10 mM, 1 mM EDTA) acrescido de RNAse (5 mg/µL).

A quantificação do DNA extraído foi feita por comparação com padrões de massa molecular conhecida (DNA de fago lambda a 10, 20, 50 e 100 ng/µL), por meio de eletroforese em gel de agarose 1% corado com *GelRed* (*Biotium, Inc.*). Os géis foram analisados em transiluminador sob luz ultravioleta e fotodocumentados. As amostras de DNA foram diluídas em água MiliQ na concentração de 2,5 ng/µL para amplificação das regiões genômicas.

2.3.2. Amplificação dos marcadores moleculares DNA *barcoding* (PCR)

2.3.2.1. Teste de amplificação para escolha das regiões genômicas

Inicialmente foram utilizados 6 pares de *primers* (rpoC1, rpoB, matk, rbcL, psbA-trnH e ITS). No primeiro teste, foram selecionadas oito amostras representando cada uma das regiões de coleta. As regiões do DNA foram amplificadas por meio de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) utilizando termociclador Veriti (*Life Technologies, Inc.*). O volume total das reações foi de 25 µL com 1,5 µM de cada iniciador (*forward* e *reverse*); 2,5 unidades de Taq DNA polimerase; 200 µM de cada nucleotídeo (dNTP); tampão de PCR 1OX (10 mM Tris-

HCL pH 8,3; 50 mM KCl 1,5 mM $MgCl_2$); BSA (*Bovine Serum Albumin* – 2,5 mg/mL); 23,4 mM de MgCl; 7,5 ng de DNA e água ultrapura.

O sequenciamento do DNA foi realizado sob eletroforese capilar utilizando o Kit *Big Dye* 3.1 *Sequencing* (*Life Technologies, Inc.*). As reações de sequenciamento foram realizadas nos dois sentidos, utilizando um dos primers (*forwar*d e *reverse*), individualmente, em cada reação sob as seguintes condições: desnaturação a 96°C por 1 minuto, 25 ciclos a 96°C por 10 segundos, 50°C por 10 segundos, 60°C durante quatro minutos e 4°C por 1 minuto. Posteriormente, os produtos da reação de sequenciamento foram purificados utilizando-se solução de acetato de sódio/EDTA e etanol 100%. Em seguida, acrescentou-se 5 µL de formamida, desnaturados a 95°C durante cinco minutos e analisados em um sequenciador de DNA ABI 3130 XL (*Life Technologies, Inc*.), seguindo as instruções do fabricante.

As sequências *consensus* foram obtidas por meio da edição de contigues de cada indivíduo para cada uma das regiões consideradas nessa análise (RpoC1, RpoB, Matk, rbcL, psbA-trnH e ITS). Em seguida, as sequências foram alinhadas por meio da ferramenta *Blast* (*NCBI – National Center for Biotechnology Information*) (Brousseau *et al*., 2014), o que possibilitou a busca de sequências depositadas no banco de dados no qual existem informações sobre os dados moleculares de várias espécies de distribuição global. Após a busca no *Blast*, foi realizado o alinhamento múltiplo entre as sequências encontradas e verificada a similaridade genética molecular dos indivíduos por meio da ferramenta *ClustalW* (*EMBL – European Bioinformatics Institute*).

2.3.2.2. Amplificação e análises das regiões genômicas selecionadas

Após as análises iniciais dos resultados foram escolhidas as três regiões de *primers* (F e R) com os melhores resultados (psbA-trnH, ITS e rbcL). Os critérios de escolha dos *primers* foram os seguintes: boa qualidade das sequências obtidas; existência de banco de dados com a sequência do *primer* escolhido, e que esteja depositada no *GenBank* (NCBI) para fins de comparação das sequências; optou-se por um *primer* nuclear e cloroplastídicos; *primers* que apresentaram maior polimorfismo, com maior número de mutações (deleções e substituições de bases), e também foi considerada a facilidade de alinhamento das regiões amplificadas (Newmaster *et al*., 2006).

Após a escolha dos *primers* o n total de amostras foi submetido à amplificação e posterior sequenciamento. As amplificações foram realizadas sob as seguintes condições

termais: psbA-trnH – desnaturação a 94°C por 2 minutos, 35 ciclos de 94°C/30 segundos, 58°C/1 minuto e 72°C/30 segundos, seguido de extensão final de 72°C/10 minuto; 2) A região ITS (1 e 4) foi amplificada a 94°C/3 minutos, seguido de 40 ciclos 94°C/30 segundos, 54°C/40 segundos, 72°C/50 segundos, e extensão final de 72°C/10 minutos; 3) A região rbcL foi amplificada a 95°C durante 4 minutos, com 35 ciclos 94°C/30 segundos, 55°C/1 minutos, 72°C/1 minutos, e extensão final de 72°C/10 minutos (Duminil *et al*., 2012). O sequenciamento, análise e edição das sequências foram realizados nas mesmas condições descritas na seção anterior.

Análises de diversidade genética e estrutura populacional foram realizadas utilizando o *software Arlequin.* 3.5 (Excoffier e Lischer, 2010). Foi, então, estimado o número de haplótipos, diversidade nucleotídica (π), diversidade haplotípica (h) e número médio de substituições nucleotídicas (k). Uma Análise de Variância Molecular (AMOVA) foi implementada para os grupos biológicos, no intuito de determinar o padrão de estruturação genética das populações.

Neste trabalho, realizou-se a análise *barcoding gap* por meio do *software* e linguagem de programação R, utilizando o pacote *spider* (R Core Team, 2015) para verificar a divergência genética entre os grupos biológicos considerados. A reconstrução da árvore filogenética foi realizada pelo método *Neighbor Joing* (Saitou e Nei, 1987), considerando a distância K2P de Kimura, através do *software* Mega 6 (Tamura *et al*., 2013).

A análise de rede de haplótipos foi realizada para verificar o compartilhamento genético entre os grupos biológicos por meio do *software PopArt* 1.7, utilizando o método *Minimum Spanning Network* para redes filogenéticas (Prentis *et al*., 2009; Huson e Scornavacca, 2010; Beatty e Provan, 2011) e as distribuições dos haplótipos foram integradas em um mapa digital, utilizando o sistema de informação geoespacial por meio do *software* e linguagem de programação R (R Core Team, 2015).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Perfil lipidômico do óleo extraído de sementes de espécies do gênero *Carapa*

Considerando o perfil lipidômico de *C. guianensis* de matrizes provenientes do Acre, no total foram observadas 28 moléculas, destas, 22 foram identificadas e seis não foram possíveis identificar. O óleo de *C. guianensis* proveniente de amostras coletadas no Amazonas

apresentou 29 moléculas em sua composição química, destas, 23 foram identificadas e seis não foram identificadas. Em *C. vasquezii* proveniente do Amazonas, observaram-se a presença de 48 substâncias, 29 destas foram identificadas, 16 não foram identificadas e três substâncias repetiram-se nas amostras (Tabela 1).

Tabela 1: Perfil lipidômico do óleo de espécies do gênero *Carapa* de diferentes procedências da região Amazônica, Brasil.

(Continua)

***Carapa guianensis* (procedência de Mâncio Lima, Acre)**	**IK**	**Tr**	**%Área**
Glicerol 3TMS	1100	9,72	0,04
Succinato 2TMS	1122	10,36	0,03
n-dodecanol 1TMS	1300	14,12	0,04
Ácido mirístico 1TMS	1477	17,85	0,06
Palmitoleato de metila	1510	18,51	0,04
Palmitato de metila	1530	18,86	9,50
Ácido palmitoleico 1TMS	1584	19,93	0,18
Ácido palmítico 1TMS	1603	20,33	19,75
Oleato de metila	1636	20,86	22,25
Estearato de metila	1644	21,07	3,82
Ácido oleico	1700	22,10	35,80
Ácido esteárico	1707	22,27	6,90
Araquidoato de metila	1743	22,89	0,40
Dodecanodioato 2TMS	1779	23,51	0,14
Ácido araquídico 1TMS	1799	23,88	0,34
Benzoato de metila	1836	24,55	0,17
NI	1861	24,98	0,13
Ácido docosanoico 1TMS	1886	25,42	0,04
Lignocerato de metila	1924	26,05	0,04
Esqualeno	1965	26,75	0,04
β-sitosterol 1TMS	2311	30,29	0,05
NI	2615	32,24	0,03
NI	2699	32,63	0,08
NI	2947	34,02	0,15
NI	3051	34,64	0,03

Tabela 1: Perfil lipidômico do óleo de espécies do gênero *Carapa* de diferentes procedências da região Amazônica, Brasil.

(Continuação)

***Carapa guianensis* (procedência de Mâncio Lima, Acre)**	**IK**	**Tr**	**%Área**
Glicerol 3TMS	1100	9,74	0,02
Succinato 2TMS	1122	10,34	0,03
n-dodecanol 1TMS	1300	14,12	2,02
Ácido mirístico 1TMS	1477	17,85	0,04
Oleato de metila	1636	20,97	28,02
Estearato de metila	1644	21,13	6,44
Ácido oleico	1700	22,10	25,30
Ácido esteárico	1707	22,25	4,91
Araquidoato de metila	1743	22,91	0,60
Dodecanodioato 2TMS	1779	23,53	0,05
Ácido araquídico 1TMS	1799	23,88	0,14
Benzoato de metila	1861	24,55	0,11
NI	1861	24,98	0,10
Lignocerato de metila	1924	26,05	0,10
Ácido 9-octadecenoico 1TMS	2141	28,81	0,04
β-sitosterol 1TMS	2311	30,29	0,04
NI	2699	32,61	0,12
NI	2943	34,00	0,10
NI	3051	34,64	0,01
Desacetil gedunina	3113	35,04	0,02
***Carapa guianensis* (Procedência de Manaus, Amazonas)**	**IK**	**Tr**	**%Área**
Glicerol 3TMS	1100	9,74	0,03
Succinato 2TMS	1122	10,32	0,04
n-dodecanol 1TMS	1300	14,12	0,03
Ácido mirístico 1TMS	1477	17,85	0,07
Palmitoleato de metila	1510	18,49	0,20
Palmitato de metila	1530	18,91	13,10
Ácido palmitoleico 1TMS	1584	19,94	0,52
Ácido palmítico 1TMS	1603	20,35	17,98
Oleato de metila	1636	20,95	28,08

Tabela 1: Perfil lipidômico do óleo de espécies do gênero *Carapa* de diferentes procedências da região Amazônica, Brasil.

(Continuação)

***Carapa guianensis* (Procedência de Manaus, Amazonas)**	**IK**	**Tr**	**%Área**
Estearato de metila	1644	21,10	3,05
Ácido oleico	1700	22,12	31,70
Ácido esteárico	1707	22,27	3,98
Araquidoato de metila	1743	22,91	0,40
Dodecanoato de metila	1779	23,51	0,10
Ácido araquídico 1TMS	1799	23,88	0,17
Benzoato de metila	1836	24,55	0,10
NI	1861	24,98	0,11
Ácido docosanoico 1TMS	1886	25,42	0,02
Lignocerato de metila	1924	26,05	0,05
Esqualeno	1965	26,76	0,02
β-sitosterol 1TMS	2311	30,29	0,03
NI	2388	30,87	0,07
NI	2615	32,24	0,04
NI	2699	32,63	0,07
7-desacetil-7oxogedunina	2940	33,97	0,02
Desacetil gedunina	3113	35,02	0,02
NI	3193	35,52	0,04
NI	3296	36,19	0,01
Epoxidesacetil gedunina	3407	36,95	0,02
***Carapa vasquezii* (Procedência de Manaus, Amazonas)**	**IK**	**Tr**	**%Área**
Glicerol 3TMS	1100	9,74	0,03
Succinato 2TMS	1122	10,34	0,04
n-dodecanol 1TMS	1300	14,12	0,04
5-fenil-lundecano	1340	15,01	0,04
Ácido mirístico 1TMS	1477	17,87	0,06
Palmitoleato de metila	1510	18,50	0,15
Palmitato de metila	1530	18,89	12,15
Ácido palmitoleico 1TMS	1584	19,94	0,40
Ácido palmítico 1TMS	1603	20,31	16,21

Tabela 1: Perfil lipidômico do óleo de espécies do gênero *Carapa* de diferentes procedências da região Amazônica, Brasil.

(Continuação)

***Carapa vasquezii* (Procedência de Manaus, Amazonas)**	**IK**	**Tr**	**%Área**
Oleato de metila	1636	20,93	31,60
Estearato de metila	1644	21,07	2,04
Ácido oleico 1TMS	1700	22,10	33,50
Ácido esteárico 1TMS	1707	22,24	2,54
Araquidoato de metila	1743	22,89	0,26
Dodecanodioato de metila	1779	23,53	0,08
Ácido araquídico 1TMS	1799	23,88	0,12
Benzoato de metila	1836	24,55	0,09
NI	1861	24,98	0,10
Lignocerato de metila	1924	26,07	0,05
NI	2193	29,30	0,33
β-sitosterol 1TMS	2311	30,29	0,04
NI	2388	30,87	0,04
NI	2699	32,63	0,05
7-desacetil-7oxogedunina	2940	33,98	0,03
***Carapa vasquezii* (Procedência Manaus, Amazonas)**	**IK**	**Tr**	**%Área**
Glicerol 3TMS	1100	10,07	0,11
2,4-ditert-butilfenol	1270	13,62	0,35
n-dodecanol 1TMS	1300	14,47	0,15
NI	1415	16,63	0,40
Ácido mirístico 1TMS	1477	18,24	0,36
Palmitoleato de metila	1510	18,91	0,70
Palmitato de metila	1530	19,24	19,60
Ácido palmítico 1TMS	1603	20,61	14,86
Oleato de metila	1636	21,37	23,65
NI	1674	21,63	0,23
Ácido oleico 1TMS	1700	22,34	31,33
11-eicosanoato de metila	1752	23,04	0,30

Tabela 1: Perfil lipidômico do óleo de espécies do gênero *Carapa* de diferentes procedências da região Amazônica, Brasil.

(Continuação)

***Carapa vasquezii* (Procedência Manaus, Amazonas)**	**IK**	**Tr**	**%Área**
Eicosanoato de metila	1766	23,29	2,60
Ácido araquídico 1TMS	1799	24,21	0,50
Benzoato de metila	1836	24,91	0,80
Ácido 1,2-benzenodicarboxílico	1866	25,07	0,64
Albuterol	1884	25,37	0,20
Tricosanoato de metila	1901	25,67	0,23
Tetracosanoato de metila	1944	26,40	0,40
Esqualeno	1965	27,12	0,30
β-sitosterol 1TMS	2311	30,86	0,20
NI	2388	31,54	1,40
NI	2615	33,13	0,40
NI	2699	33,53	0,32
7-oxogedunina	3097	34,92	0,13
Desacetil gedunina	3250	35,89	0,14
2,2-ditert-butilfenol	1270	13,25	0,14
***Carapa vasquezii* (Procedência Manaus, Amazonas)**	**IK**	**Tr**	**%Area**
Ácido láurico 1TMS	1349	15,28	0,20
NI	1375	15,83	0,35
Ácido mirístico 1TMS	1477	17,79	0,51
Palmitato de metila	1530	18,72	0,31
1H-indole-2-carboxilato 3TMS	1535	19,01	0,20
NI	1576	19,79	0,50
Ácido palmítico 1TMS	1603	20,16	24,64
Ácido oleico 1TMS	1700	21,92	63,60
Ácido esteárico 1TMS	1707	22,10	5,10
NI	1773	23,43	0,66
Ácido araquídico 1TMS	1799	23,78	0,81
NI	1839	24,60	0,31
NI	1861	24,90	0,33
Ácido docosanoico 1TMS	1886	25,33	0,30

Tabela 1: Perfil lipidômico do óleo de espécies do gênero *Carapa* de diferentes procedências da região Amazônica, Brasil.

(Conclusão)

***Carapa vasquezii* (Procedência Manaus, Amazonas)**	**IK**	**Tr**	**%Area**
Esqualeno	1965	26,67	0,25
Ácido tetracosanoico 1TMS	1965	26,76	0,13
Campesterol 1TMS	2219	29,53	0,11
Estigmasterol 1TMS	2245	29,75	0,10
β-sitosterol 1TMS	2311	30,17	0,22
Lanosterol 1TMS	2311	30,29	0,14
NI	2595	32,08	0,11
NI	2695	32,61	0,30
7-desacetoxi-7-oxogedunina	2940	33,77	0,16
NI	3018	34,44	0,27
NI	3133	35,14	0,14
Epoxidesacetil gedunina	3407	35,37	0,20
NI	3271	36,03	0,11

***** NI: Substância não identificada; TMS: Tetrametilsilano. IK: Índice de *Kovat's*; Tr: Tempo de retenção do composto. Valores organizados em ordem crescente de acordo com IK e Tr.

No geral, neste trabalho foi observado que, do total de 42 substâncias identificadas em óleos de *C. guianensis* e *C. vasquezii* em duas localidades na região da Amazônia, 20 foram compartilhadas entre as duas espécies vegetais independentemente da região de coleta em que as matrizes encontravam-se estabelecidas, duas substâncias ocorreram somente em óleos de *C. guianensis* provenientes do Acre, três ocorreram em amostras de óleos de *C. guianensis* e *C. vasquezii* provenientes do Amazonas e 17 foram identificadas, especificamente, em amostras de óleos de *C. vasquezii* (Figura 2).

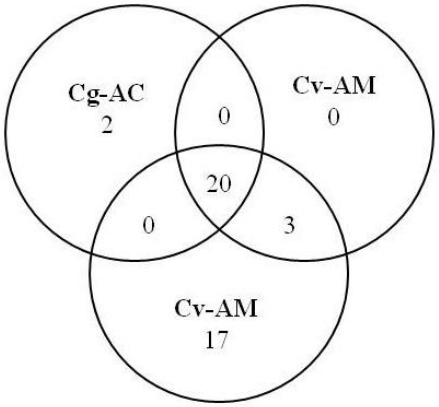

Figura 2: Diagrama de *Venn* indicando o número de moléculas do perfil lipidômico do óleo de espécies do gênero *Carapa*, de acordo com as regiões de coleta. Cg – AC: *Carapa guianensis* de procedência do Acre; Cg – AM: *C. guianensis* de procedência do Amazonas; Cv – AM: *C. vasquezii* de procedência do Amazonas.

Os óleos extraídos de sementes de espécies do gênero *Carapa* apresentam divergências do ponto de vista tanto da diversidade quanto na concentração das substâncias que são sintetizadas pelas espécies nos diferentes sítios de crescimento. Amostras de óleos de *C. guianensis* apresentaram o ácido oleico, oleato de metila, ácido palmítico e palmitato de metila como compostos majoritários, destacando-se também a presença de 7-desacetil-7-oxogedunina e Epoxidesacetil gedunina no óleo proveniente de matrizes procedentes de Manaus, Amazonas. Essas substâncias pertencem ao grupo dos liminoides, estão inseridas no grupo maior dos terpenos e já houve relatos da sua presença em amostras de óleo de frutos de *C. guianensis* (Silva e Nunomura, 2012). Na tabela 2, estão descritos os compostos que foram identificados em amostras de óleo de espécies do gênero *Carapa* provenientes de diferentes locais da Amazônia.

Tabela 2: Compostos químicos presentes no óleo extraído de sementes de espécies do gênero *Carapa* de amostras provenientes de dois locais de coleta da Amazônia (Acre e Amazonas).

(Continua)

Compostos	***C. guianensis* - AC**	***C. guianensis* - AM**	***C. vasquezii* - AM**
Glicerol 3TMS	+	+	+
Succinato 2TMS	+	+	+
n-dodecanol 1TMS	+	+	+
Ácido mirístico 1TMS	+	+	+
Palmitoleato de metila	+	+	+
Palmitato de metila	+	+	+
Ácido palmitoleico 1TMS	+	+	+
Ácido palmítico 1TMS	+	+	+
Oleato de metila	+	+	+
Estearato de metila	+	+	+
Ácido oleico	+	+	+
Ácido esteárico	+	+	+
Araquidoato de metila	+	+	+
Ácido araquídico 1TMS	+	+	+
Benzoato de metila	+	+	+
Ácido docosanoico 1TMS	+	+	+
Lignocerato de metila	+	+	+
Esqualeno	+	+	+
β-sitosterol 1TMS	+	+	+
Desacetil gedunina	+	+	+
Ácido 9-octadecenoico 1TMS	+	-	-
Dodecanodioato 2TMS	+	-	-
Dodecanodioato de metila	-	+	+
7-desacetil-7oxogedunina	-	+	+
Epoxidesacetil gedunina	-	+	+
5-fenil-lundecano	-	-	+
2,4-ditert-butilfenol	-	-	+
Ácido láurico 1TMS	-	-	+
1H-indole-2-carboxilato 3TMS	-	-	+

Tabela 2: Compostos químicos presentes no óleo extraído de sementes de espécies do gênero *Carapa* de amostras provenientes de dois locais de coleta da Amazônia (Acre e Amazonas).

(Conclusão)

Compostos	***C. guianensis* - AC**	**C. *guianensis* - AM**	**C. *vasquezii* - AM**
2,2-ditert-butilfenol	-	-	+
Ácido tetracosanoico 1TMS	-	-	+
Campesterol 1TMS	-	-	+
Estigmasterol 1TMS	-	-	+
Lanosterol 1TMS	-	-	+
7-desacetoxi-7-oxogedunina	-	-	+
11-eicosanoato de metila	-	-	+
Eicosanoato de metila	-	-	+
Ácido 1,2-benzenodicarboxílico	-	-	+
Albuterol	-	-	+
Tricosanoato de metila	-	-	+
Tetracosanoato de metila	-	-	+
7-oxogedunina	-	-	+

*(+): Indica presença do composto na amostra de óleo; (-): Indica ausência do composto na amostra de óleo.

Em *C. vasquezii*, similar ao que ocorreu em *C. guianensis*, novamente a composição química do óleo apresentou o ácido oleico, oleato de metila, ácido palmítico e palmitato de metila como compostos majoritários, e a diferença para as espécies foi representada no teor dessas substâncias. Além disso, o destaque para essa espécie vegetal foi a maior diversidade de compostos da classe de terpenos.

Os liminoides (terpenos) são encontrados, principalmente, em espécies vegetais pertencentes à família Meliaceae, e podem ser considerados marcadores químicos desse grupo taxonômico (Tan e Luo, 2011), e fontes promissoras de atividade biológica, como a atividade inseticida, antiviral e antifúngica (Abdelgaleil *et al*., 2005; Chiruvella *et al*., 2007; Paritala *et al*., 2015). O estudo de marcadores químicos é aplicável a muitas áreas do conhecimento, auxiliando a autenticação de espécies vegetais genuínas, na busca de novos recursos ou substitutos de matérias-primas, otimização da extração e métodos de purificação dos compostos, elucidação da estrutura e determinação da pureza das substâncias presentes nos óleos, e nesse sentido, essas investigações sistemáticas usando marcadores químicos podem

levar a descobertas e desenvolvimento de novos produtos e diferentes formas de aplicações (Rasheed *et al*., 2012).

As principais categorias de substâncias químicas que podem ser utilizadas como marcadores quimiotaxonômicos são os metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários estão onipresentes em plantas, porém os teores, as classes e as vias sintéticas em que essas substâncias estão presentes podem ser indicadores de espécies vegetais, como por exemplo, os teores e as classes de carboidratos e proteínas podem indicar a autenticidade de uma determinada espécie vegetal. Nesse contexto, outro grupo importante são os terpenos que por serem compostos secundários podem estar associados ao mecanismo de defesa ou resposta a estresse ambiental, o que poderá contribuir para classificação de grupos de plantas (Singh, 2016). Adicionalmente, as características da composição química em espécies vegetais podem refletir sua diversidade genética (Milhomem-Paixão *et al*., 2016), e, certamente, poderá contribuir em análises complexas, sobretudo para delimitar espécies e possibilitar inferências sobre a diversidade e estrutura populacional de plantas.

3.2. Divergência, estrutura e diversidade genética em espécies do gênero *Carapa*

Das 6 regiões *barcoding* testadas para *C. guianensis* e *C. vasquezii*, foram selecionadas psbA-trnH e rbcL, ambas regiões cloroplastídicas, e que proporcionaram melhor qualidade das sequências obtidas; maior número de sequências depositadas no *GenBank* (NCBI) e apresentaram maior grau de polimorfismo. No entanto, a região nuclear do ITS – *Internal Transcript Spacer* (1 e 4), também utilizada neste trabalho, não possibilitou obtenção de sequências de boa qualidade, e, por essa razão, seus resultados não foram inseridos nas análises. Além disso, de 70 amostras inicialmente coletadas, apenas 53 foram selecionadas, pois foram as amostras com sequências de melhor qualidade, com descrição taxonômica minuciosa e que foram caracterizadas em nível de espécie.

Os marcadores moleculares utilizados (psbA-trnH e rbcL) possibilitaram a obtenção de fragmentos de 462 e 568 pares de base (pb), respectivamente. De acordo com as buscas realizadas no banco de dados da *National Center for Biotechnology Information – NCBI*, as sequências obtidas apresentaram forte similaridade com *Carapa guianensis* Aubl. para região psbA-trnH e *C. procera* para rbcL (similaridade de 100%; *e-value* = 0). Após análise e edição, as regiões cloroplastidiais foram concatenadas, possibilitando a obtenção de fragmentos de 1031 pb para os indivíduos analisados (n=53).

A partir dos indivíduos pertencentes a duas unidades taxonômicas (*C. guianensis* e *C. vasquezii*), foram identificados 16 haplótipos distintos para os sete povoamentos considerados, formados por indivíduos de *C. guianensis* coletados em Mâncio Lima (9) e Rodrigues Alves (7), no Acre; Reserva Adolpho Ducke (14) e Estação de Silvicultura (1) em Manaus, no Amazonas. Já para *C. vasquezii* foram considerados indivíduos coletados na rodovia AM – 010 – Km 47 (3); Estação de Silvicultura (3); Reserva Adolpho Ducke (13) e também provenientes da área pertencente ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA (3). O alinhamento das sequências concatenadas evidenciou 999 sítios conservados e 32 sítios polimórficos, a maioria deles encontrados em *C. vasquezii* (Tabela 3).

Tabela 3: Análise da diversidade genética de sete (7) povoamentos de *C. guianensis* e *C. vasquezii* que ocorrem na Amazônia utilizando dois marcadores moleculares (psbA-trnH + rbcL).

Povoamentos	**Marcadores moleculares (psbA-trnH+rbcL)**					
	N	**H**	**h**	**π**	**k**	**SP**
Carapa guianensis						
Mâncio Lima - AC	9	1	0	0	0	0
Rodrigues Alves - AC	7	1	0	0	0	0
Reserva Adolpho Ducke – Manaus - AM	14	2	0,14	0,0001	0,14	1
Est. de Silv. – Manaus - AM	1	-	-	-	-	-
Total	31	-	-	-	-	-
Carapa vasquezii	**N**	**H**	**h**	**π**	**k**	**SP**
Rodovia AM-010 - Km 47 - Manaus - AM	3	2	0,67	0,007	7,33	11
Est. de Silv. - Manaus - AM	3	2	0,67	0,004	4,67	7
Reserva Ducke - Manaus - AM	13	6	0,71	0,0033	3,37	12
INPA – Manaus - AM	3	2	0,67	0,0006	0,67	1
Total	22	-	-	-	-	-

N: número de indivíduos amostrados; **H:** número de haplótipos; **h:** diversidade haplotípica; **π:** diversidade nucleotídica; **k:** número médio de diferenças nucleotídicas; **SP:** sítios polimórficos. * AC: Acre; AM: Amazonas. Populações com apenas um (1) indivíduo coletado não foi inserida nas análises de diversidade.

Em populações de *C. guianensis*, que incluem amostras provenientes do Acre (Mâncio Lima e Rodrigues Alves), foi possível observar baixos níveis de diversidade (H=1; h=0; π=0), porém amostras de *C. guianensis* da Reserva Adolpho Ducke, em Manaus, Amazonas apresentaram maiores índices (H=2; h=0,14; π=0,0001; k=0,14). Adicionalmente, *C.*

vasquezii também apresentou maiores índices de diversidade em amostras provenientes da Reserva Adolpho Ducke (H=6; h=0,71; π=0,0033; k=3,37) e rodovia – AM 010 – Km 47 (H=2; h=0,67; π=0,007; k=7,33), em Manaus, Amazonas (Tabela 3).

Após realização da Análise de Variância Molecular (AMOVA), que pode ser observada na Tabela 4, foi possível verificar que existe uma diferença significativa entre as populações para os dois grupos considerados ($F_{ST=}$0,87; p=0), indicando forte estruturação entre as espécies, o que sugere divergência e apoia a divisão morfológica global do gênero *Carapa* que foi sugerida por Kenfack (2011).

Tabela 4: Análise de Variância Molecular (AMOVA) para sete (7) povoamentos de *C. guianensis* e *C. vasquezii* que ocorrem na Amazônia utilizando dois marcadores moleculares (psbA-trnH + rbcL).

Fonte de variação	GL	SQ	Componentes de Variação	Porcentagem de Variação	Índice de fixação
Entre grupos (spp.)	1	110,21	3,96 Va	70,51	F_{st} = 0,87
Entre povoamentos dentro dos grupos	5	32,75	0,91 Vb	16,11	
Dentro dos povoamentos	45	33,83	0,75 Vc	13,38	
Total	**51**	**176,79**	**5,62**		

*Significância (10100 permutações) com p=0,00000.

Com a análise de *barcoding gap*, identificou-se que o limiar entre as diferentes entidades morfológicas foi significativo para distâncias genéticas inferiores a 0,2%, o que sugere boa resolução na divisão molecular para o gene rbcL entre as unidades taxonômicas do gênero *Carapa* morfologicamente distintas (Figura 3 B). Entretanto o espaçador intergênico psbA-trnH não demonstrou ser apropriado para separação em nível de espécies quando comparado com a região rbcL, uma vez que apresentou valores de identificação falso positivo (cinza claro) e falso negativo (cinza escuro), e sua melhor resolução foi observada entre as distâncias 0,23 a 0,44%.

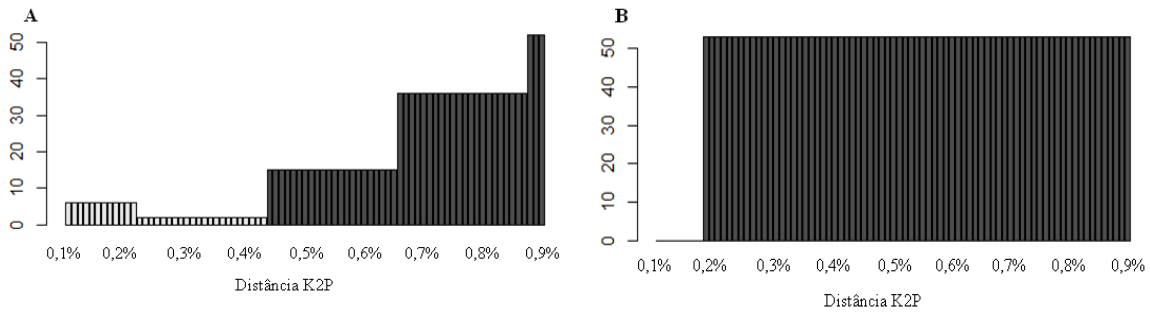

Figura 3: Análise *barcoding gap* da distribuição do número absoluto de identificações falso positivas (cinza claro) e falso negativas (cinza escuro) em intervalo de 0,1 a 0,9% de probabilidade pela distância K2P. A: *Barcoding gap* para o gene psbA-trnH; B: *Barcoding gap* para o gene rbcL.

Assim, o marcador molecular rbcL que codifica a região da ribulose 1,5 bisfosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco) foi considerado promissor para identificação autêntica dos grupos biológicos do gênero *Carapa*. No entanto, alguns *taxons* podem apresentar barreiras para identificação com o uso de marcadores moleculares, uma vez que em florestas neotropicais ocorre elevado índice de especiação (Richardson *et al*., 2001). E no caso de espécies pertencentes ao gênero *Carapa*, há evidências de introgressão, pois existem relatos da ocorrência de hibridização em espécies que ocorrem na Amazônia (Scotti-Saintagne *et al*., 2013), e, além disso, sugere-se a ocorrência de um complexo de espécies simpátricas com características morfológicas semelhantes, o que poderia conduzir a separações morfológicas errôneas (Duminil *et al*., 2012).

A reconstrução filogenética das unidades taxonômicas sugere tendência de divisão de grupos tanto em nível de espécies, como também por local de coleta para os marcadores moleculares concatenados (psbA-trnH+rbcL) (Figura 4), o que corrobora com os resultados obtidos após a AMOVA (F_{st}=0,87).

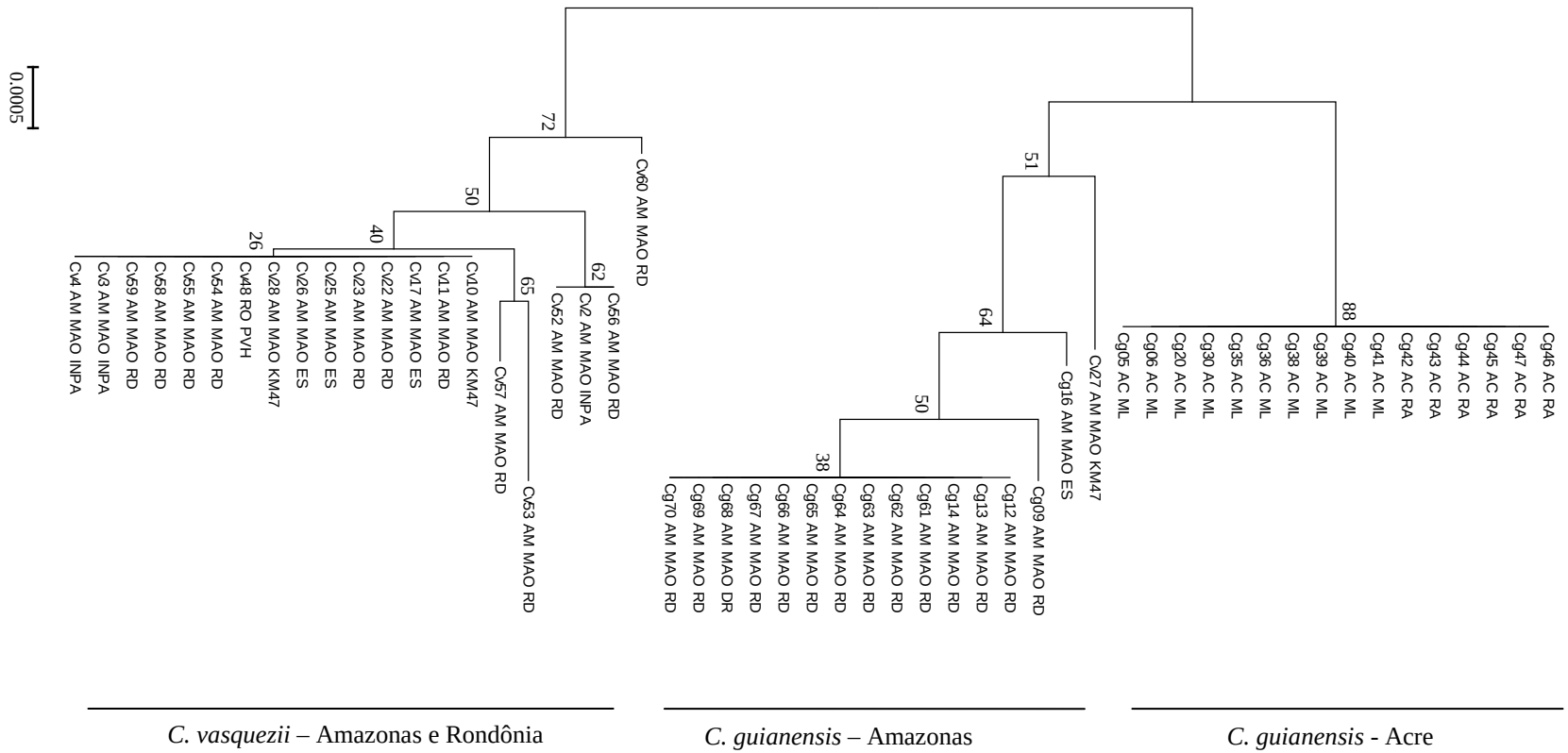

Figura 4: Reconstrução da árvore filogenética considerando duas unidades taxonômicas pertencentes ao gênero *Carapa* pelo método *Neighbor-Joining* e distância K2P de Kimura.

*Cg_AC_ML: *Carapa guianensis* – Acre, Mâncio Lima; Cg_AC_RA: *C. guianensis* – Acre, Rodrigues Alves; Cg_AM_MAO_ES: *C. guianensis* – Amazonas, Manaus, Estação Experimental de Silvicultura; Cg_AM_MAO_RD: *C. guianensis* – Amazonas, Manaus, Reserva Adolpho Ducke; Cv_AM_MAO_ES: *C. vasquezii* – Amazonas, Manaus, Estação Experimental de Silvicultura; Cv_AM_RD: *C. vasquezii* – Amazonas, Manaus, Reserva Adolpho Ducke; Cv_AM_Km47: *C. vasquezii* – Amazonas, Manaus, rodovia AM 010 – Km 47; Cv_RO_PVH: *C.vasquezii* – Rondônia, Porto Velho.

A diversidade genética intraespecífica em *C. guianensis* na região intergênica psbA-trnH, estimada pelo índice F*st* (0,98) foi maior que a obtida para as diferentes espécies utilizando as regiões concatenadas (F*st*=0,87), podendo ser, dentre outras possibilidades, artefato do viés da amostragem. Nesse caso, a região psbA-trnH possibilitou a obtenção de três haplótipos, um no Acre e dois na região do Amazonas, e sugeriu que o baixo número de locais de coleta possam ter contribuído para superestimativa de diversidade. Para esse fato, ainda, pode-se destacar questões de isolamento das populações por distância geográfica (Ekblom *et al*., 2007) ou, até mesmo, eventos que tenham relação previsível com as taxas de processos evolutivos (migração, mutação e deriva). Dessa forma, a variação associada à amostragem estatística pode ser reduzida ao aumentar a intensidade amostral dentro da população (Holsinger e Weir, 2009). Vale destacar que, algumas regiões não codificadoras, a exemplo do psbA-trnH, podem apresentar problemas na sua utilização como marcadores moleculares *barcoding* para determinados *táxons* de plantas (Pang *et al*., 2012), e podem, , ocasionar superestimativa da diversidade genética (Whitlock *et al*., 2010), como ocorreu em *C. guianensis*.

Em *C. vasquezii*, os valores de variação da diversidade foram maiores dentro das populações, sugerindo baixa estruturação da espécie (Tabela 5). Entretanto, a ocorrência de deriva genética nessas condições não seria uma preocupação para essa espécie (Chen *et al*., 2014).

Tabela 5: Análise de Variância Molecular (AMOVA) para sete (7) povoamentos de *C. guianensis* e *C. vasquezii* que ocorrem na Amazônia utilizando a região psbA-trnH.

Fonte de variação (*C. guianensis*)	**GL**	**SQ**	**Componentes de Variação**	**Porcentagem de Variação**	**Índice de fixação**
Entre povoamentos dentro dos grupos	2	29,37	1,55 Vb	97,83	F*st*=0,98
Dentro dos povoamentos	27	0,93	0,03	2,17	
Total	**29**	**30,3**	**1,58**		
Fonte de variação (*C. vasquezii*)	**GL**	**SQ**	**Componentes de Variação**	**Porcentagem de Variação**	**Índice de fixação**
Entre povoamentos dentro dos grupos	3	3,38	-0,16 Va	-9,66	F*st* = -0,10
Dentro dos povoamentos	18	32,89	1,83 Vb	109,66	
Total	**21**	**36,27**	**1,67**		

Com relação à diversidade de haplótipos para as diferentes regiões de coleta, verificou-se que *C. guianensis* e *C. vasquezii* apresentaram maior diversidade na região da Amazônia Central (Manaus) (Figura 5A e B), apresentando um haplótipo ancestral. Já os demais derivam desses haplótipos centrais para ambas as espécies. O haplótipo de maior diversidade para *C. vasquezii* foi representado por indivíduos provenientes em maior número da Reserva Adolpho Ducke (Figura 5B), o que confirma a importância da manutenção de áreas prioritárias para conservação, uma vez que contempla expressiva diversidade genética de espécies vegetais. Por outro lado, o baixo nível de polimorfismo nas populações pode ser explicado pelos eventos de dispersão das espécies (López e Bonasora, 2017). No caso de espécies do gênero *Carapa*, a frequente ocorrência da dispersão hidrocórica pode favorecer a limitação do fluxo gênico, contribuindo para eventos de baixa diversidade (Cloutier *et al*., 2005).

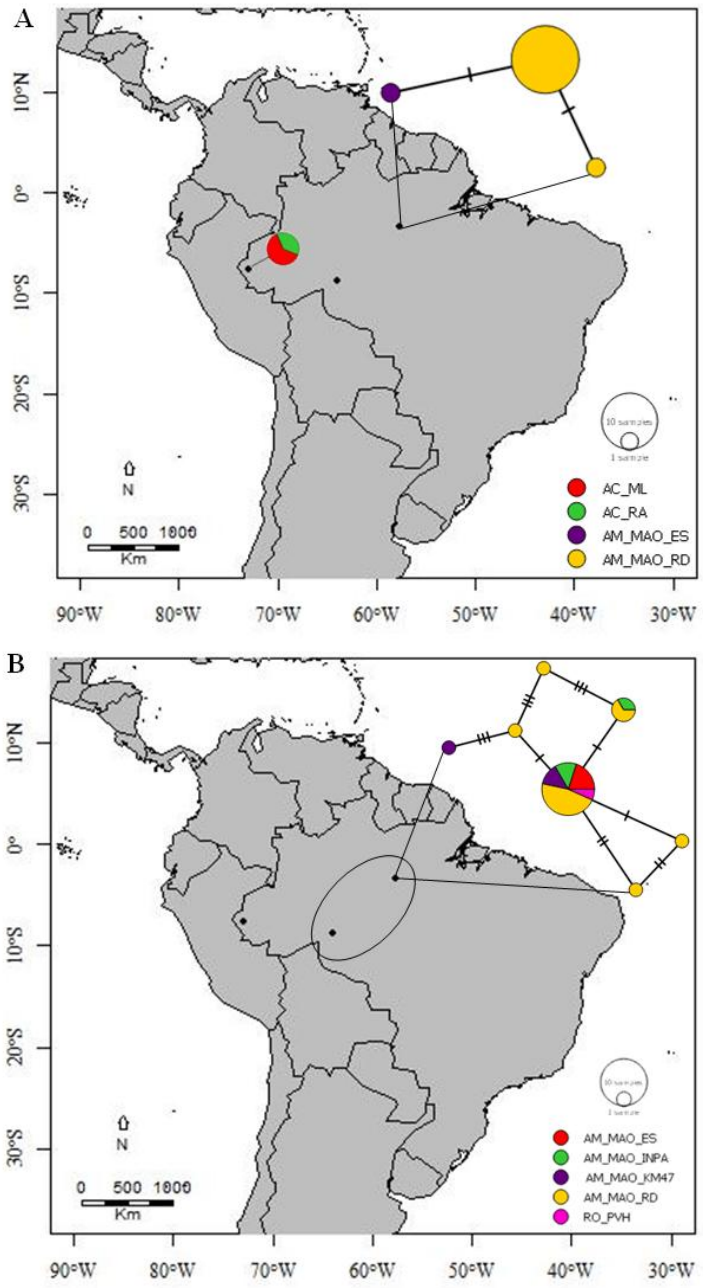

Figura 5: Diversidade de haplótipos de espécies do gênero *Carapa* na região Amazônica.
* A: Diversidade de haplótipos em amostras de *C. guianensis*. B: Diversidade de haplótipos em amostras de *C. vasquezii*. *AC_ML: Município de Mâncio Lima, Acre; AC_RA: Município de Rodrigues Alves, Acre; AM_ES: Estação Experimental de Silvicultura, Manaus, Amazonas; AM_RD: Reserva Florestal Adolpho Ducke, Manaus, Amazonas.

A ocorrência de baixa diversidade genética aumenta os riscos de extinção dos organismos, à medida que reduz o potencial das espécies se adaptarem a mudanças ambientais (Hobbs *et al*., 2013). Destarte, as áreas que detêm a maior diversidade genética podem ser consideradas refúgios históricos, contribuindo para a conservação e a manutenção de populações vegetais (Cloutier *et al*., 2005; López e Bonasora, 2017).

Determinamos que diferentes entidades biológicas podem apresentar diferenças em traços funcionais, especificamente na composição química de óleos extraídos das sementes, e que essas diferenças podem estar associadas com as características de diversidade genética contribuindo para novas perspectivas de informações biogeográficas sobre o complexo ecológico e evolutivo entre espécies vegetais e seu ambiente de crescimento (Malhado *et al*., 2013). A implementação de ferramentas de código de barras tem múltiplas aplicações, dentre elas, podem aumentar a velocidade nas identificações de rotina e a identificação precisa de novas espécies vegetais, e assim possibilitar o avanço de consultas ecológicas e taxonômicas, permitindo também uma análise forense rápida e precisa a partir de fragmentos de plantas, além da possibilidade de funcionar como uma camada adicional de controle de qualidade na indústria de prospecção de moléculas bioativas (Newmaster *et al*., 2006). As entidades morfológicas do gênero *Carapa* apresentam especificidades do ponto de vista de substâncias químicas presentes no óleo que poderão auxiliar na definição de espécies vegetais, e os resultados moleculares convergem para diferenças entre as espécies de modo a necessitar de estudos mais detalhados, com a utilização de regiões do genoma com maior número de mutações, suficientes para separar as espécies de maneira mais robusta.

4. CONCLUSÃO

As unidades taxonômicas (*C. guianensis* e *C. vasquezii*) apresentam divergência considerando o perfil lipidômico e os marcadores moleculares cloroplastídicos (psbA-trnH e rbcL). Para o perfil lipidômico, 20 compostos foram compartilhados entre as duas espécies e 17 foram observados somente em *C. vasquezii*. As regiões cloroplastidiais psbA-trnH e rbcL apresentaram-se informativas para as análises de DNA *barcoding*, com a região rbcL caracterizando a variação interespecífica e a região psbA-trnH a variação intraespecífica. A região rbcL possibilitou a delimitação das duas espécies *C. guianensis* e *C. vasquezii* de forma consistente em níveis inferiores a 0,2% na análise *barcoding*, corroborando com as estimativas de F*st*=0,87 entre as espécies e com a divisão de dois clados (*C. guianensis* [Amazonas e Acre] e *C. vasquezii* [Amazonas]) na reconstrução filogenética. Os resultados sugerem que *C. guianensis* e *C. vasquezii* apresentam divergência em nível funcional e molecular, como evidenciado no perfil lipidômico e pela árvore filogenética confirmada pelo teste de *barcoding gap*, o que irá contribuir para subsidiar as estratégias de uso e conservação desse recurso florestal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdelgaleil, S.A.M.; Hashinaga, F.; Nakatani, M. 2005. Antifungal activity of limonoids from *Khaya ivorensis*. *Pest Management Science*, 61: 186-190. https://doi.org/10.1002/ps.978.

Beatty, G.E.; Provan, J. 2011. Phylogeographic analysis of North American populations of the parasitic herbaceous plant Monotropa hypopitys L. reveals a complex history of range expansion from multiple late glacial refugia. *Journal of Biogeography*, 38: 1585-1599. https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2011.02513.x.

Breemen, R.B.V.; Fong, H.H.S.; Farnsworth, N.R. 2008. Ensuring the safety of botanical dietary supplements. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 87: 509S-513S.

Brousseau, L.; Tinaut, A.; Duret, C.; Lang, T.; Garnier-Gere, P.; Scotti, I. 2014. High-throughput transcriptome sequencing and preliminary functional analysis in four Neotropical tree species. *BMC Genomics*, 15(238). (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24673733). Acesso: 10/05/17.

CBOL Plant Working Group. 2009. A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(31): 12794-12797.

Chen, L.; Chen, F.; He, S.; Ma, L. 2014. High genetic diversity and small genetic variation among populations of Magnolia wufengensis (Magnoliaceae), revealed by ISSR and SRAP markers. *Eletronic Journal of Biotechnology*, 17: 268-274. https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2014.08.003.

Chiruvella, K.K.; Mohammed, A.; Dampuri, G.; Ghanta, R.G.; Raghavan, S.C. 2007. Phytochemical and antimicrobial studies of Methyl Angolensate and Luteolin-7- O-Glucoside isolated from callus cultures of Soymida febrifuga. *International Journal of Biomedical Science Phytochemical*, 3(4): 269-278.

Cloutier, D.; Póvoa, J.S.R.; Procopio, L.C.; Leão, N.V.M.; Wadt, L.H. de O.; Ciampi, A.Y.; Schoen, D.J. 2005. Chloroplast DNA variation of *Carapa guianensis* in the Amazon basin. *Silvae Genetica*, 54(6): 270-274.

Daïnou, K.; Mahy, G.; Duminil, J.; Dick, C.W.; Doucet, J.L.; Donkpégan, A.S.L.; Pluijgers, M.; Sinsin, B.; Lejeune, P.; Hardy, O.J. 2014. Speciation slowing down in widespread and long-living tree taxa: insights from the tropical timber tree genus Milicia (Moraceae). *Heredity*, 113: 74-85. https://doi.org/10.1038/hdy.2014.5.

Dembélé, U.; Lykke, A.M.; Koné, Y.; Témé, B.; Kouyaté, A.M. 2015. Use-value and importance of socio-cultural knowledge on Carapa procera trees in the Sudanian zone in Mali. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 11(14): 1-10.

Doyle, J.J.; Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11-15.

Duminil, J.; Caron, H.; Scotti, I.; Cazal, S.O.; Petit, R.J. 2006. Blind population genetics survey of tropical rain- forest trees. *Molecular Ecology*, 15: 3505-3513.

Duminil, J.; Kenfack, D.; Viscosi, V.; Grumiau, L.; Hardy, O.J. 2012. Testing species delimitation in sympatric species complexes: the case of an African tropical tree, Carapa spp. (Meliaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 62: 275-285. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.09.020.

Ekblom, R.; Sæther, S.A.; Jacobsson, P.; Fiske, P.; Sahlman, T.; Grahn, M.; Kålås, J.A.; Höglund, J. 2007. Spatial pattern of MHC class II variation in the great snipe (Gallinago media). *Molecular Ecology*, *16*: 1439-1451. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03281.x.

Excoffier, L.; Lischer, H.I. 2010. Arlequin suite ver 3 . 5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10: 564-567. https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x.

Funasaki, M.; Barroso, H. dos S.; Fernandes, V.L.A.; Menezes, I.S. 2016. Amazon rainforest cosmetics: chemical approach for quality control. *Química Nova*, 39(2): 194-209.

Geris, R.; Santos, N.; Amaral, B.; Maia, I.; Castro, V.; Carvalho, J.R.M. 2007. Biodiesel de soja: reação de transesterificação para aulas práticas de química orgânica. *Química Nova*, 30(5): 1369-1373.

Hebert, P.D.N.; Cywinska, A.; Ball, S.L.; De Waard, J.R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London, Serie B*, 270: 313-321.

Hobbs, J.P.A.; Herwerden, L.V.; Jerry, D.R.; Jones, G.P.; Munday, P.L. 2013. High genetic diversity in geographically remote populations of endemic and widespread coral reef Angelfishes (genus: Centropyge). *Diversity*, 5: 39-50. https://doi.org/10.3390/d5010039.

Holsingner, K.E.; Weir, B.S. 2015. Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting FST. *Nature Reviews Genetics*, 10(9): 639-650. https://doi.org/10.1038/nrg2611.

Huson, D.H.; Scornavacca, C. 2010. A survey of combinatorial methods for phylogenetic networks. *Genome Biology and Evolution*, 3: 23-35. https://doi.org/10.1093/gbe/evq077.

Kenfack, D. 2011. Resurrection in *Carapa* (Meliaceae): a reassessment of morphological variation and species boundaries using multivariate methods in a phylogeneticcontext. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 165: 186-221.

Ledford, H. 2008. Botanical identities: DNA barcoding for plants comes a step closer. *Nature*, 451:616.

López, A.; Bonasora, M.G. 2017. Phylogeography , genetic diversity and population structure in a Patagonian endemic plant. *AoBPlants*, 9(3): 1-12. https://doi.org/10.1093/aobpla/plx017.

Malhado, A.C.M.; Ladle, R.J.; Whittaker, R.J.; Atanásio Neto; Malhi, Y.; Steege, H. ter. 2013. The ecological biogeography of Amazonia. *Frontiers of Biogeography*, 5(2): 103-112.

Milhomem-Paixão, S.S.R.; Fascineli, M.L.; Roll, M.M.; Longo, J.P.F.; Azevedo, R.B.; Pieczarka, J.C.; Salgado, H.L.C.; Santos, A.S.; Grisolia, C.K. 2016. The lipidome, genotoxicity, hematotoxicity and antioxidant properties of andiroba oil from the Brazilian Amazon. *Genetics and Molecular Biology*, 39(2): 248-256. https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2015-0098.

Newmaster, S.G.; Fazekas, A.J.; Ragupathy, S. 2006. DNA barcoding in land plants: evaluation of rbcL in a multigene tiered approach. *Canadian Journal of Botany*, 84: 335-341.

Pang, X.; Liu, C.; Shi, L.; Liu, R.; Liang, D.; Li, H.; Cherny, S.S.; Chen, S. 2012. Utility of the trnH - psbA Intergenic Spacer Region and ITS combinations as plant DNA Barcodes: a meta-analysis. *Plos One*, 7(11): 1-9. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048833.

Paritala, V.; Chiruvella, K.K.; Thammineni, C.; Ghanta, R.G.; Mohammed, A. 2015. Phytochemicals and antimicrobial potentials of mahogany family. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 25: 61-83. https://doi.org/10.1016/j.bjp.2014.11.009.

Pennisi, E. 2007. Taxonomy wanted: a barcode for plants. *Science*, 318: 190-191.

Prentis, P.J.; Sigg, P.D.; Raghu, S.; Dhileepan, K.; Pavasovic, A.; Lowe, A.J. 2009. Understanding invasion history: genetic structure and diversity of two globally invasive plants and implications for their management. *Diversity and Distributions*, 15(5): 822-830. https://doi.org/10.1111/j.1472-4642.2009.00592.x.

R Core Team. 2015. *R: a language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Rasheed, N.M.A.; Nagaiah, K.; Goud, P.R.; Sharma, V.U.M. 2012. Chemical marker compounds and their essential role in quality control of herbal medicines. *Annals of Phytomedicine*, 1(1): 1-8.

Richardson, J.E.; Pennington, R.T.; Pennington, T.D.; Hollingsworth, P.M. 2001. Rapid diversification of a species-rich genus of neotropical Rain Forest Trees. *Science*, 293: 2242-2245. https://doi.org/10.1126/science.1061421.

Saitou, N.; Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4: 406-425.

Saslis-Lagoudakis, C.H.; Bruun-Lund, S.; Iwanycki, N.E.; Seberg, O.; Petersen, G.; Jäger, A.K.; Rønsted, N. 2015. Identification of common horsetail (Equisetum arvense L.; Equisetaceae) using Thin Layer Chromatography versus DNA barcoding. *Scientific Reports*, 5: 1-12. https://doi.org/10.1038/srep11942.

Scotti-Saintagne, C.; Dick, C.W.; Caron, H.; Vendramin, G.G.; Guichoux, E.; Buonamici, A.; *et al*. 2013. Phylogeography of a species complex of lowland Neotropical rain forest trees (Carapa, Meliaceae). *Journal of Biogeography*, 40: 676-692. https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2011.02678.x.

Silva, S.G.; Nunomura, R. de C.S. 2012. Liminoides isolados dos frutos de *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae). *Química Nova*, 35(10): 1936-1939.

Singh, R. 2016. Chemotaxonomy: a tool for plant classification. *Journal of Medicinal Plants Studies*, 4(2): 90-93.

Stoeckle, M.Y.; Gamble, C.C.; Kirpekar, R.; Young, G.; Ahmed, S.; Little, D.P. 2011. Commercial teas highlight plant DNA barcode identification successes and obstacles. *Scientific Reports*, 1(42): 1-7. https://doi.org/10.1038/srep00042.

Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson, D.; Filipski, A.; Kumar, S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12): 2725-2729. https://doi.org/10.1093/molbev/mst197.

Tan, Q.G.; Luo, X.D. 2011. Meliaceous Limonoids: chemistry and biological activities. *Chemical Reviews*, 111: 7437-7522.

Verma, S.; Singh, S.P. 2008. Current and future status of herbal medicines. *Veterinary World*, 1(11): 347-350.

Vijayan, K.; Tsou, C.H. 2017. DNA barcoding in plants: taxonomy in a new perspective. *Current Science*, 99(11): 1530-1541.

Whitlock, B.A.; Hale, A.M.; Groff, P.A. 2010. Intraspecific inversions pose a challenge for the trnH-psbA plant DNA barcode. *Plos One*, 5: e11533.

Wilkinson, M.J.; Szabo, C.; Ford, C.S.; Yarom, Y.; Croxford, A.E.; Camp, A.; Gooding, P. 2017. Replacing sanger with next generation sequencing to improve coverage and quality of reference DNA barcodes for plants. *Scientific Reports*, 7: 1-11. https://doi.org/10.1038/srep46040.

CAPÍTULO 2

Divergência morfométrica e aspectos do metabolismo primário em espécies do gênero *Carapa* (Meliaceae). Manuscrito em preparação para *Seed Science Research.*

Divergência morfométrica e aspectos do metabolismo primário em sementes de duas espécies do gênero *Carapa* (Meliaceae)

RESUMO
Espécies do gênero *Carapa* apresentam similaridade morfológica e são consideradas crípticas, o que proporciona dificuldades na sua identificação. Nesse sentido, a utilização de marcadores morfológicos e bioquímicos pode contribuir conjuntamente para minimizar incertezas na definição dessas espécies. Diante disso, o objetivo desse capítulo foi realizar a caracterização morfométrica e das reservas primárias em sementes quiescentes de duas espécies vegetais do gênero *Carapa* (*Carapa guianensis* Aubl. e *Carapa vasquezii* Kenfack) que ocorrem na Amazônia como forma de elucidar as divergências interespecíficas e consolidar estudos sobre esse grupo taxonômico. Sementes de 33 matrizes de *C. guianensis* e 15 matrizes de *C. vasquezii* foram coletadas nos estados do Acre e do Amazonas. Caracterização morfométrica das sementes, extração de lipídeos, proteínas, carboidratos (amido e açúcares solúveis), perfil lipidômico dos óleos extraídos e a composição química das sementes, folhas e do solo do ambiente de crescimento foram realizadas, a partir de amostras das duas espécies de *Carapa*. Sementes de *C. guianensis* apresentam maiores dimensões quando comparadas com *C. vasquezii* (comprimento = 33,9±0,2 mm, largura = 30,7±0,2 mm e espessura = 26,2±0,2 mm). Além disso, observou-se divergência no tipo de predominância do ápice das folhas e tamanho do hilo das sementes das espécies vegetais consideradas neste estudo. A reserva orgânica majoritária presente nas sementes das espécies do gênero *Carapa* estudadas são os lipídeos, superando 50% da composição centesimal nas sementes. A procedência das matrizes parece ter sido fator determinante para indicar diferenças no teor de lipídeos e de umidade. Amostras coletadas no Acre apresentaram valores superiores para o teor de lipídeos (55,6±3,5%). *C. vasquezii* de procedência do Amazonas apresentou maior umidade das sementes (52,8±5,5%) e também maior teor de açúcares solúveis (15,4±0,8%). Com relação ao perfil lipidômico, *C. guianensis* apresentou maiores concentrações de oleato e palmitato de metila, seguido de ácido oleico, e a maior concentração de ácido palmítico e estereato de metila foram destaques em *C. vasquezii*. Neste trabalho, verificou-se também que diferentes espécies quando em ambientes distintos de crescimento podem compartilhar similaridade quanto à concentração de reservas primárias (amido, açúcares solúveis, teor de lipídeos e de proteínas). Portanto, espécies do gênero *Carapa* que ocorrem na Amazônia apresentam divergência morfológica e bioquímica que podem estar associadas à pressão seletiva do ambiente de crescimento, e também com as respostas de aclimatação inerente de cada espécie. Esses resultados podem fundamentar a caracterização de espécies do gênero *Carapa*.

Palavras-chave: Andiroba; óleo vegetal; perfil lipidômico; reservas primárias.

Morphometric divergence and aspects of primary metabolism in *Carapa* species (Meliaceae)

ABSTRACT
Species of the genus *Carapa* have morphological similarity being considered cryptic, making it difficult to identify. In this sense, the use of morphological and biochemical markers can contribute together to minimize uncertainties in the definition of these species. The objective of this chapter was to perform the morphometric characterization and the primary reserves of quiescent seeds of two plant species of the genus *Carapa* (*Carapa guianensis* Aubl. and *Carapa vasquezii* Kenfack) that occur in Amazonian as a way of elucidating interspecific divergences and consolidating studies on this taxonomic group. Seeds of 33 matrices of *C. guianensis* and 15 matrices of *C. vasquezii* were collected in Acre and Amazonas states. The lipid profile of the extracted oils and the chemical composition of the seeds, leaves and soil of the growth environment were carried out from samples of the two species of *Carapa*. Seeds of *C. guianensis* presented larger dimensions when compared to *C. vasquezii* (length = 33.9 ± 0.2 mm, width = 30.7±0.2 mm and thickness = 26.2±0.2 mm). In addition, it was observed divergence in the type of leaf apex predominance and seed hilo size of the plant species considered in this study. The majority organic reserve present in the seeds of the species of the genus *Carapa* studied are the lipids, surpassing 50% of the centesimal composition in the seeds. The origin of the matrices seems to have been a determining factor to indicate differences in lipid and moisture content, where samples collected in Acre state presented higher values for lipid content (55.6±3.5%). *C. vasquezii* from Amazonas state showed higher seed moisture (52.8±5.5%) and also higher soluble sugar content (15.4±0.8%). With respect to the lipid profile, *C. guianensis* presented higher concentrations of oleate and methyl palmitate, followed by oleic acid, and the highest concentration of palmitic acid and methyl stearate were highlights in *C. vasquezii*. In this work, it was also determined that different species when in distinct growth environments may share similarity in the concentration of primary reserves (starch, soluble sugars, lipid and protein content). Therefore, plant species of *Carapa* occurring in Amazonian region show morphological and biochemical divergence that are associated with the selective pressure of the growth environment, as well as with the acclimation and adaptation responses inherent to each species. These results may support the characterization of *Carapa* species.

Keywords: Andiroba; Lipid profile; Primary reserves; Vegetable oil.

1. INTRODUÇÃO

As características morfofisiológicas dos organismos que compõem as florestas devem ser determinadas, tendo em vista o aproveitamento correto desses recursos no sentido de direcionar conhecimentos sobre a prospecção de novas substâncias e geração de patentes, agregando valor aos recursos florestais (Amaral e Fierro, 2013). Assim, a caracterização de espécies vegetais no intuito de definir aspectos tanto morfológicos quanto fisiológicos e bioquímicos em espécies de múltiplos usos é um passo importante no sentido de delimitar padrões de divergência ou similaridade interespecífica.

Devido à diversidade vegetal e à similaridade morfológica em espécies de florestas tropicais, há necessidade de realização de estudos sobre os aspectos relacionados à morfometria (Camara *et al*., 2009) e à expressão da diversidade genética por meio de características bioquímicas (Milhomem-Paixão *et al*., 2016), utilizando procedimentos sistemáticos modernos que possam auxiliar a definição precisa de características interespecíficas (Chiou e Hastorf, 2014). Aspectos taxonômicos ligados à morfologia, à ecofisiologia e à diversidade genética de espécies tropicais ainda são produtos de incertezas, principalmente com relação à ocorrência de um complexo de espécies pertencentes ao gênero *Carapa* de ampla distribuição na região tropical (Kenfack, 2011a, 2011b; Duminil *et al*., 2012; Aragão *et al*., 2014).

O estudo das características morfométricas, assim como dos componentes do metabolismo primário e suas implicações na germinação de espécies arbóreas contribuirão para a compreensão das formas e/ou estratégias de crescimento vegetal, permitindo a relação com dados de produtividade das espécies (Condé *et al*., 2013). Além disso, ainda podem auxiliar na identificação taxonômica (Vieira e Carvalho, 2009; Barreto e Ferreira, 2011), uma vez que possibilitam a descrição e a caracterização dos diversos genótipos existentes, podendo convergir para a conservação de recursos florestais e para a descoberta de novas substâncias de potencial uso para bioindústria.

Embora seja reconhecida a importância da caracterização morfométrica e dos componentes do metabolismo primário na compreensão da germinação, crescimento e estabelecimento dos indivíduos arbóreos (Shankar e Synrem, 2012), não se reconhecem estudos dessa natureza que possam contribuir para a caracterização de espécies do gênero *Carapa* que ocorrem na Amazônia, auxiliando na caracterização taxonômica, gerando informações para o entendimento das estratégias durante a germinação e o crescimento inicial das espécies vegetais (Aragão *et al*., 2014). Segundo Kenfack (2011c), ocorrem três espécies vegetais pertencentes ao gênero *Carapa* na Amazônia brasileira, e dentre essas espécies, a *Carapa vasquezii* Kenfack é considerada uma nova espécie descrita nessa região (Kenfack, 2011a).

Divergências morfométricas, bioquímicas e o potencial germinativo podem ser resultantes das respostas dos indivíduos às condições ambientais associadas à variabilidade genética (Dranski *et al*., 2010), uma vez que algumas espécies possuem pré-disposição a essas variações (Shankar e Synrem, 2012). No entanto, espécies do gênero *Carapa* apresentam plasticidade às variações de estresse apresentando tolerância a diferentes condições ambientais (Gonçalves *et al*., 2009; Aragão *et al*., 2014).

Este trabalho teve como objetivo realizar a caracterização morfométrica e dos aspectos do metabolismo com ênfase nas reservas primárias em sementes de espécies do gênero *Carapa* (*Carapa guianensis* Aubl. e *Carapa vasquezii* Kenfack) que ocorrem na Amazônia no sentido de contribuir para elucidação das divergências interespecíficas e consolidar estudos sobre esse grupo taxonômico.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de sementes foram coletadas nas regiões de Mâncio Lima – Acre (16 matrizes de *C. guianensis*) e Manaus – Amazonas (17 matrizes de *C. guianensis* e 15 matrizes de *C. vasquezii*) – Figura 1, contemplando 48 matrizes de duas espécies do gênero *Carapa* (*C. guianensis* e *C. vasquezii*) que apresentam divergência morfológica (Kenfack, 2011a).

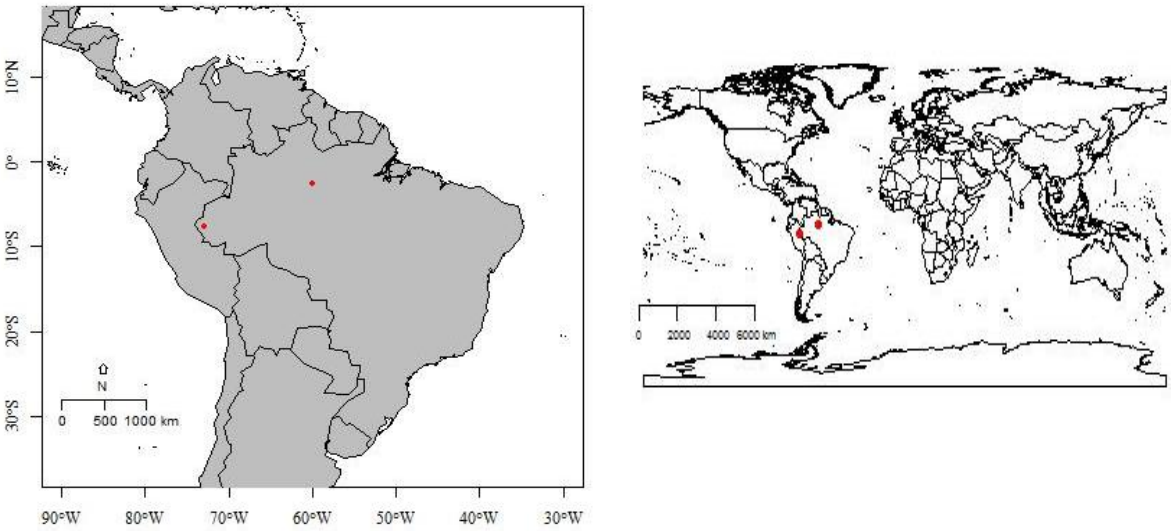

Figura 1: Localização das áreas de coleta de sementes de espécies do gênero *Carapa*.

Neste trabalho, também foram realizadas coletas de materiais férteis para identificação botânica e análise nutricional das plantas. As exsicatas foram depositas no herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, sob o número de tombamento 261947 (*C. guianensis*) e 261953 (*C. vasquezii*). Imagens ilustrativas do material botânico das duas espécies podem ser observadas na Figura 2.

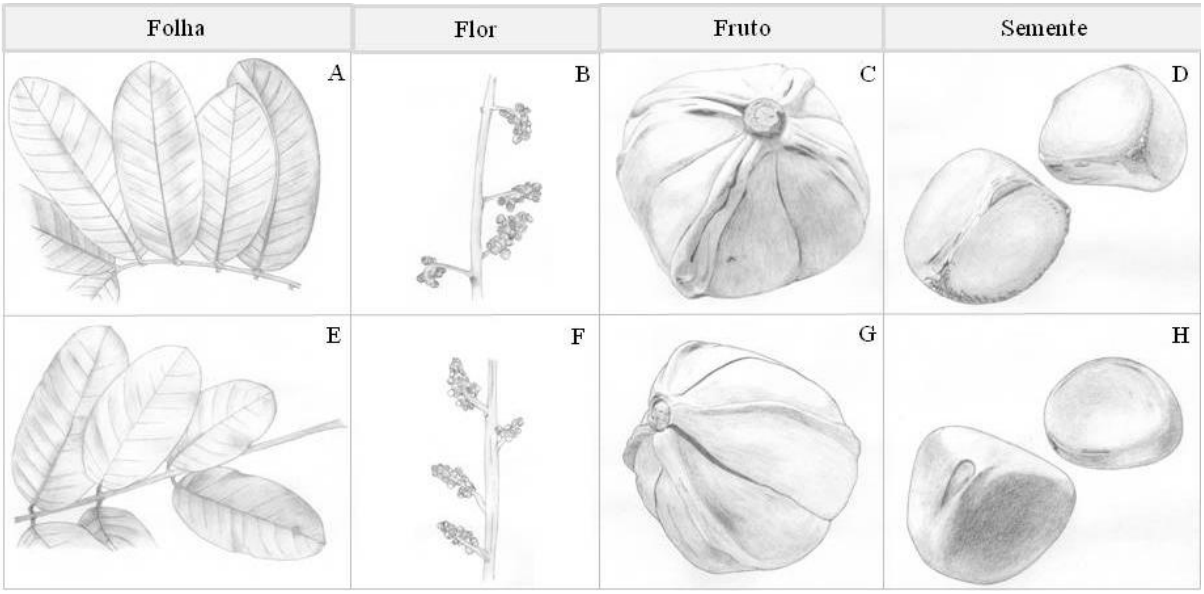

Figura 2: Material botânico utilizado como fonte de caracterização das espécies do gênero *Carapa*.

*Folha (A), flor (B), fruto (C) e sementes (D) de *C. guianensis*. Folha (E), flor (F), fruto (G) e sementes (H) de *C. vasquezii*.

2.1. Coleta de amostras de sementes e solos

Sementes de 33 matrizes de *C. guianensis* e 15 matrizes de *C. vasquezii* foram coletadas nos estados do Acre e do Amazonas (Figura 1). A amostragem das sementes foi formada por lotes contendo 20 unidades de sementes de cada uma das matrizes, considerando as respectivas regiões de coletas. Consideraram-se sementes e folhas em condições fitossanitárias visualmente adequadas (sem ataques de pragas ou doenças). As sementes coletadas foram triadas, acondicionadas em sacos de papel e encaminhadas ao Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal do INPA em Manaus, Amazonas, para a instalação dos experimentos. Folhas e material vegetal fértil coletados foram prensados para confecção de exsicatas. As folhas utilizadas para análises químicas foram acondicionadas em sacos de papel e, posteriormente, lavadas com água destilada, secas a 65°C em estufa de ar forçada, e, então, trituradas em moinho analítico (Ika-Werke/M20) para a obtenção de material finamente pulverizado. O solo também foi coletado do ambiente de crescimento das matrizes para fins de caracterização química do sítio. As análises químicas de macro e micro nutrientes de folhas, sementes e solos foram realizadas de acordo com metodologia proposta pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa, 1999).

2.2. Caracterização química do sítio de crescimento, folhas e conteúdo das sementes em espécies de andirobeiras (*Carapa* spp.)

A amostragem de solo foi realizada em duas profundidades (0-20 e 20-40 cm). Duas repetições de cada profundidade foram coletadas, e cada amostra foi formada por três sub-amostras. Para as coletas de solos foi considerado, no máximo, um raio de cinco metros de distância de cada planta matriz.

Para a avaliação da composição química do solo, foram determinadas as concentrações dos macronutrientes (C, N, P, K, Ca e Mg), micronutrientes (Fe, Mn e Zn), e também, alumínio (Al) e o pH do solo em água. O N total foi determinado conforme o método de Kjeldahl, o qual é fundamentado na conversão do N em sulfato de amônio por meio de oxidação com uma mistura de sulfato de cobre ($CuSO_4$), ácido sulfúrico (H_2SO_4) e selenito de sódio (Na_2SO_4), seguida de destilação a vapor e titulação em meio ácido (Embrapa, 1999).

O C orgânico foi determinado de acordo com o método de Walkley & Black, usando o dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) para oxidação da matéria orgânica em meio sulfúrico, empregando-se como fonte de energia o calor desprendido do ácido sulfúrico e/ou aquecimento. O excesso de dicromato após a oxidação foi titulado com solução de sulfato ferroso amoniacal 0,1 N (Embrapa, 1999).

A determinação de cálcio (Ca), de magnésio (Mg) e de alumínio trocável (Al) foram realizadas em solução de cloreto de potássio (KCl) 1 M. O Ca e Mg foram determinados por espectrometria de absorção atômica (EAA) e o Al pelo método volumétrico por titulação com hidróxido de sódio (NaOH) (Embrapa, 2009).

Os macronutrientes fósforo disponível (P), potássio trocável (K) e os micronutrientes ferro (Fe), zinco (Zn) e manganês (Mn) foram extraídos em solução de Mehlich 1 M (HCl 0,05 M + H_2SO_4 0,0125 M). O P disponível foi determinado por espectrofotometria (λ = 660 nm), por meio da leitura da intensidade da cor do complexo fosfomolíbdico. O K trocável e os micronutrientes foram determinados por espectrometria de absorção atômica (Perkin–Elmer 1100B).

Os valores de pH em água foram determinados com base na medição eletroquímica da concentração efetiva de íons H^+ na solução do solo, por meio de eletrodo combinado, imerso em suspensão solo/água na proporção 1:2,5. A leitura foi realizada no potenciômetro com eletrodo combinado, após 1 minuto de agitação da mistura, seguida por 1 hora de repouso (Embrapa, 2009).

A quantificação do fósforo (P) no material vegetal foi realizada em espectrofotômetro Shimadzu UV-VIS-120-01 (λ = 660 nm) (Murphy e Riley, 1962). Já a quantificação do nitrogênio foi realizada pelo método de Kjeldahl, utilizando procedimentos descritos no Manual de Análises Químicas de Solos, Plantas e Fertilizantes da Embrapa (1999), após secagem do material em estufa a 65°C durante 72 horas. Amostras de 100 mg do material desengordurado das sementes e folhas foram colocadas em tubo de ensaio com 5,0 mL de solução digestora. A digestão da amostra foi realizada em bloco digestor a 350°C até o material apresentar-se incolor. Em seguida, realizou-se a destilação adicionando-se 15 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 40% após mistura da amostra em 20 mL de água destilada. O destilado foi coletado em becker contendo 10 mL da solução receptora de ácido bórico (H_3BO_3). A destilação foi finalizada até o volume do becker completar 60 mL de uma solução com coloração verde menta, indicando a presença de nitrogênio na amostra. A titulação foi realizada utilizando ácido sulfúrico a 0,01 N.

Na Tabela 1, são apresentados os valores da caracterização química do solo de crescimento, folhas e sementes de *C. guianensis* e *C. vasquezii* de coletas realizadas nos estados do Acre e Amazonas.

Tabela 1: Resultados das análises químicas de solo do ambiente de crescimento, folhas e sementes de matrizes de *C. guianensis* e *C. vasquezii* coletados nos estados do Acre e Amazonas, Brasil.

(Continua)

Material	Profundidade (cm)	sp	Ambiente	Local	pH	C (%)	N	P	K	Na	Ca	Mg	Fe	Zn	Mn	Cu
							g.kg^{-1}						mg.kg^{-1}			
Solo	0-20	Cg	Terra firme	AM	3,72	26,51	1,85	5,00	28,00	10,00	0,14	0,14	313,00	0,88	1,28	0,12
	20-40	Cg	Terra firme	AM	3,68	19,73	1,42	3,00	19,00	6,00	0,07	0,08	324,00	0,4	0,83	0,12
Solo	0-20	Cg	Terra firme	AM	3,88	28,55	2,16	3,00	29,00	13,00	0,51	0,11	256,00	0,56	1,98	0,16
	20-40	Cg	Terra firme	AM	3,75	24,36	1,79	2,00	20,00	8,00	0,52	0,11	236,00	0,38	1,56	0,13
Solo	0-20	Cg	Terra firme	AM	3,9	35,67	2,26	3,00	28,00	13,00	0,08	0,10	235,00	0,59	0,91	0,33
	20-40	Cg	Terra firme	AM	4,12	23,54	1,66	2,00	18,00	12,00	0,06	0,08	286,00	0,28	0,63	0,11
Solo	0-20	Cg	Terra firme	AM	3,97	41,7	2,52	10,00	56,00	26,00	0,27	0,20	244,00	1,48	3,12	0,24
	20-40	Cg	Terra firme	AM	3,95	31,78	1,96	6,00	30,00	13,00	0,28	0,17	297,00	0,96	2,33	0,17
Solo	0-20	Cg	Terra firme	AM	3,75	26,01	1,66	4,00	24,00	9,00	0,11	0,12	273,00	0,74	1,03	0,12
	20-40	Cg	Terra firme	AM	3,82	18,59	1,30	3,00	17,00	6,00	0,08	0,09	297,00	0,55	0,91	0,10
Solo	0-20	Cg	Terra firme	AC	4,84	9,24	0,69	35,00	96,00	2,00	1,36	0,32	88,00	4,02	14,82	0,81
	20-40	Cg	Terra firme	AC	4,63	11,07	0,87	33,00	104,00	3,00	1,59	0,38	96,00	4,51	16,95	0,74
Solo	0-20	Cg	Várzea	AC	3,92	43,69	4,07	10,00	94,00	6,00	0,34	0,49	636,00	2,43	21,87	1,01
	20-40	Cg	Várzea	AC	3,98	33,02	3,11	7,00	76,00	5,00	0,13	0,33	604,00	1,96	11,80	1,00
Solo	0-20	Cg	Terra firme	AC	4,90	10,31	0,78	35,00	106,00	3,00	1,80	0,39	72,00	4,45	15,28	0,75
	20-40	Cg	Terra firme	AC	4,57	29,83	2,74	13,00	114,00	27,00	24,00	6,45	53,00	5,84	216,26	1,41

Tabela 1: Resultados das análises químicas de solo do ambiente de crescimento, folhas e sementes de matrizes de *C. guianensis* e *C. vasquezii* coletados nos estados do Acre e Amazonas, Brasil.

(Continuação)

Material	Profundidade (cm)	sp	Ambiente	Local	pH	C (%)	N	P	K	Na	Ca	Mg	Fe	Zn	Mn	Cu
							g.kg^{-1}						mg.kg^{-1}			
Solo	0-20	Cg	Várzea	AC	4,70	32,48	3,02	13,00	125,00	23,00	22,70	6,05	61,00	6,46	220,13	1,45
	20-40	Cg	Várzea	AC	4,91	14,76	1,56	8,00	103,00	28,00	24,60	6,80	30,00	4,39	160,00	1,34
Solo	0-20	Cg	Várzea	AC	4,06	25,99	2,58	5,00	62,00	4,00	0,10	0,30	427,00	1,68	8,13	0,82
	20-40	Cg	Várzea	AC	3,71	51,75	4,30	12,00	94,00	6,00	0,25	0,48	752,00	2,32	14,43	1,14
Solo	0-20	Cv	Terra firme	AM	4,39	18,09	1,02	3,00	21,00	11,00	0,40	0,15	160,00	1,33	1,77	0,21
	20-40	Cv	Terra firme	AM	4,35	13,77	0,89	2,00	17,00	8,00	0,36	0,11	119,00	1,73	1,37	0,19
Solo	0-20	Cv	Terra firme	AM	4,74	27,95	1,89	2,00	28,00	14,00	0,10	0,12	186,00	0,19	1,65	0,13
	20-40	Cv	Terra firme	AM	3,79	23,36	1,75	2,00	20,00	11,00	0,06	0,08	212,00	0,15	1,95	0,09
Solo	0-20	Cv	Terra firme	AM	3,70	33,14	2,16	6,00	35,00	9,00	0,12	0,14	313,00	0,55	2,61	0,14
	20-40	Cv	Terra firme	AM	3,71	24,72	1,67	4,00	22,00	6,00	0,06	0,09	263,00	0,28	2,25	0,15
Solo	0-20	Cv	Terra firme	AM	3,95	42,55	2,88	11,00	69,00	19,00	0,38	0,29	216,00	1,22	4,42	0,51
	20-40	Cv	Terra firme	AM	4,17	18,07	1,32	3,00	17,00	4,00	0,12	0,15	197,00	0,19	2,03	0,24
Solo	0-20	Cv	Terra firme	AM	3,86	40,78	2,42	9,00	44,00	17,00	0,46	0,21	191,00	1,22	2,94	0,17
	20-40	Cv	Terra firme	AM	3,99	27,18	1,79	5,00	30,00	12,00	0,13	0,12	248,00	0,72	1,95	0,48

Tabela 1: Resultados das análises químicas de solo do ambiente de crescimento, folhas e sementes de matrizes de *C. guianensis* e *C. vasquezii* coletados nos estados do Acre e Amazonas, Brasil.

(Continuação)

Material	sp	Local	C	N	P	K	Ca	Mg	Cu	Fe	Mn	Zn
			%	g kg-1					mg kg-1			
Folha	Cg	AM	52,03	11,54	0,76	4,38	22,55	1,53	9,20	55,24	15,53	18,62
Folha	Cg	AM	51,67	11,46	0,72	1,99	16,53	2,53	11,08	67,91	19,13	18,18
Folha	Cg	AM	52,47	11,04	0,78	4,91	10,78	2,12	8,00	45,72	11,62	13,31
Folha	Cg	AM	52,99	10,13	0,84	2,7	8,35	1,49	6,56	48,19	6,66	21,31
Folha	Cg	AM	50,55	11,94	0,72	2,55	11,21	1,19	10,14	59,98	10,93	17,35
Folha	Cg	AC	49,83	9,21	1,15	6,38	12,44	1,27	7,61	42,46	20,28	31,11
Folha	Cg	AC	49,99	10,63	0,63	4,79	6,09	1,24	15,42	59,26	45,51	27,67
Folha	Cg	AC	50,07	11,50	1,02	8,77	4,56	2,65	7,56	47,82	24,79	19,38
Folha	Cg	AC	49,24	10,71	0,85	7,44	6,30	2,22	11,20	357,50	49,34	25,40
Folha	Cg	AC	47,68	10,05	0,76	4,62	9,20	1,39	15,77	221,60	36,91	19,76
Folha	Cv	AM	50,91	12,04	0,76	3,44	13,15	1,12	8,07	26,36	12,24	21,94
Folha	Cv	AM	47,92	13,60	0,81	5,74	5,25	1,6	11,63	40,07	13,77	16,93
Folha	Cv	AM	50,39	12,06	0,71	2,11	6,74	1,53	4,91	43,68	9,86	11,50
Folha	Cv	AM	49,71	10,19	0,69	5,43	6,43	2,08	12,00	72,12	19,92	19,83
Folha	Cv	AM	50,39	9,03	0,82	3,86	10,04	1,72	7,55	22,99	15,13	21,83
Folha	Cv	AM	53,27	14,06	0,81	4,01	3,23	1,96	9,31	62,05	11,27	14,17

Tabela 1: Resultados das análises químicas de solo do ambiente de crescimento, folhas e sementes de matrizes de *C. guianensis* e *C. vasquezii* coletados nos estados do Acre e Amazonas, Brasil.

(Conclusão)

Material	sp	Local	C	N	P	K	Ca	Mg	Cu	Fe	Mn	Zn
			%	g kg^{-1}					mg kg^{-1}			
Semente	Cg	AM	54,62	10,92	2,60	15,50	1,07	0,97	8,79	10,62	3,63	14,43
Semente	Cg	AM	54,90	10,89	2,70	15,98	1,10	1,00	9,00	12,32	3,65	14,65
Semente	Cg	AM	54,06	10,69	2,76	15,93	1,06	1,02	9,34	15,61	3,55	14,98
Semente	Cg	AM	51,07	10,48	2,69	16,02	1,06	0,94	9,76	9,44	3,28	14,91
Semente	Cg	AM	55,10	10,52	2,67	15,80	1,06	0,98	9,33	13,66	3,18	14,29
Semente	Cg	AC	54,54	11,63	2,92	21,78	1,19	1,66	16,44	22,84	9,12	18,79
Semente	Cg	AC	52,67	11,59	2,93	21,20	1,13	1,67	15,78	19,58	9,00	18,11
Semente	Cg	AC	52,31	11,25	2,97	21,88	1,20	1,70	16,14	20,20	9,14	18,04
Semente	Cg	AC	54,26	11,46	2,81	21,10	1,08	1,56	15,59	23,23	8,27	17,71
Semente	Cg	AC	54,58	11,96	2,93	20,65	1,26	1,63	15,71	17,84	9,25	18,57
Semente	Cv	AM	48,68	13,71	2,86	17,05	1,87	1,23	17,78	24,68	5,81	21,7
Semente	Cv	AM	48,28	14,23	2,86	17,79	2,11	1,31	16,84	29,80	5,82	21,82
Semente	Cv	AM	47,72	14,14	2,85	19,23	2,02	1,34	18,20	26,47	5,72	21,5
Semente	Cv	AM	47,88	13,749	2,86	17,08	1,88	1,27	18,15	31,35	6,12	21,97
Semente	Cv	AM	48,68	14,10	2,81	17,61	1,92	1,29	17,47	24,66	5,99	22,29

*Cg: *C. guianensis*; Cv: *C. vasquezii*; AC: Acre; AM: Amazonas; pH: Potencial de hidrogênio; C: Carbono; N: Nitrogênio; P: Fósforo; K: Potássio; Na: Sódio; Ca: Cálcio; Mg: Magnésio; Fe: Ferro; Zn: Zinco; Mn: Manganês; Cu: Cobre.

2.3. Caracterização morfométrica e análise dos componentes do metabolismo primário em sementes de *C. guianensis* e *C. vasquezii*

Neste estudo, foram determinadas as dimensões de frutos e sementes para a análise de morfometria das duas espécies pertencentes ao gênero *Carapa* (*C. guianensis* e *C. vasquezii*). As medições foram realizadas considerando-se o *n* amostral de 10 frutos e sementes, escolhidos ao acaso para cada matriz das espécies e foram obtidos também os valores de massa fresca de frutos e sementes, além do teor de umidade das sementes (Brasil, 2009).

Para as dimensões do comprimento, foi considerada a medida entre a base e o ápice da semente. Para a largura, considerou-se a medida do eixo central em contraposição ao comprimento, e a espessura da semente, por sua vez, foi considerada como a medida diametricamente oposta à largura (Ferraz *et al*., 2002). As medições foram realizadas utilizando paquímetro digital com precisão de 0,01 mm.

A caracterização dos componentes do metabolismo primário foi realizada por meio da análise de proteínas, teor de carboidratos (açúcares solúveis e amido) e teor de lipídeos, a partir do material sólido pulverizado das sementes. As reservas de lipídeos foram extraídas partindo da massa seca em estufa a 65±1°C que foi triturada em moinho analítico (Ika-Werke/M20). Para a extração dos lipídeos, foi utilizado solvente orgânico (hexano) no aparelho *Soxleht*, com tempo de refluxo de 6 horas em temperatura de 80±1°C, utilizando cartuchos contendo de 2 a 2,5 g de massa seca das sementes.

A caracterização do perfil lipidômico de amostras de óleos de espécies vegetais do gênero *Carapa* foi realizada nos Laboratórios de Investigação Sistemática em Biotecnologia e Biodiversidade Molecular da Univisersidade Federal do Pará – UFPA. A técnica utilizada foi a Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (Milhoem-Paixão *et al*., 2016). Para a identificação dos compostos, os óleos fixos foram submetidos ao processo de transesterificação em meio alcalino, ou seja, transformados em ésteres metílicos de ácidos graxos (Chaves *et al*., 2004).

A reação de transesterificação em meio alcalino foi adaptada de Geris *et al*. (2007). Alíquotas de 10 mg de cada amostra foram transferidas para tubos cônicos de polipropileno com tampa, devidamente identificados (TBx-1), seguido de aquecimento por 2 minutos em banho-maria a 40°C. A cada tubo, foi adicionado 100 µL de metóxido de potássio 2N e mantido em banho ultrassônico por 2 minutos a 30ºC±2. Em seguida, foram adicionados 200 µL de n-hexano, foram, então, agitados suavemente por 10 segundos e centrifugados por 1

minuto a 10.000 rpm. A fase orgânica de cada amostra foi transferida para novos tubos (TBx-2).

Um volume de 110 µL de HCl 2N foi adicionado nos tubos (TBx-1) de cada amostra, agitando-se novamente por 10 segundos. Posteriormente, adicionou-se 200 µL da mistura CH_2Cl_2:n-hexano na proporção de 1:1 (v/v), e a solução foi novamente agitada por 10 segundos. Adicionou-se 1 mL de água deionizada para retirar o excesso de ácido da fase orgânica, e centrifugou-se nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante de cada solução foi transferido para novos tubos (TBx-2) e as amostras foram concentradas com fluxo de gás inerte a 35ºC/5psi/20 minutos. As amostras concentradas foram submetidas ao processo de derivatização com trifluoroacetamida (BSTFA)+ trimetil-clorosilano 1% (TMCS).

A derivatização das amostras foi realizada com N,O-bis (trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA) + 1% de trimetil-clorosilano (TMCS) para simular as moléculas livres que não foram transesterificadas e as demais que apresentavam hidroxilas livres. Nas amostras dos tubos (TBx-2), foram adicionadas 50 µL do derivatizante e os tubos foram incubados em banho de ultrassom por 20 minutos a 30ºC. Em seguida, os solventes foram evaporados a 35ºC/5psi/20 minutos e, posteriormente, adicionou-se 500 µL de n-hexano: CH_2Cl_2 na proporção de 1:1 (v/v) aos respectivos tubos, agitados suavemente por 10 segundos e o conteúdo transferido para frascos de vidro de 2 mL com tampa e septo para análises por Cromatografia Gasosa Acoplada ao Espectrômetro de Massa – CG/EM.

As análises por espectrometria de massas foram realizadas em um Cromatógrafo Gasoso (CG), ThermoScientific Trace 1300 acoplado a um espectrômetro de massa (EM), ThermoScientific MS-ISQ Single Quadrupolo com autoamostrador AI 1310, equipado com coluna capilar ZB-5HT (30m x 0,25mm x 0,1µm) ou DB-5 (15m x 0,25mm x 0,1µm). Nessas análises, foi utilizado gás hélio como carreador a um fluxo de 1 $mL.min.^{-1}$, com injeção de amostra de 1,0 µL no modo *splitless*. O injetor foi conduzido em temperatura de 220°C e a programação de temperatura do forno iniciou com 50 até 200ºC (8ºC/minuto), mantendo-se por 1 minuto, elevando-se até 300ºC (15ºC/minuto), mantendo durante 5 minutos, e elevando-se novamente até 350ºC (15ºC/minuto), permanecendo por mais 9 minutos. O MS-ISQ foi programado com interface a 280°C, fonte de ionização a 280°C, faixa de massa (40-1000 Da) com varredura de 1scan/s e ionização eletrônica a 70 eV. As identificações das substâncias foram realizadas por meio da comparação dos espectros de massas com os das bibliotecas comerciais NIST2011, WILEY2009, FAMES2011 e tempo de retenção de cada composto presente nas amostras de óleo.

A extração proteica foi realizada em condição salina utilizando NaCl 0,15 M (10% p/v). A extração ocorreu sob homogeneização do material em solução durante duas horas em temperatura ambiente (26±3ºC), seguida de centrifugação a 11.000 *g* durante 20 minutos a 10ºC. O sobrenadante foi dialisado em água destilada durante 72 horas, para retirada do sal e, em seguida, foi liofilizado durante 96 horas, possibilitando a obtenção do extrato proteico.

A quantificação de proteínas solúveis foi a partir de 2 mg de extrato proteico diluído em 1 mL de água ultrapura. Após a diluição do material, a concentração de proteínas foi estimada a partir da incubação de 100 µL das amostras em 3 mL do reagente Bradford (Sigma) durante 10 minutos em temperatura ambiente (26 ± 3ºC), utilizando-se albumina sérica bovina (BSA, BioAgency), segundo método descrito por Bradford (1976). O teor de proteínas solúveis foi determinado por meio de leituras espectrofotométricas a 595 nm (UV /Visível Ultrospec 2100 pro, Armesham Biosciences).

Os carboidratos foram extraídos conforme metodologia descrita por Black *et al*. (1996), com modificações. Após a extração dos lipídeos, amostras de 200 mg de material desengordurado foram homogeneizadas em 1 mL de álcool 80% e, posteriormente, mantidas em banho-maria a 75°C durante 30 minutos. Em seguida, foram centrifugadas a 10.000 rpm durante cinco minutos, retirando-se a solução sobrenadante, repetindo-se esse processo três vezes.

As soluções sobrenadantes retiradas foram misturadas em amostras únicas que, posteriormente, foram secas em estufa a 50°C até total evaporação do álcool, e então, ressuspendidas em 1 mL de água ultrapura para as análises de açúcares solúveis totais. Os precipitados, após secos em estufa, foram utilizados para extração e quantificação de amido.

A quantificação de açúcares solúveis foi realizada a partir da diluição de 20 µL da amostra proveniente do sobrenadante da extração de carboidratos, adicionando-se 80 µL de água ultrapura. Dessa diluição inicial, retirou-se 20 µL e adicionou-se 980 µL de água ultrapura, 500 µL de fenol 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico (1 M).

A extração do amido foi realizada a partir de 20 mg da amostra do precipitado originário da extração inicial de carboidratos, o qual foi colocado em microtubos, adicionando-se 1 mL de ácido perclórico 35% e, posteriormente, foram homogeneizados em *vortex* durante 15 minutos para digestão do amido. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm, durante cinco minutos. A quantificação do amido foi realizada em alíquotas de 10 µL do sobrenadante, adicionadas à 990 µL de água destilada, 500 µL de fenol 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico absoluto. Os açúcares solúveis e o amido foram

quantificados por espectrofotometria com leitura a 490 nm, utilizando-se a curva padrão de glicose (Sigma), conforme metodologia descrita por Dubois *et al*. (1956).

2.4. Delineamento experimental e análises estatísticas

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, e o esforço amostral foi subdivido em dois experimentos, a saber: - Experimento I: espécies diferentes (*C. guianensis* e *C. vasquezii*) foram comparadas na mesma área, considerando variáveis morfométricas e massa úmida. - Experimento II: uma abordagem para investigar a influência de diferentes áreas de coletas (Acre e Amazonas), considerando a variável teor de reservas primárias (proteínas, amido, açúcares solúveis e lipídeos) sobre a espécie *C. guianensis*.

As análises morfométricas das sementes foram obtidas pela avaliação de 10 frutos coletados de cada matriz (16 matrizes de *C. guianensis* de procedência do Acre, 17 matrizes de *C. guianensis* e 15 de *C. vasquezii* do Amazonas). Os dados obtidos foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) (Experimento I). A dimensionalidade dos dados foi reduzida através da aplicação de uma Análise de Componentes Principais (PCA) para as medidas morfométricas (Experimento I), e também para as variáveis correspondentes aos metabólitos primários e dados dos nutrientes minerais (Experimento II). Outra análise utilizada foi o agrupamento por meio da análise de cluster considerando a matriz de distância Euclidiana para verificar a relação das variáveis (teor de lipídeos, amido, açúcares solúveis e massa seca das sementes) para as duas espécies (Experimento II). Neste trabalho, também foi aplicada uma Análise de Variância Multivariada (MANOVA) para verificar a influência conjunta das variáveis bioquímicas em função da procedência de coletada das sementes, considerando $p \leq 0,05$ (Experimento II). Foi aplicado também o teste de Mantel para verificar a correlação entre as matrizes de similaridade (Manly, 1997) considerando nutrientes do solo, folhas e sementes (Telles *et al*., 2001), no intuito de verificar significância na compartimentalização e alocação de nutrientes pelas plantas sob influência dos diferentes sítios de crescimento (Experimento II). Nesse caso, a permutação considerada para o ajuste aleatório dos dados foi de 10.000 reamostragens.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No geral, *Carapa guianensis* apresentou maiores valores médios para as variáveis morfométricas das sementes consideradas neste estudo quando comparada com *C. vasquezii*, apresentando dimensões de comprimento de 32,9±1,4 mm ($F_{30,1}$=1,9; *p*=0,2), largura 29,1±0,9 mm ($F_{30,1}$=2,4; *p*=0,1), espessura 27,8±1,7 mm ($F_{30,1}$=6,5; *p*=0,02), hilo 25,7±0,6 mm ($F_{20,1}$=284; *p*<0,001) e massa úmida 16,5±1,7 g ($F_{30,1}$=9,1; *p*=0,005) (Tabela 1). Com relação aos valores médios das variáveis analisadas para os frutos, novamente *C. guianensis* apresentou valores superiores para comprimento 71,7±2,0 mm ($F_{18,1}$=0,6; *p*=0,4), largura 76,3±2,6 mm ($F_{18,1}$=6,5; *p*=0,02), espessura 79,3±2,1 mm ($F_{18,1}$=19,3; *p*<0,001) e massa úmida ($F_{18,1}$=6,6; *p*=0,02) (Tabela 2).

Tabela 2: Valores médios para variáveis morfométricas e massa úmida em sementes e frutos de espécies do gênero *Carapa*.

Valores das variáveis para sementes					
Espécie	**Comprimento (mm)**	**Largura (mm)**	**Espessura (mm)**	**Hilo (mm)**	**Massa úmida (g)**
C. guianensis	32,9±1,4 n.s	29,1±0,9 n.s	27,8±1,7*	25,7±0,6***	16,5±1,7 **
C. vasquezii	30,3±1,4 n.s	27,0±1,1 n.s	22,8±0,8*	11,4±0,6***	10,4±0,8**
Valores das variáveis para frutos					
Espécie	**Comprimento (mm)**	**Largura (mm)**	**Espessura (mm)**	**Massa úmida (g)**	
C. guianensis	71,7±2,0n.s	76,3±2,6*	79,3±2,1***	219,5±19,9*	
C. vasquezii	68,3±3,6n.s	66,6±2,7*	63,6±2,7***	147,6±19,7*	

* p ≤ 0,01; ** p ≤ 0,001; *** p = 0; n.s = não significativo com p > 0,05.

As folhas de espécies do gênero *Carapa* são caracterizadas como do tipo compostas e folíolos com ápice predominantemente acuminado ou levemente acuminado a raramente arredondado em *C. guianensis* (Figura 3A). As flores em *Carapa* são consideradas sésseis ou subsséis, glabras, sub-globosas, de cor branca a creme e levemente perfumadas (Ferraz *et al*., 2003), são predominantemente tretâmeras em *C. guianensis* e *C. vasquezii*. Os frutos são globosos, de coloração marrom e apresentam excrescência incolor com aspecto verrugoso

(Kenfack, 2011c). Sementes em *Carapa guianensis* apresentam coloração marrom claro de aspecto rígido (Figura 3D).

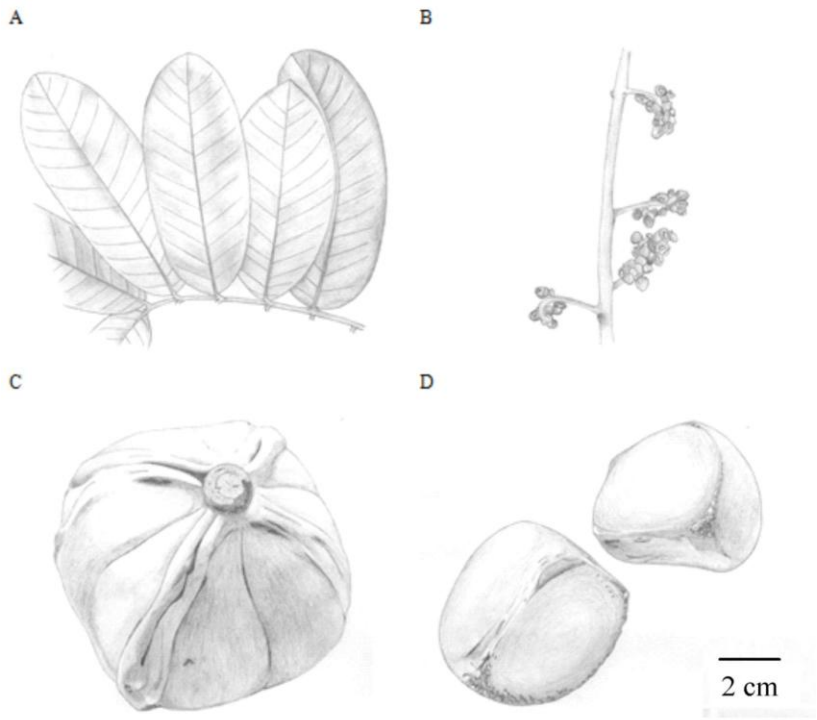

Figura 3: Caracterização morfológica de folhas (A), flores (B), frutos (C) e sementes (D) em *Carapa guianensis* Aulb.

Os folíolos em *C. vasquezii* são, predominantemente, arredondados conforme ilustração (Figura 4A). As flores, semelhante àquelas que ocorrem em *C. guianensis*, são, predominantemente, tetrâmeras, e possuem frutos globosos de cor marrom (Figura 3B). As sementes de *C. vasquezii* apresentam aspecto menos rugoso quando comparadas às sementes de *C. guianensis*, com hilo mais evidente e de coloração marrom escuro (Figura 4C). Espécimes de *C. vasquezii*, *C. guianensis* e *C. surinamensis*, todas com ocorrência na Amazônia, apresentam similaridade morfológica e facilmente confundidas (Kenfack, 2011b), exceto para alguns casos em estruturas taxonômicas de folhas, sementes e frutos (Kenfack, 2011a). Dentro de um complexo de espécies pertencentes a esse grupo taxonômico já houve indícios de especiação simpátrica que leva a conjecturas sobre a autencidade na descrição das espécies (Duminil *et al*., 2012; Scotti-Saintagne *et al*., 2013).

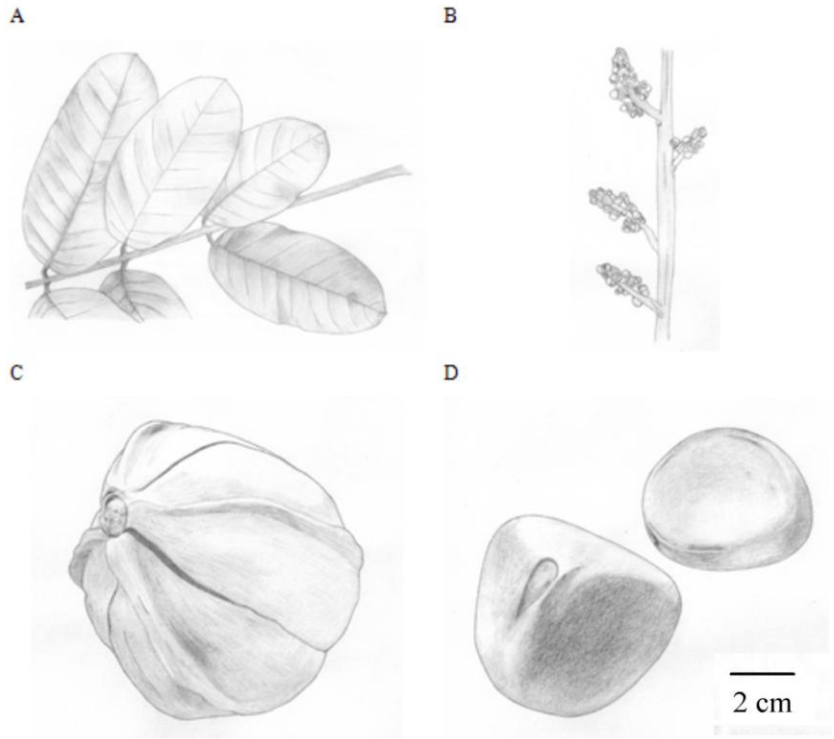

Figura 4: Caracterização morfológica de folhas (A), flores (B), frutos (C) e sementes (D) em *Carapa vasquezii* Kenfack.

A tendência de agrupamento entre as espécies quando analisados os parâmetros morfométricos de sementes por meio da Análise de Componentes Principais (PCA), reforçando a evidente separação de grupos entre as espécies (Figura 5), também foi observada por Kenfack (2011b). A utilização de marcadores morfológicos é importante na delimitação de espécies, pois alguns táxons superiores, como gêneros ou famílias, podem ser distinguidos por caracteres exclusivos de folhas, assim como forma de flores, frutos, sementes ou até mesmo a estrutura de ramificação das copas (Cope *et al*., 2012).

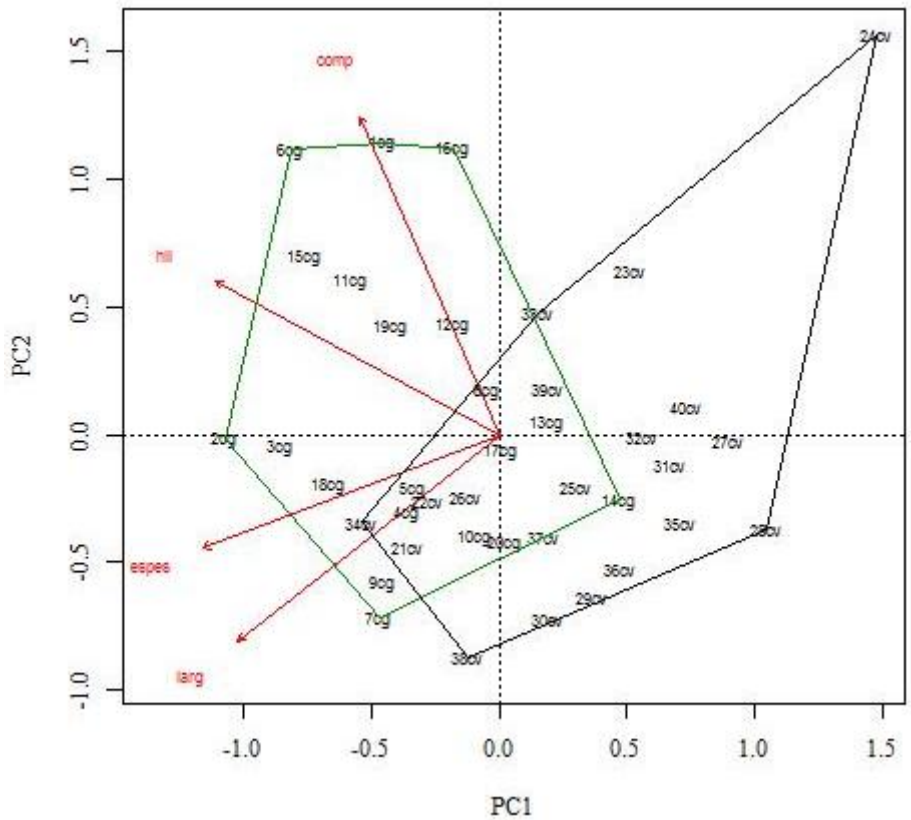

Figura 5: Análise de Componentes Principais (PCA) de variáveis morfométricas considerando os valores médios para 10 sementes de 20 matrizes pertencentes à espécie *Carapa guianensis* (10) e *C. vasquezii* (10) que ocorrem na Reserva Adolpho Ducke, Manaus, Amazonas.

*Comp, hil, espes e larg: comprimento, tamanho do hilo, espessura e largura das sementes. Polígono verde formado por amostras de *C. guianensis*. Polígono preto formado por amostras de *C. vasquezii*.

As dimensões de comprimento, a espessura das sementes e o comprimento do hilo foram as variáveis que proporcionaram a maior explicação para a formação de grupos entre *C. guianensis* e *C. vasquezii* (PC1: -1,36 e -1,3, respectivamente) – Figura 4. Os resultados deste trabalho corroboram com os resultados encontrados por Kenfack (2011b). Este também sugere o comprimento do hilo como uma variável morfométrica que possibilitou maior nível de explicação para caracterização morfológica destas espécies. Além disso, identificou-se que os dois primeiros eixos PC1 (43%) e PC2 (30%) juntos explicaram 73% da variação total dos dados morfométricos no que se refere às diferenças encontradas entre as espécies.

O fato é que existem algumas incertezas e limitações com relação à análise morfométrica para fundamentar limites da fronteira taxonômica de plantas (Cope *et al*., 2012), principalmente, quando consideram-se os grupos pertencentes ao complexo de espécies vegetais do gênero *Carapa* que são consideradas crípticas (Duminil *et al*., 2012). No sentindo de minimizar as incertezas, atualmente, são utilizadas com maior frequência análises

contemplando variáveis morfométricas e moleculares (Kenfack, 2011a). Em alguns casos, também é possível utilizar o auxílio de estudos sobre as características do metabolismo de plantas para definir a delimitação de espécies vegetais que se encontram sob adequação taxonômica (Martins *et al*., 2008). Adicionalmente, as características bioquímicas podem apresentar relação com o sítio de crescimento, e podem estar associadas, também, com a variabilidade genética em espécies vegetais (Milhomem-Paixão *et al*., 2016).

Neste trabalho, foi estabelecido um esforço para agrupar características moleculares, morfofuncionais e bioquímicas. Diante disso, determina-se que existem diferenças também quanto aos teores de reservas que compõem o metabolismo primário e encontraram-se estocadas nos tecidos de reservas, analisadas a partir da massa seca de sementes de espécies vegetais do gênero *Carapa* tanto em nível de espécie quanto procedências de coletas (Figura 6A e B). Os metabólitos majoritários das sementes de andiroba foram os lipídeos, os quais apresentaram valores superiores para amostras de sementes provenientes do Acre (55,64±3,54 %) (Figura 6A). Por outro lado, a reserva primária dentre as consideradas neste trabalho, que apresentou menor expressividade para espécies vegetais do gênero *Carapa* foram as proteínas solúveis, com valores inferiores a 1%.

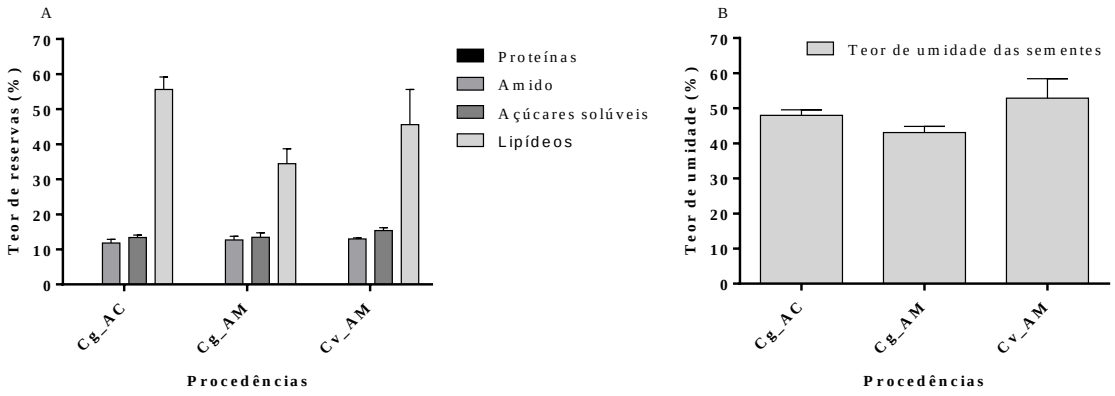

Figura 6: Teor de reservas primárias (lipídeos, açúcares solúveis, amido e proteínas) – A e teor de umidade – B em sementes de duas espécies do gênero *Carapa*.

*Cg_AC: *Carapa guianensis* de procedência do Acre; Cg_AM: *Carapa guianensis* de procedência do Amazonas e Cv_AM: *Carapa vasquezii* de procedência do Amazonas.

As concentrações de carboidratos (amido e açúcares solúveis) exibiram valores com variação de 11,8±1,1 a 13,0±0,3% para amido e de 13,4±0,6 a 15,4±0,8% para açúcares solúveis, com destaque para *C. vasquezii* que apresentou os maiores valores percentuais. Um

aspecto a ser considerado é que, também, esta espécie foi a que apresentou maior teor de umidade nas sementes (Figura 6B). As plantas sintetizam vários compostos, dentre eles os que participam do metabolismo primário, e que contribuem para aclimatação e posterior estabelecimento em nível de espécie, que possibilitará sua adaptação ao ambiente de crescimento (Pichersky e Lewinsohn, 2011). Para tanto, o adequado estabelecimento das espécies parece estar relacionado às diferentes estratégias de estocagem, uso de água e reservas orgânicas presentes nas sementes.

Então, a característica de apresentar maior ou menor teor de umidade das sementes pode impor ritmos diferentes para o início do processo de germinação. *C. guianensis*, procedência de Manaus, apresentou menor teor de umidade (43,1±1,7%) quando comparada a *C. vasquezii* também de Manaus (52,8±5,6%) (Figura 6B). Além de definir o comportamento da espécie e/ou procedência com relação ao ambiente de crescimento, o teor de umidade inicial da semente, sua composição centesimal, assim como sua forma de secagem devem ser considerados, uma vez que podem influenciar na qualidade do óleo obtido (Mendonça *et al*., 2015; Chielle *et al*., 2016), e essas características estão associadas com propriedades como por exemplo reações enzimáticas, reação de Maillard (açúcares) e peroxidação lipídica (Murthy *et al*., 2003).

Após a Análise de Variância Multivariada (MANOVA), foi possível observar que não houve influência conjunta das variáveis amido, açúcares solúveis, teor de lipídeos, teor de proteínas e massa seca na variação total dos resultados para divergência entre as espécies, considerando-se, também, os locais de coleta (p=0,3; Pillai=0,47) e as espécies (p=0,7; Pillai=0,27) como fonte de variação. No entanto, identificou-se diferença significativa para variável procedência de coleta (p=0,04), considerando o teor de lipídeos, o que indica evidência da relação do ambiente de crescimento como um fator que deve ser considerado, uma vez que, influencia tanto no teor quanto na composição de algumas substâncias presentes nos óleos.

As espécies vegetais consideradas neste estudo apresentaram similaridade com relação à composição dos compostos majoritários em seu perfil lipidômico, porém com divergência no teor dos principais ácidos graxos presentes nas amostras de óleo. *Carapa vasquezii* foi a espécie que apresentou maior concentração dos principais compostos (Tabela 3). O fato é que a plasticidade fenotípica, incluindo traços morfológicos e bioquímicos, pode ser resultante de pressões evolutivas que atuam como forças de seleção sobre um determinado fenótipo induzindo sua especialização a um determinado ecótipo (Duarte *et al*., 2010), e, juntamente a essas pressões, o organismo apresenta mecanismos que o conduzem à aclimatação, a curto

prazo, os quais irão refletir nos processos bioquímicos e fisiológicos, podendo levar a divergência genética como resposta à adaptação ambiental em longo prazo.

Tabela 3: Perfil lipidômico dos compostos majoritários do óleo extraído de sementes de duas espécies do gênero *Carapa* de amostras provenientes de diferentes regiões da Amazônia.

***Carapa guianensis* (Procedência de Manaus, Amazonas)**	**IK**	**Tr (mint.)**	**% Área**
Palmitato de metila	1530	19,01	26,0
Ácido palmítico 1TMS	1603	20,31	8,02
Oleato de metila	1636	20,93	42,30
Estearato de metila	1644	21,05	6,04
Ácido oleico	1700	22,09	12,55
Ácido esteárico 1TMS	1707	22,25	1,36
***Carapa guianensis* (Procedência de Mâncio Lima, Acre)**	**IK**	**Tr (mint.)**	**% Área**
Palmitato de metila	1530	19,02	26,72
Ácido palmítico 1TMS	1603	20,26	5,50
Oleato de metila	1636	20,93	41,82
Estearato de metila	1644	21,23	9,10
Ácido oleico 1TMS	1700	22,04	8,30
Ácido esteárico 1TMS	1707	22,24	1,66
***Carapa vasquezii* (Procedência de Manaus, Amazonas)**	**IK**	**Tr (mint.)**	**% Área**
Palmitato de Metila	1535	19,01	20,54
Ácido palmítico 1TMS	1603	20,3	8,40
Oleato de metila	1636	20,95	38,60
Estearato de metila	1644	21,25	10,52
Ácido oleico 1TMS	1700	22,09	14,50
Ácido esteárico 1TMS	1722	22,27	3,54

* IK: Índice de rentenção de *Kovats*; Tr: Tempo de retenção em minutos.

Dentre os compostos majoritários pertencentes à classe de ácidos graxos que foram identificados na composição do óleo das espécies, em *C. guianensis* predominou oleato e palmitato de metila, seguido de ácido oleico, e a maior concentração de ácido palmítico e estearato de metila foram destaques em *C. vasquezii* (Tabela 3). As características da composição de óleo podem ser inerentes de cada espécie, refletindo, assim, a variabilidade

genética inter e intraespecífica, ou até estar associadas com as condições edafoclimáticas do ambiente de crescimento (Duarte *et al*., 2010; Milhoem-Paixão *et al*., 2016).

Neste trabalho, identificou-se um forte agrupamento formado após a relação das variáveis teor de lipídeos, amido, açúcares solúveis e massa seca dos cotilédones para as duas espécies do gênero *Carapa* contempladas. Após análise de cluster, verificou-se a tendência de agrupamento entre as espécies no qual *C. guianensis* procedente do estado do Amazonas formou, predominantemente, um grupo isolado de *C. vasquezii* também do Amazonas e *C. guianensis* do Acre, que, por sua vez, tenderam à formação de grupos, sugerindo que diferentes espécies do gênero *Carapa* submetidas a diferentes ambientes compartilham similaridade em atributos funcionais (Figura 7), uma vez que, os níveis de metabólitos estão fortemente associados com a pressão exercida pelo ambiente de crescimento. Para esse agrupamento, identificou-se coeficiente de correlação cofenético de 0,75, sugerindo uma forte relação entre a matriz de distância e a matriz cofenética dos dados. Essa é uma nova evidência de que as espécies podem apresentar mecanismos diferenciados quanto à influência do ambiente de crescimento e, consequentemente, essas respostas poderão ser transcritas em nível de informação genética ao longo dos anos.

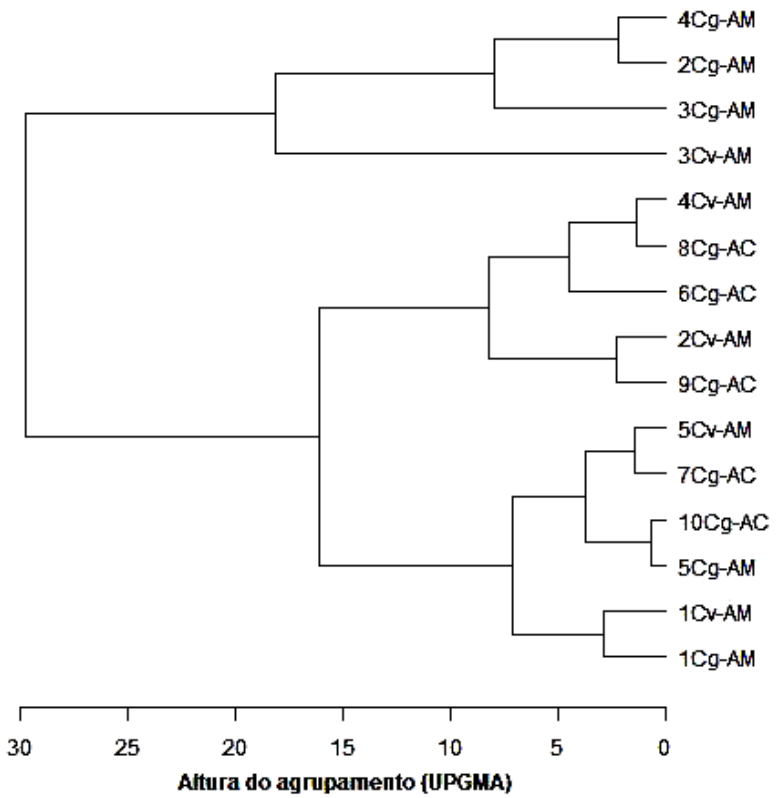

Figura 7: Agrupamento utilizando a análise de cluster por meio da matriz de distância com o método de UPGMA (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages*)

relacionando as variáveis teor de lipídeos, amido, açúcares solúveis e massa seca das sementes para duas espécies do gênero *Carapa*.

*Cg-Ac: *Carapa guianensis* de procedência do Acre; Cg-Am: *C. guianensis* de procedência do Amazonas e Cv-Am: *C. vasquezii* de procedência do Amazonas.

A partir da Análise de Componentes Principais (PCA), verificou-se que as reservas bioquímicas e nutrientes minerais encontrados nas sementes possibilitaram a separação de grupos tanto entre as espécies quanto para as procedências (Figura 8). Os eixos das coordenadas principais (PC1 e PC2) juntos responderam 78% da variação dos dados. Novamente a procedência das amostras de sementes de espécies do gênero *Carapa* determinou diferenças importantes para as concentrações de açúcares solúveis, amido, lipídeos e *status* nutricional representado pelo teor de macro e micronutrientes acumulados nas sementes. Os níveis de nutrientes estocados nos tecidos de reservas sugerem relações interessantes, como por exemplo, o alto teor de fósforo, fortemente relacionado de forma positiva com os teores de cálcio e magnésio, apresentou correlação com o maior teor de lipídeos de populações de *Carapa guianensis* provenientes do Acre (PC1=0,5) (Figura 8), pois esses nutrientes minerais participam da produção de ATP – Adenosina Trifosfato, considerada fonte de energia importante na síntese de ácidos graxos. *Carapa vasquezii* apresentou maiores concentrações de açúcares solúveis (PC1=0,35), e nessa espécie destacam-se também os níveis de carbono (PC1=0,77), potássio (PC1=0,71), zinco (PC1=0,93) e ferro (PC1=0,92) nas sementes (Figura 8). A diversidade de compostos presentes nos vegetais é produto do metabolismo primário e secundário. As reservas primárias estão basicamente relacionadas com o crescimento, por meio das vias metabólicas que participam da respiração e fotossíntese (Hounsome *et al*., 2008).

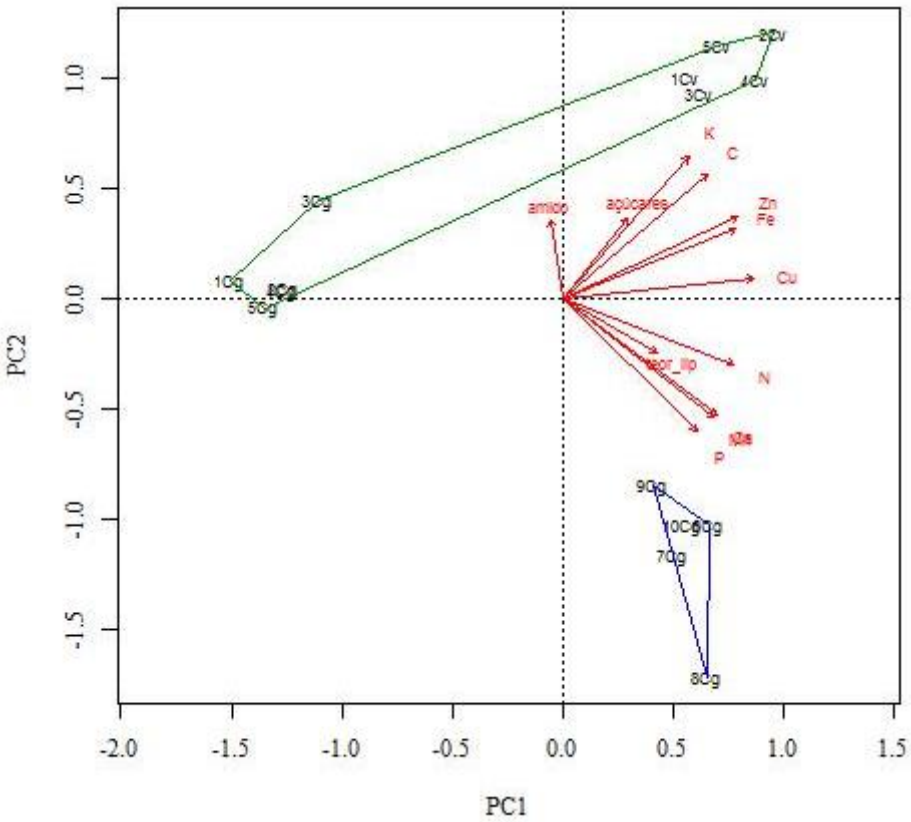

Figura 8: Análise dos Componentes Principais (PCA) considerando as variáveis carboidratos (amido e açúcares solúveis), teor de lipídeos, carbono, potássio, zinco, fósforo, cálcio, ferro, manganês a partir da massa seca de sementes de duas espécies de Carapa (Cg: *C. guianensis* e Cv: *C. vasquezii*).

*Polígono verde formado por amostras coletadas no Amazonas, Manaus. Polígono azul formado por amostras coletadas no Acre, Mâncio Lima. PC1: 53%; PC2: 25%.

De acordo com o teste de Mantel, observou-se correlação significativa entre os valores encontrados para as matrizes de distância dos resultados de nutrientes das sementes e folhas (p=0,03; R^2=0,17) e também entre os resultados de nutrientes dos solos e folhas (p=0,001; R^2=0,72). Dessa forma, acredita-se que exista particionamento compartilhado entre os teores de nutrientes do sítio, e sua alocação nas folhas, e posteriormente, os nutrientes acumulados nas folhas, deverão ser transportados para outros compartimentos da planta, inclusive para os tecidos de estocagem presentes nas sementes.

De fato, os níveis de metabólitos são afetados por fatores genéticos e ambientais como luminosidade, temperatura, umidade e qualidade do sítio de crescimento (Hounsome *et al.*, 2008). A nutrição mineral em plantas influencia vários mecanismos relacionados ao metabolismo vegetal, como exemplo, o metabolismo do carbono que é afetado pelos níveis de nitrogênio, o qual, por sua vez, está relacionado com a síntese de proteína e atividade enzimática. O fósforo, após ser incorporado na planta, participa da síntese de vários

compostos orgânicos como ATP, pentoses fosfatos, fosfolipídeos e nucleotídeos; o potássio e o magnésio são importantes na ativação das reações enzimáticas, o magnésio é o principal agente responsável pela síntese de DNA, e um componente da molécula de clorofila (David *et al*., 2014).

4. CONCLUSÃO

Do ponto de vista morfológico e bioquímico, os resultados indicam que existem marcantes diferenças entre *C. guianensis* e *C. vasquezii*, com ênfase para as variáveis morfométricas, tamanho das sementes e comprimento do hilo. Por outro lado, com relação ao perfil lipidômico, uma característica bioquímica, *C. guianensis* apresentou maiores concentrações de oleato e palmitato de metila, seguido de ácido oleico, e a maior concentração de ácido palmítico e estereato de metila foram destaques em *C. vasquezii*. Portanto, esses resultados morfológico e bioquímico são robustos o suficiente para confirmar as diferenças, podendo fundamentar a caracterização de espécies do gênero *Carapa*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amaral, L.F.G.; Fierro, I.M. 2013. Profi le of medicinal plants utilization through patent documents: the andiroba example. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 23(4): 716-722. https://doi.org/10.1590/S0102-695X2013005000046.

Aragão, D. de S.; Lunz, A.M.P.; Oliveira, L.C. de; Raposo, A.; Fermino Junior, P.C.P. 2014. Efeito do sombreamento na anatomia foliar de plantas jovens de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.). *Revista Árvore*, 38(4): 631-639.

Barretto, S.S.B.; Ferreira, R.A. 2011. Aspectos morfológicos de frutos, sementes, plântulas e mudas de Leguminosae Mimosoideae: Anadenanthera colubrina (Vellozo) Brenan e Enterolobium contortisiliquum (Vellozo) Morong. *Revista Brasileira de Sementes*, 33(2): 223-232. https://doi.org/10.1590/S0101-31222011000200004.

Black, M.; Corbineau, F.; Grzesik, M.; Guy, P.; Côme, D. 1996. Carbohydrate metabolism in the developing and maturing wheat embryo in relation to is desiccation tolerance. *Journal Experiment of Botanic*, 47(295): 161-169.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2009. *Regras para análise de sementes*. Brasília, DF. 399pp.

Camara, C. de A.; Araujo Neto, J.C. de; Ferreira, V.M.; Resende, L. de P.; Costa, S.S. da. 2009. Características morfométricas de frutos e sementes e germinação de *Thespesia populnea*. *Bragantia*, 68(2): 503-509.

Chaves, M.H.; Barbosa, A.S.; Moita Neto, J.M.; Aued-Pimentel, S.; Lago, J.H.G. 2004. Caracterização química do óleo da amêndoa de *Sterculia striata* St. Hil. et Naud. *Química Nova*, 27(3): 404-408.

Chielle, D.P.; Bertuol, D.A.; Meili, L.; Tanabe, E.H.; Dotto, G.L. 2016. Convective drying of papaya seeds (Carica papaya L.) and optimization of oil extraction. *Industrial Crops and Products*, 85: 221-228. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.03.010.

Chiou, K.L.; Hastorf, C.A. 2014. A systematic approach to species-level identification of chile pepper (Capsicum spp.) seeds: establishing the groundwork for tracking the domestication and movement of Chile Peppers through the Americas and Beyond. *Economic Botany*, 68(3): 316-336. https://doi.org/10.1007/s12231-014-9279-2.

Condé, T.M.; Lima, M.L.M. de; Lima Neto, E.M. de; Tonini, H. 2013. Morfometria de quatro espécies florestais em sistemas agroflorestais no munícipio de Porto Velho, Rondônia. *Revista Agro@mbiente*, 7(1): 18-27.

Cope, J.S.; Corney, D.; Clark, J.Y.; Remagnino, P.; Wilkin, P. 2012. An implementation of leaf recognition system using leaf vein and shape. *Expert Systems with Applications*, 39: 7562-7573. https://doi.org/10.1016/j.eswa.2012.01.073.

David, E.F.S.; Mischan, M.M.; Marques, M.O.M.; Boaro, C.S.F. 2014. Physiological indexese macro- and micronutrients in plant tissue and essential oil of Mentha piperita L. grown in nutrient solution with variation in N, P, K and Mg levels. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 16(1): 97-106.

Dranski, J.A.L.; Pinto Júnior, A.S.; Steiner, F.; Zoz, T.; Malavasi, U.C.; Malavasi, M. de M.; Guimarães, V.F. 2010. Physiological maturity of seeds and colorimetry of fruits of *Jatropha curcas* L. *Revista Brasileira de Sementes*, 32(4): 158-165.

Duarte, A.R.; Naves, R.R.; Santos, S.C.; Seraphin, J.C.; Ferri, P.H. 2010. Genetic and environmental influence on essential oil composition of Eugenia dysenterica. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 21(8): 1459-1467.

Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers P.A.; Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28: 350-356.

Duminil, J.; Kenfack, D.; Viscosi, V.; Grumiau, L.; Hardy, O.J. 2012. Testing species delimitation in sympatric species complexes: the case of an African tropical tree, Carapa spp. (Meliaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 62: 275-285. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.09.020.

Embrapa. 1999. *Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes*. Embrapa Solos, Brasília, DF. 370pp.

Embrapa. 2009. *Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes*. Embrapa Solos, Brasília, DF. 627pp.

Ferraz, I.D.K.; Camargo, J.L.C.; Sampaio, P. de T.B. 2002. Sementes e plântulas de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl. e *Carapa procera* D. C.): aspectos botânicos, ecológicos e tecnológicos. *Acta Amazônica*, 32(4): 647-661.

Ferraz, I.D.K.; Camargo, J.L.C.; Sampaio, P. de T.B. 2003. *Andiroba (Carapa guianensis Aubl.; Carapa procera D. C.) Meliaceae*. INPA, Manaus. 6pp.

Geris, R.; Santos, N.; Amaral, B.; Maia, I.; Castro, V.; Carvalho, J.R.M. 2007. Biodiesel de soja: reação de transesterificação para aulas práticas de química orgânica. *Química Nova*, 30(5): 1369-1373.

Gonçalves, J.F. de C.; Silva, C.E.M. da; Guimarães, D.G. 2009. Fotossíntese e potencial hídrico foliar de plantas jovens de andiroba submetidas à deficiência hídrica e à reidratação. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 44: 8-14. doi: 10.1590/ S0100-204X2009000100002.

Hounsome, N.; Hounsome, B.; Tomos, D.; Edwards-Jones, G. 2008. Plant metabolites and nutritional quality of vegetables. *Journal of Food Science*, 73(4): 48-65. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00716.x.

Kenfack, D. 2011a. *Carapa vasquezii* (Meliaceae), a new species from western Amazonia. *Brittonia*, 63(1): 7-10.

Kenfack, D. 2011b. Resurrection in *Carapa* (Meliaceae): a reassessment of morphological variation and species boundaries using multivariate methods in a phylogeneticcontext. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 165: 186-221.

Kenfack, D. 2011c. A synoptic revision of Carapa (Meliaceae). *Harvard Papers in Botany*, 16(2): 171-231.

Manly, B.F.J. 1997. *Randomization, bootstrap and Monte Carlo methods in biology*. Chapman & Hall, London. 281pp.

Martins, M.B.G.; Castro, A.A.; Cavalheiro, A.J. 2008. Caracterização anatômica e química de folhas de *Jacaranda puberula* (Bignoniaceae) presente na Mata Atlântica. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18(4): 600-607. https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000400018.

Mendonça, A.P.; Sampaio, P. de T.B.; Almeida, F. de A.A.; Ferreira, R.F.; Novais, J.M. 2015. Determinação das curvas de secagem das sementes de andiroba em secador solar. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 19(4): 382-387. https://doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v19n4p382-387.

Milhomem-Paixão, S.S.R.; Fascineli, M.L.; Roll, M.M.; Longo, J.P.F.; Azevedo, R.B.; Pieczarka, J.C.; Salgado, H.L.C.; Santos, A.S.; Grisolia, C.K. 2016. The lipidome, genotoxicity, hematotoxicity and antioxidant properties of andiroba oil from the Brazilian Amazon. *Genetics and Molecular Biology*, 39(2): 248-256. https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2015-0098.

Murphy, J.; Riley, J.P. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta*, 27: 31-36.

Murthy, U.M.N.; Kumar, P.P.; Sun, W.Q. 2003. Mechanisms of seed ageing under different storage conditions for Vigna radiata (L.) Wilczek: lipid peroxidation, sugar hydrolysis, Maillard reactions and their relationship to glass state transition. *Journal of Experimental Botany*, 54(384): 1057-1067. https://doi.org/10.1093/jxb/erg092.

Pichersky, E.; Lewinsohn, E. 2011. Convergent evolution in plant specialized metabolism. *Annual Review of Plant Biology*, 62: 549-566. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103814.

Scotti-Saintagne, C.; Dick, C.W.; Caron, H.; Vendramin, G.G.; Guichoux, E.; Buonamici, A.; *et al*. 2013. Phylogeography of a species complex of lowland Neotropical rain forest trees (Carapa, Meliaceae). *Journal of Biogeography*, 40: 676-692. https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2011.02678.x.

Shankar, U.; Synrem, I. 2012. Variation in morphometric traits of fruits and seeds of Prunus nepaulensis Steud. in Meghalaya, India. *Tropical Ecology*, 53(3): 273-286.

Telles, M.P. de C.; Silva, R.S.M.; Chaves, L.J.; Coelho, A.S.G.; Diniz Filho, F. 2001. Divergência entre subpopulações de cagaiteira (Eugenia dysenterica) em resposta a padrões edáficos e distirbuição espacial. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 36(11): 1387-1394. https://doi.org/10.1590/S0100-204X2001001100009.

Vieira, F. de A.; Carvalho, D. de. 2009. Maturação e morfometria dos frutos de *Miconia albicans* (Swartz) Triana (Melastomataceae) em um remanescente de floresta estacional semidecídua montana em Lavras, MG. *Revista Árvore*, 33(6): 1015-1023.

CAPÍTULO 3

Dinâmica da mobilização de reservas primárias durante a germinação e crescimento inicial de plântulas em espécies do gênero *Carapa* na Amazônia Central. Manuscrito em preparação para *Plant Biology*.

Dinâmica da mobilização de reservas primárias durante a germinação e crescimento inicial de plântulas em espécies do gênero *Carapa* na Amazônia Central

RESUMO

O conhecimento sobre a mobilização de reservas primárias e de nutrientes mineirais das sementes é importante para entender a dinâmica de uso dessas reservas e a atividade de enzimas associadas ao metabolismo de lipídeos, carboidratos e proteínas durante o processo de germinação e de crescimento inicial das plântulas. No caso de espécies do gênero *Carapa*, esses estudos podem contribuir para o entendimento de estratégias metabólicas relacionadas à delimitação das espécies. O objetivo com esta pesquisa foi investigar os mecanismos de mobilização dos componentes do metabolismo primário (lipídeos, carboidratos, preoteínas e nutrientes minerais) e atividades enzimáticas (lípase, α amilase, proteases e fosfatase ácida) em sementes de duas espécies do gênero *Carapa* durante a germinação e o crescimento inicial das plântulas. Sementes de duas espécies do gênero *Carapa* (*C. guianensis* e *C. vasquezii*) foram coletadas de 10 matrizes de cada espécie na Reserva Florestal Adolpho Ducke, em Manaus-AM. Após a coleta, as sementes foram semeadas em casa de vegetação utilizando-se bandejas plásticas contendo areia lavada e esterilizada como substratos. A germinação e o crescimento inicial das plântulas foram categorizados em sete estádios: sementes quiescentes (SQ), sementes embebidas após 24 horas (EM), emissão da raiz primária (ER), alongamento da raiz primária (RP), emissão da raiz secundária (RS), emissão do epicótilo (EP) e expansão dos eofilos (EO). A classificação foi considerada a partir de, no mínimo, 10 sementes para cada um dos estádios. Sementes livres do tegumento foram liofilizadas, e, posteriormente, trituradas para obtenção do material finamente pulverizado dos diferentes estádios germinativos. Análises dos lipídeos, carboidratos, proteínas solúveis e nutrientes minerais foram realizadas utilizando-se o material liofilizado e as atividades enzimáticas (lipase, α amilase, proteases e fosfatase ácida) realizadas com material fresco de cada um dos estádios descritos acima. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial (2x7) com duas espécies vegetais e sete estádios de germinação e crescimento inicial de plântulas. As duas espécies vegetais apresentaram resultados aproximados para a concentração de lipídeos, com variação de 52,5±6,5 a 63,7±4,7% em *C. guianensis* e 48,5±9,4 a 61,0±4,1% em *C. vasquezii*. A espécie *C. guianensis* apresentou valores superiores para as reservas primárias (proteínas, açúcares solúveis e amido). A análise do perfil proteico possibilitou obtenção de bandas nas faixas próximas a 25 kDa, e entre 10 e 15 kDa para ambas espécies vegetais. Em *C. vasquezii* destacou-se a ocorrência de uma banda proteica na faixa entre 15 e 25 kDa. Com relação à atividade enzimática, *C. guianensis* apresentou maiores valores para a maioria das enzimas consideradas, exceto para fosfatase ácida, e, no último estádio de avaliação, essa espécie apresentou valores inferiores para atividade proteolítica total. Quanto às concentrações de macro e micronutrientes, *C. vasquezii* apresentou valores superiores para maioria, com destaque para a dinâmica do carbono (C) nos dois últimos estádios (EP e EO), e também nitrogênio (N), fósforo (P), cálcio (Ca), cobre (Cu), ferro (Fe) e zinco (Zn). No geral, *C. guianensis* e *C. vasquezii* apresentaram mecanismos diferenciados quanto à mobilização de reservas primárias, nutrientes minerais e atividade enzimática indicando diferenças específicas quanto ao aparato metabólico no uso dessas reservas durante o processo de germinação e crescimento inicial das plântulas.

Palavras-chave: Andiroba; carboidratos; lipídeos; metabolismo primário; nutrientes minerais; proteínas.

Dynamics of primary reserve mobilization during germination and initial seedling growth in *Carapa* from Central Amazonian

ABSTRACT

The knowledge about the mobilization of primary reserves and mineral nutrients of the seeds is important to understand the dynamics of the use of these reserves and the activity of enzymes associated to the metabolism of lipids, carbohydrates and proteins during the germination process and initial growth of seedlings. In the case of *Carapa* species, these studies can contribute to the understanding of metabolic strategies related to delimitation this spescies. The objective of this work was to investigate the mobilization mechanisms of the primary metabolite components (lipids, carbohydrates, preoteins and mineral nutrients) and enzymatic activities (lipase, α-amylase, proteases and acid phosphatase) in seeds of two *Carapa* species during germination and initial seedling growth. Seeds of two *Carapa* species (*C. guianensis* and *C. vasquezii*) were collected from 10 matrices of each at Forest Reserve Adolpho Ducke, Manaus-AM. After the collection, the seeds were sown in a greenhouse using plastic trays containing washed sand and sterilized as substrates. The germination and early seedling growth were categorized into seven stages: quiescent seeds (SQ), imbibition after 24 hours (EM), primary root emission (ER), the primary root elongation (RP), issuance of secondary root (RS), epicotyl (EP) emission and eofilos expansion (EO), with at least 10 seeds being collected for each of the stages. Free seeds of the tegument were lyophilized, and later ground to obtain the finely pulverized material of the different germinative stages. Analysis of lipids, carbohydrates, soluble proteins, minerals nutrients as well as enzymatic activity (lipase, α amylase, acid phosphatase and protease) were used, using fresh material and freeze dried, respectively, of each of the stages described above. The experimental design was completely randomized (DIC) in a factorial scheme (2x7) with two plant species and seven stages of germination and initial seedling growth. The two plant species presented approximate results for the lipid concentration, ranging from 52.5±6.5 to 63.7±4.7% in *C. guianensis* and 48.5±9.4 at 61.0±4, 1% in *C. vasquezii*. *C. guianensis* presented higher values for the primary reserves (proteins, soluble sugars and starch). The analysis of the protein profile allowed to obtain bands in the bands close to 25 kDa, and between 10 and 15 kDa for both plant species. In *C. vasquezii* the occurrence of a protein band in the range between 15 and 25 kDa was feature. Regarding the enzymatic activity, *C. guianensis* presented higher values for most of the enzymes observed, except for acid phosphatase, and in the last evaluation stage this species presented lower values for total proteolytic activity. As for macro and micronutrient concentrations, *C. vasquezii* presented higher values for most, with carbon (C) dynamics in the last two stages (EP and EO), as well as nitrogen (N), phosphorus (P), calcium Ca), copper (Cu), iron (Fe) and zinc (Zn). Overall, *C. guianensis* and *C. vasquezii* presented different mechanisms to mobilization of primary reserves, mineral nutrients and enzymatic activity indicating specific differences in metabolic apparatus the use of these reserves during the process of germination and early seedling growth.

Keywords: Andiroba; Carbohydrates; Lipids; Mineral nutrients; Primary metabolism; Proteins.

1. INTRODUÇÃO

Espécies do gênero *Carapa* recebem atenção especial devido sua importância quanto ao amplo espectro de aplicações do óleo no controle de doenças e fabricação de cosméticos (Funasaki *et al*., 2016), sugerindo a importância desse grupo taxonômico e, também, a concepção de um cenário relevante para a tomada de decisões no sentido de consolidar estratégias de proteção e monitoramento de produtos florestais, visando à investigação de novas substâncias com potencial de uso (Ricardo *et al*., 2017). Além disso, as espécies pertencentes ao gênero *Carapa* possuem madeira de excelente qualidade para fabricação de móveis e construção civil, e por esses motivos, são consideradas espécies de múltiplos usos (Dembélé *et al*., 2015).

A produção de mudas de boa qualidade dessas espécies vegetais é uma oportunidade para o fortalecimento da cadeia produtiva, no contexto da silvicultura tropical que, por sua vez, exige o conhecimento do processo de germinação que é uma das fases cruciais do ciclo de vida das plantas, pois determina o sucesso de propagação, e permite a manutenção da variabilidade genética das espécies vegetais (Czarna *et al*., 2016). A germinação é um processo complexo no qual ocorre a retomada do metabolismo que inicia com a absorção de água por meio da embebição e finaliza com a protrusão radicular (Nonogaki *et al*., 2010).

Após o evento da germinação, ocorre a reparação de danos celulares e reativação da atividade metabólica que está relacionada com síntese *de novo* de DNA, mobilização e degradação dos componentes do metabolismo primário. Durante a fase de embebição, prevalece a síntese de enzimas e compostos que irão agir de maneira a limitar e reparar danos celulares ocasionados durante a fase de latência das sementes (Nonogaki *et al*., 2010). A germinação e estabelecimento das plântulas é um processo exigente de energia (Czarna *et al*., 2016) na qual ocorre a mobilização de carboidratos, proteínas e lipídeos que são as principais substâncias de reservas das sementes (Lima *et al*., 2008), metabolizadas por meio da atividade de enzimas que favorecem a síntese e degradação desses substratos essenciais ao crescimento da plântula até tornar-se fotoautotrófica (Pritchard *et al*., 2002).

Algumas espécies vegetais que apresentam recalcitrância possuem grande quantidade de reservas que os permitem a formação de banco de plântulas até a ocorrência de um evento que favoreça a formação de um microclima adequado para a retomada do crescimento. Nesse sentido, a compreensão dos aspectos fisiológicos, ecológicos e bioquímicos em sementes pode auxiliar o entendimento das estratégias para o estabelecimento das espécies no ambiente

de crescimento. Assim, o estabelecimento das plântulas é suportado, inicialmente, por metabólitos produzidos pela hidrólise e conversão das principais reservas armazenadas nas sementes (lipídeos, carboidratos e proteínas) (Bewley, 2001).

O conhecimento sobre a mobilização de reservas do metabolismo primário e nutricionais das sementes é importante para entender a dinâmica de degradação e disponibilização de energia durante o processo de formação e estabelecimento das plântulas, considerados importantes para o crescimento das plantas no ambiente natural (Alencar *et al*., 2012).

Dessa forma, o objetivo com este trabalho foi investigar as características morfofuncionais associando-as ao mecanismo de mobilização dos componentes do metabolismo primário e reservas nutricionais em sementes de duas espécies do gênero *Carapa* como forma de elucidar a dinâmica do processo de degradação dos principais substratos orgânicos mobilizados durante a germinação e crescimento inicial de plântulas de espécies florestais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal

Sementes de duas espécies do gênero *Carapa* (*C. guianensis* e *C. vasquezii*) foram coletadas de 10 matrizes de cada espécie localizadas na Reserva Florestal Adolpho Ducke, em Manaus-AM (Figura 1). Após a coleta, as sementes foram conduzidas ao Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal – INPA e beneficiadas (retiradas dos frutos e lavadas em água corrente).

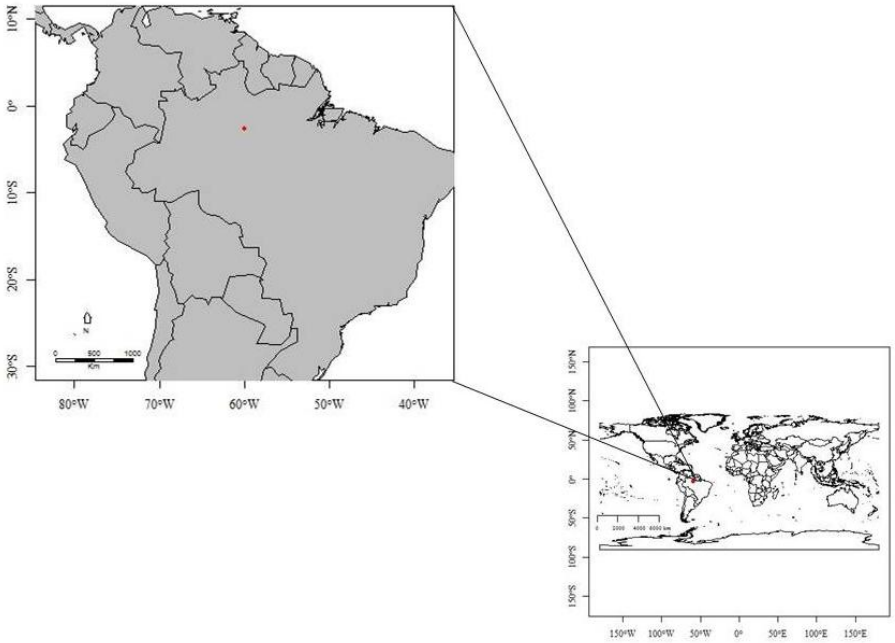

Figura 1: Localização da área de coleta de sementes de espécies do gênero *Carapa*, Manaus, Amazonas, Brasil.

Em seguida, realizou-se assepsia em hipoclorito de sódio a 2%, durante 5 minutos, e posteriormente, as sementes foram acondicionadas em bandejas plásticas com dimensões de 44 x 28,5 x 8,2 cm, utilizando-se areia esterilizada como substrato e transferidas para casa de vegetação com temperatura ambiente em torno de 29±2°C. O acompanhamento com regas e a contagem diária da germinação foram realizados. A germinação foi considerada após a emissão da radícula, a partir do monitoramento de 10 repetições (bandejas) com 25 sementes de cada espécie.

O processo de germinação até a formação das plântulas foi dividido em sete estádios, a saber: sementes quiescentes (SQ), sementes embebidas após 24 horas (EM), emissão da raiz primária (ER), alongamento da raiz primária (RP), emissão da raiz secundária (RS), emissão do epicótilo (EP) e expansão dos eofilos (EO) (Figura 2). Em cada um dos estádios, o tecido de reserva (endosperma) de, pelo menos, 10 sementes foi liofilizado e triturado em moinho analítico (Ika-Werke/M20), até a obtenção de material finamente pulverizado.

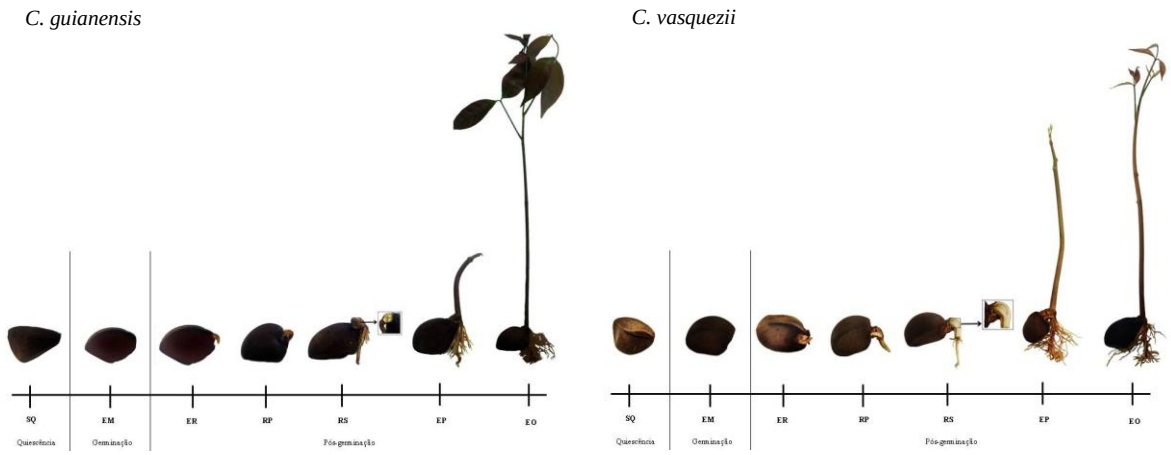

Figura 2: Estádios da germinação e crescimento inicial de plântulas com destaque para os eventos pré e pós germinativos.

* Estádios da germinação e crescimento inicial das plântulas: sementes quiescentes (SQ), sementes embebidas após 24 horas (EM), emissão da raiz primária (ER), alongamento da raiz primária (RP), emissão da raiz secundária (RS), emissão do epicótilo (EP) e expansão dos eofilos (EO).

2.2. Caracterização morfológica da germinação e curva de embebição das sementes

A caracterização morfológica da germinação foi fundamentada em estudos de Ferraz *et al*. (2002, 2003) e Kenfack (2011). O índice de velocidade de germinação (IVG) foi calculado de acordo com método adaptado de Maguire (1962), de acordo com a fórmula a seguir:

$$IVG = \frac{\sum G}{t}$$

na qual:

G: é o número de sementes germinadas;

t=tempo de avaliação até a última germinação.

As dimensões das sementes e plântulas foram medidas nos diferentes estádios para a análise morfológica das duas espécies vegetais pertencentes ao gênero *Carapa* (*C. guianensis* e *C. vasquezii*), segundo descrito na Tabela 1.

Tabela 1: Características morfométricas dos estádios germinativos em espécies do gênero *Carapa*.

Estádios	*C. guianensis*		*C. vasquezii*	
	Raiz (mm)	**Parte aérea (mm)**	**Raiz (mm)**	**Parte aérea (mm)**
SQ	0	0	0	0
ER	10	0	20	0
RP	25	0	55	0
RS	55	0	60	0
EP	55	80	70	130
EO	65	320	80	350

*Sementes quiescentes (SQ), emissão da raiz primária (ER), alongamento da raiz primária (RP), emissão da raiz secundária (RS), emissão do epicótilo (EP) e expansão dos eofilos (EO).

A determinação da curva de embebição das sementes foi realizada, a partir de dez (10) repetições para cada espécie vegetal. Antes de iniciar o processo de embebição, a massa úmida das sementes foi aferida em balança analítica digital com precisão de 0,1 mg. A embebição foi realizada em beckers contendo água destilada, mantidos em temperatura de 29±2°C, assim, foi aferido o ganho de massa, a cada 2 horas, nas primeiras12 horas, e, posteriormente, avaliadas, a cada 12 horas, até a semente atingir o ponto de saturação de água. A curva de embebição foi calculada conforme metodologia descrita por Oliveira e Bosco (2013), utilizando-se a seguinte fórmula:

$$GM = \frac{pf - pi}{pi} x100$$

na qual:
GM= ganho de massa de cada semente;
pf= peso final (ganho de umidade a cada período de aferição).
pi= peso inicial das sementes antes da embebição

2.3. Extração e quantificação de lipídeos

Os lipídeos foram extraídos e estimados com base na massa seca dos diferentes estádios germinativos, de acordo com método adaptado de Silva e Nunomura (2012). As amostras finamente pulverizadas foram inseridas em cartuchos de papel filtro e acondicionadas em aparelho *Soxhlet*, mantidas em refluxo durante seis horas, usando hexano

como solvente orgânico em temperatura de 80°C. Em seguida, os balões foram acondicionados em rotaevaporador para a retirada do solvente, e a aferição dos lipídeos foi realizada em balança analítica de precisão. O teor de lipídeo foi estimado pela relação da amostra seca inicial e o volume final de óleo obtido. O material desengordurado resultante foi utilizado para análises de carboidratos (açúcares solúveis e amido) e nutrientes minerais.

2.4. Extração e quantificação de carboidratos (açúcares solúveis e amido)

Para a extração de carboidratos foram utilizadas amostras de 200 mg de material desengordurado que foram homogeneizadas em 1 mL de álcool 80% e, posteriormente, mantidas em banho-maria a 75°C, durante 30 minutos. Em seguida, foram centrifugadas a 10.000 rpm, durante cinco minutos, retirando-se o sobrenadante. Esse procedimento foi repetido durante três vezes (Black *et al*., 1996).

O material sobrenadante retirado foi misturado em amostras únicas, e posteriormente seco em estufa a 50°C até total evaporação do álcool. Em seguida, foi adicionado 1 mL de água ultrapura para dissolver o material após a secagem possibilitando as análises de açúcares solúveis. O material precipitado da amostra inicial foi seco em estufa, sendo então utilizado para extração e quantificação de amido.

A quantificação de açúcares solúveis foi realizada a partir da diluição de 20 μL da amostra proveniente do sobrenadante da solução inicial, adicionando-se 80 μL de água ultrapura. Dessa diluição inicial, retirou-se 20 μL e adicionou-se 980 μL de água ultrapura, 500 μL de fenol 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico.

A extração do amido foi realizada a partir de 20 mg da amostra do precipitado da solução inicial, diluído em 1,0 mL de ácido perclórico 35%, e homogeneizados em *vortex* durante 15 minutos para digestão do amido. Posteriormente, a solução foi centrifugada a 10.000 rpm, em temperatura de 10°C durante cinco minutos. A quantificação do amido foi realizada com a utilização de 10 μL do sobrenadante da solução, adicionados a 990 μL de água ultrapura, 500 μL de fenol 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico absoluto. Os açúcares solúveis e o amido foram quantificados por espectrofotometria com leitura a 490 nm, utilizando-se glicose (Sigma) como padrão, conforme adaptações realizadas a partir da metodologia descrita por Dubois *et al*. (1956).

2.5. Extração e quantificação de proteínas solúveis

A quantificação de proteínas solúveis foi realizada por meio da extração salina em NaCl 0,15 M (10% p/v). O material finamente pulverizado foi submetido à homogeneização durante duas horas em temperatura ambiente (25±3ºC), seguida de centrifugação a 11.000 g durante 20 minutos a 10ºC. O sobrenadante foi dialisado em água destilada durante 72 horas para a retirada do sal e, então, liofilizado durante 96 horas, resultando no extrato proteico.

A quantificação de proteína solúvel foi realizada a partir de 2 mg de extrato proteico diluído em 1 mL de água destilada. Posteriormente, estimou-se a concentração após a incubação de 100 μL das amostras com 3 mL do reagente Bradford (BioAgency) durante 10 minutos em temperatura ambiente (25±3ºC), com a utilização de albumina sérica bovina (BSA, BioAgency), em leituras espectrofotométricas a 595 nm para estimar a concentração proteica (Bradford, 1976).

2.5.1. Eletroforese em *SDS-PAGE* (*Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrilamide Gel Eletrophoresis*)

A visualização das bandas proteicas foi realizada por meio da utilização de géis de separação obtidos a partir de uma solução estoque de acrilamida a 30% e N-N'-metileno-bis-acrilamida 0,8% m/v. O gel foi preparado na concentração de 5% em tampão Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8) com o gel de separação a 15%, em tampão Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8), e acrescentado em ambos DS 20% m/v. A polimerização foi obtida com adição de TEMED e PSA 10% m/v.

Após a polimerização, as amostras dos diferentes estádios germinativos foram padronizadas para 15 ug de proteínas e posteriomente aplicadas em cada *spot*. Logo após, o gel foi submetido à eletroforese em tampão de corrida Tris-HCl (0,025 M), glicina 0,192 M e SDS 0,1%, a 200 volts, 15 mA/gel, durante 2 horas aproximadamente. Como padrão, foram utilizados marcadores de massas moleculares da Promega (10 a 100 kDa).

Os géis foram corados em solução *Blue Silver* – Comomassie coloidal (G-250) por meio da utilização de três soluções: Solução 1: Etanol 30% e Ácido fosfórico 2%; Solução 2: Ácido fosfórico 2%; Solução 3: Etanol 18%, Ácido fosfórico 2% e Sulfato de amônio 15%. Após a corrida, o gel foi submetido à lavagem por duas vezes em água destilada e, posteriormente, foi incubado 2 vezes na solução um (1) durante 20 minutos, 2 vezes na solução dois (2) durante 20 minutos e na solução três (3) uma vez por 30 minutos. Em

seguida, foi adicionado 1 mL de Comomassie Blue (G-250) 2% e incubado durante 12 horas (Candiano *et al*., 2004). Os géis foram escaneados no *ImageScanner* e a estimativa da massa molecular das proteínas foi realizada em comparação com o marcador da Promega (10 - 100 kDa).

2.6. Detecção da atividade proteolítica total, α amilase, fosfatase ácida e lipase em diferentes estádios da germinação e crescimento inicial de plântulas de *C. guianensis* e *C. vasquezii*

A atividade proteolítica total foi estimada a partir de ensaio enzimático dissolvendo 100 mg de material fresco em 1000 µL de tampão (acetato de sódio 50 mM - pH 5,0). As amostras diluídas em tampão foram centrifugadas a 5.000 g por 10 minutos a 4°C. Uma alíquota de 300 µL do material sobrenadante foi retirada e pré-incubada durante 10 minutos a 37°C após adição de 40 µL de DTT (3 mM) e 160 µL de tampão acetato de sódio 50 mM - pH 5,0. Posteriormente, adicionaram-se 200 µL de azocaseína 1 %, e as amostras foram novamente incubadas durante um período de 60 minutos a 37ºC. A reação foi paralisada com adição de 300 µL de ácido tricloroacético (TCA) 20 %. O controle positivo utilizado foi a enzima comercial bromelaína e como branco foi utilizado todo meio da reação com adição da azocaseína 1% após a paralisação da atividade. Os tubos contendo as reações foram centrifugados (5.000 g durante 10 minutos a 4°C) e 400 µL do sobrenadante foram alcalinizados com 400 µL de uma solução de hidróxido de sódio 2N para realização das leituras espectrofotométricas. A absorbância foi medida por espectofotômetro (Ultrospec 1000 Amersham Pharmacia) a 420 nm. Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como a quantidade de enzima capaz de aumentar a absorbância em 0,01 (Xavier-Filho *et al*., 1989).

A atividade da enzima α-amilase (EC. 3.2.1.1) foi determinada a partir da pré-incubação de 200 µL dos extratos de material fresco das sementes (100 mg/mL em tampão acetato de sódio 0,1 M contendo NaCl 3 mM - pH 5,5) com 100 µL do mesmo tampão citado durante quinze minutos a 40°C. Em seguida, 2 mL de amido 1% foram adicionados, dando prosseguimento à reação durante mais dez minutos. Dois controles positivos foram utilizados, com enzima comercial α-amilase e meio de reação (tampão, amido e lugol) e o branco com meio de reação na ausência da amostra diluída. A reação foi paralisada em banho de gelo após 30 minutos, e, em seguida, após resfriamento, 100 µL dessa reação foi adicionada a 2,5 mL de

solução de lugol (iodo 5% e iodeto de potássio 10%), e, posteriormente, as amostras foram incubadas em temperatura ambiente (25°C) durante trinta minutos. As leituras foram realizadas a λ=550 nm em espectrofotômetro (UV/ Visível Ultrospec 2100 pro, Amersham Biosciences) (Bezerra *et al*., 2004). Uma unidade da enzima α-amilase foi considerada como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 0,1 mg de amido por minuto.

A atividade da enzima fosfatase ácida (EC 3.1.3.2) foi determinada a partir de 100 mg do material fresco da semente diluído em 1 mL de tampão acetato 0,1M (pH 5,7). As amostras diluídas em tampão foram centrifugadas na programação de 10.000 g durante 10 minutos a 10°C. Uma alíquota de 35 µL do sobrenadante do meio reação do extrato foi incubada em 135 µL de tampão acetato 50 mM (pH 5,7), com adição de 10 µL do substrato p-nitrofenil fosfato 5 mM, durante 15 minutos a 37°C em banho-maria. O branco da reação foi solução tampão e água destilada. A paralisação da reação foi por meio da adição de 20 µL de hidróxido de sódio 0,2 N. A atividade enzimática da fosfatase ácida foi estimada a partir de leituras espectrofotométricas em placas de microtitulação de 96 poços, em leitora de Elisa a λ = 405 nm. O cálculo foi realizado a partir de uma curva padrão construída com diferentes concentrações de p-nitrofenil. Uma unidade de atividade da fosfatase ácida foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1µmol de p-nitrofenol por minuto (Maia *et al*., 2000).

A atividade da enzima lipase (EC. 3.1.1.3) foi determinada a partir de 100 mg de material fresco de semente diluídos em 1 mL de tampão Tris HCl 0,1 M (pH 8,0). As amostras diluídas foram centrifugadas a 10.000 g durante 10 minutos a 10°C. Uma alíquota de 300 µL do sobrenadante do extrato enzimático foi retirada e, em seguida, adicionado 1625 µL de tampão Tris HCl 0,1 M (pH 8,0) e 75 µL de solução de dodecanoato de p-nitrofenil 5 mM para se obter o volume final de 2 mL. Posteriormente, as amostras foram incubadas a 55°C, durante 20 minutos, em banho-maria. O controle positivo utilizado foi enzima lipase comercial (5 mg/mL) e, para o branco, utilizou-se o meio de reação sem a presença da amostra. A absorbância de p-nitrofenol liberado foi medida a λ= 410 nm em espectrofotômetro (UV/Visível Ultrospec 2100 pro, Amersham Biosciences). A concentração de p-nitrofenol liberada na reação foi determinada a partir de uma curva de referência do p-nitrofenol (2-20 g/mL em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8). Os ensaios foram realizados em duplicatas. Uma unidade de atividade de lipase foi definida como micromoles de p-nitrofenol liberados a partir de dodecanoato de p- nitrofenila por mL por minuto (Kumar *et al*., 2005).

2.7. Quantificação de macro e micro nutrientes minerais

As amostras desengorduradas provenientes das diferentes fases da germinação e crescimento inicial das plântulas de *C. guianensis* e *C. vasquezii* foram utilizadas para quantificação de macro e micronutrientes. Para análise do fósforo (P), foi utilizada uma solução de molibdato de amônio 2%, que foi dissolvida em 20 g de $(NH4)_6 Mo_7 O_{24}$ p.a e 200 mL de água deionizada. Em outro frasco contendo 500 mL de água deionizada, foi dissolvido 2 g de subcarbonato de bismuto e adicionado 150 mL de H_2SO_4 98% p.a. Utilizou-se também uma solução redutora de ácido ascórbico a 2%, dissolvendo-se 2 g de ácido ascórbico em 100 mL de água deionizada.

Posteriormente, utilizou-se 4,3928 g de KH_2PO_4 p.a seco em balão volumétrico de 1000 mL, diluindo-se em 3 mL de H_2SO_4 98% p.a e o restante do volume foi completado com água deionizada. A solução padrão de trabalho foi utilizada a partir da solução estoque de 1000 $mg.mL^{-1}$ de P, em diluições de 0; 10; 20; 30; 40 e 50 $mg.mL^{-1}$ de P.

Em seguida, foi transferido 1 mL de cada solução de trabalho para balão volumétrico de 50 mL, completando a solução com 5 mL de solução ácida de molibdato de amônio 2%; 2 mL da solução de ácido ascórbico 2% e o restante do volume foi completado com água deionizada. Água ultrapura foi considerada como o branco da reação, e o P foi determinado pelo método molibdato de amônio em espectrofotômetro Shimadzu UV-VIS-120-01 (λ = 660 nm) (Murphy e Riley, 1962).

O nitrogênio total foi quantificado pelo método de Kjeldahl, utilizando procedimentos da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa, 1999). Após a secagem do material em estufa, a 65°C, durante 72 horas, amostras de 100 mg do material desengordurado foram colocadas em tubo de ensaio com 5,0 mL de solução digestora. A digestão da amostra foi realizada em bloco digestor a 350°C até o material apresentar-se incolor. Em seguida, realizou-se a destilação adicionando-se 15 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 40%, após mistura da amostra em 20 mL de água destilada. O destilado foi coletado em becker contendo 10 mL da solução receptora de ácido bórico (H_3BO_3).

A destilação foi completada até 60 mL de uma solução com coloração verde menta, indicando a presença de nitrogênio na amostra. A titulação foi realizada utilizando ácido sulfúrico a 0,01 N. Os nutrientes K, Ca, Mg, Fe, Zn e Mn foram extraídos por digestão nitro-perclórica (Miyazawa *et al.*, 1999) e a determinação foi realizada por espectrometria de absorção atômica.

2.8. Delineamento experimental e análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente ao acaso (DIC) com dois (2) tratamentos, sete (7) estádios de germinação e 3 repetições. A mobilização de reservas dos metabólitos primários ao longo do monitoramento de sete (7) estádios (germinação e crescimento inicial de plântulas) foi analisada a partir do cálculo das médias de proteínas, lipídeos, carboidratos (amido e açúcares solúveis), além da atividade das enzimas lípase, α amilase, proteases, fosfatase ácida, e seus respectivos erros padrões, no intuito de obter as curvas de tendências ao longo dos estádios de germinação e crescimento inicial de plântulas de *C. guianensis* e *C. vasquezii*. As avaliações foram realizadas em triplicatas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Curva de embebição e germinação em sementes de espécies do gênero *Carapa*

A curva de embebição caracterizada pelo acúmulo de água (H_2O) nas sementes foi superior em *C. vasquezii* chegando a 5,9 % em relação à massa fresca inicial, após 192 horas de imersão em água (Figura 3 - A). Em *C. guianensis*, o acúmulo de H_2O não ultrapassou 3,9 % em relação à massa inicial das sementes. Além disso, observou-se que a espécie com maior percentual de embebição foi aquela que apresentou maior nível de germinação acumulada ao longo do tempo (*C. vasquezii*). Esta foi, também, a espécie vegetal com maior percentual de germinação (34,2%). O percentual de germinação em *C. guianensis* foi igual a 32%. Sementes com alto teor de óleo podem apresentar maiores problemas de germinação, o que é justificado pelo fato da via metabólica de catálise de lipídeos ser mais lenta e mais complexa do que a via dos carboidratos, envolvendo a transformação de lipídeos em açúcares pela gliconeogênese (Alves *et al*., 2012).

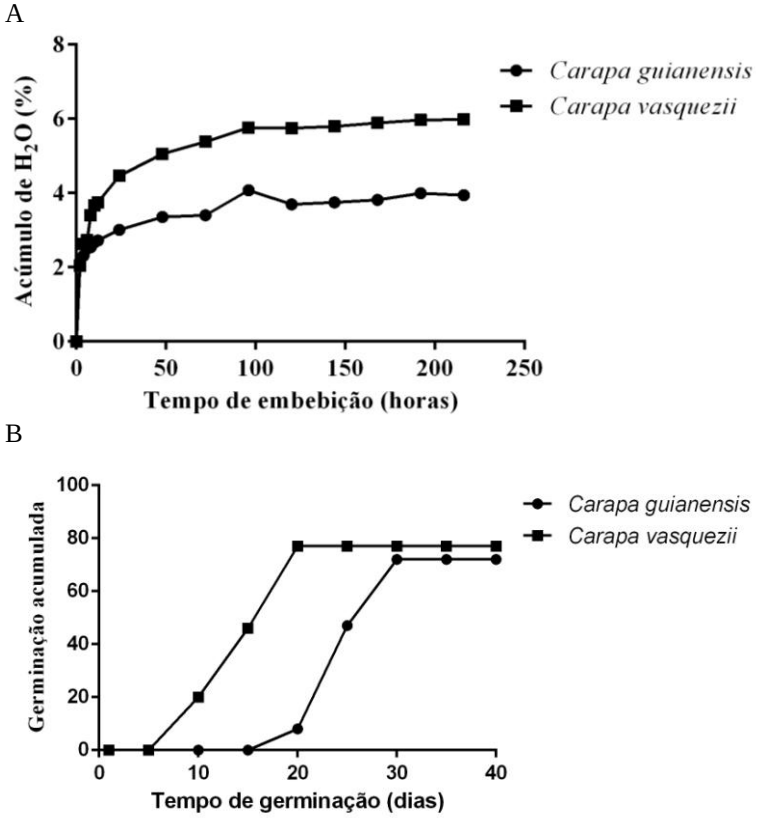

Figura 3: Acúmulo de água em função do tempo de imersão das sementes (A) e germinação acumulada (B) de *C. guianensis* e *C. vasquezii* coletadas na Reserva Florestal Adolpho Ducke.

O início da germinação também foi diferenciado para as duas espécies de *Carapa*. *C. guianensis* iniciou sua germinação 20 dias após a semeadura e *C. vasquezii* iniciou após oito (8) dias (Figura – 3B), apresentando também o maior índice de velocidade de germinação (IVG) – 1,9 sementes germinadas por dia, enquanto *C. guianensis* apresentou IVG de 1,8 sementes germinadas por dia.

3.2. Caracterização morfológica em diferentes estádios de germinação e crescimento inicial de plântulas do gênero *Carapa*

Com relação à caracterização morfológica nos diferentes estádios de germinação e crescimento inicial das plântulas, identificaram-se estruturas semelhantes para as duas espécies, com destaque para diferença no hilo que é mais evidente em sementes quiescentes de *C. vasquezii*, porém com resíduo de placentação aderido em *C. guianensis*. As duas espécies de *Carapa* apresentam cotilédones formando uma massa de reserva única, pois os

cotilédones se encontram fundidos, o eixo embrionário é de tamanho reduzido e localiza-se dentro do tecido cotiledonar próximo da micrópila, a germinação de ambas as espécies consideradas hipógea, criptocotiledonar, e as plântulas apresentam raízes secundárias densas e finas, conforme descrito por Ferraz *et al*. (2003).

Cinco dias após o evento da germinação, ocorreu alongamento da raiz primária (pr) em *C. guianensis*, e no oitavo dia, emergiram as raízes secundárias (rs), o pecíolo cotiledonar (pc) e início da formação do epicótilo (ep). As características do epicótilo quanto à disposição e número de catáfilos foram diferentes nas duas espécies. Em *C. guianensis*, ocorreu a presença de três, e em *C. vasquezii*, foram observados dois catáfilos. No entanto, Ferraz *et al*. (2003) identificaram média de quatro catáfilos em *Carapa guianensis*. No décimo segundo dia após a geminação, houve o alongamento do epicótilo (ep), seguido da emissão dos eofilos (eo) no décimo quarto dia e, somente aos 17 dias após a germinação, ocorreu a expansão dos eofilos (Figura 4).

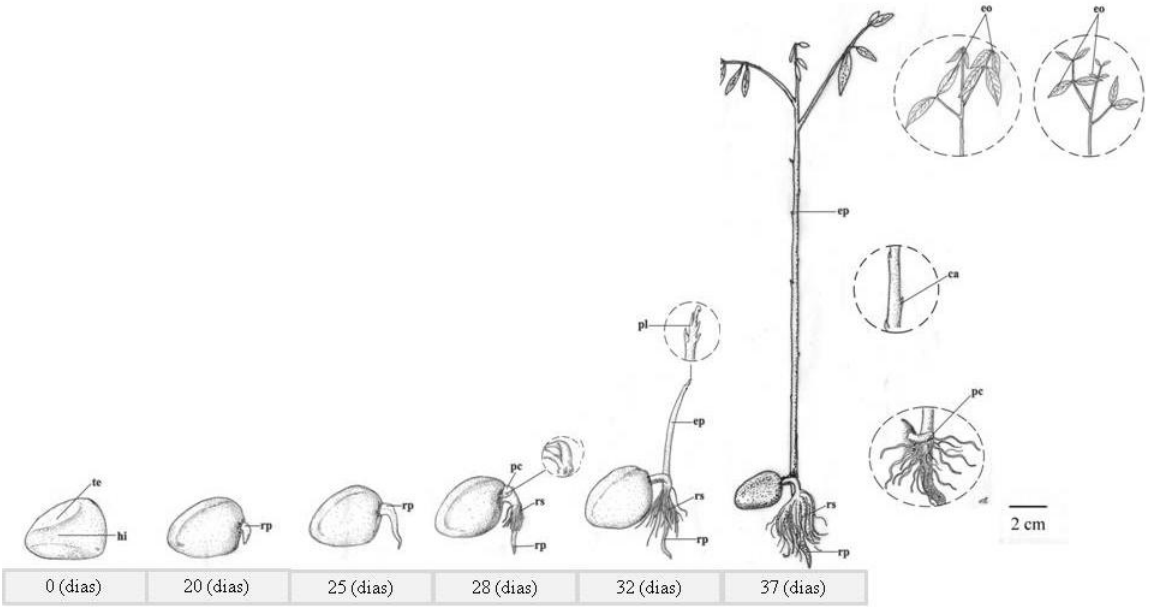

Figura 4: Estádios da germinação e crescimento inicial de plântula de *C. guianensis* destacando-se cada estrutura - te: tegumento; hi: hilo; rp: raiz primária; pc: pecíolo cotiledonar; rs: raiz secundária; pl: plúmula; ep: epicótilo; ca: catáfilo; eo: eofilo.

* Escala de tempo em dias.

Em *Carapa vasquezii*, identificou-se que os eventos pré e pós-germinativos ocorreram em menor período de tempo, uma vez que no quarto dia após a germinação houve o alongamento da raiz primária, seguida do surgimento das raízes secundárias (rs) e do pecíolo

cotiledonar (pc) no sétimo dia. O alongamento do epicótilo (ep) ocorreu 10 dias após a germinação. A emissão e expansão dos eofilos ocorreram aos 12 e 14 dias após a germinação, respectivamente (Figura 5).

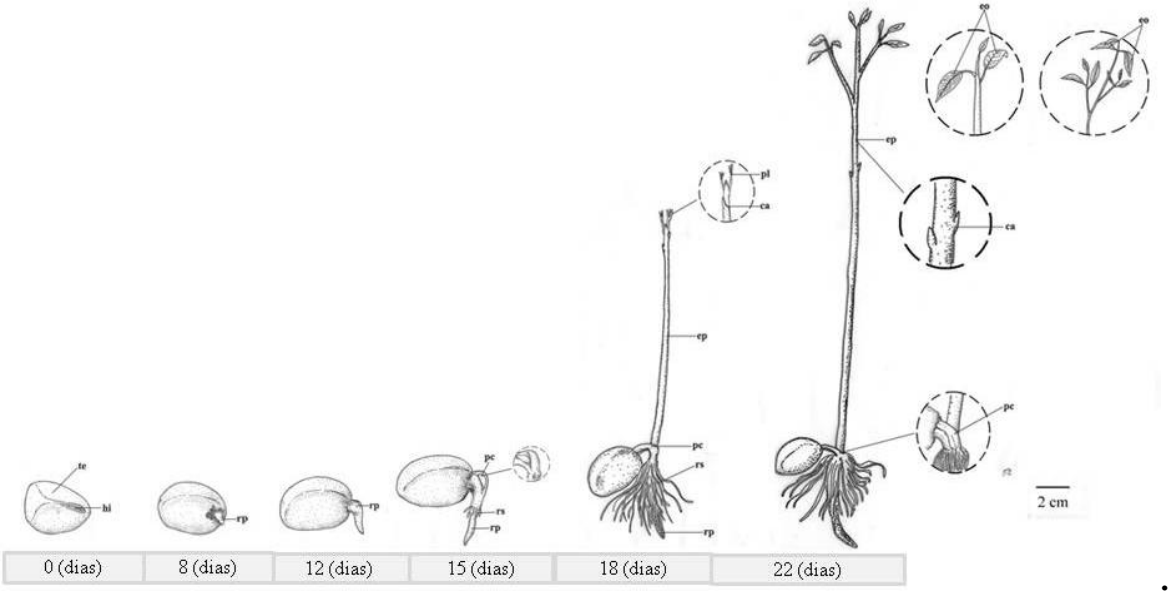

Figura 5: Estádios da germinação e crescimento inicial de plântula de *C. vasquezii* destacando-se cada estrutura - te: tegumento; hi: hilo; rp: raiz primária; pc: pecíolo cotiledonar; rs: raiz secundária; pl: plúmula; ep: epicótilo; ca: catáfilo; eo: eofilo.

* Escala de tempo em dias

3.3. Mobilização das reservas primárias em diferentes estádios da germinação e crescimento inicial de plântulas de espécies do gênero *Carapa*

As características morfológicas das plantas em seus estádios iniciais contribuem para ampliar a informação sobre a espécie, o que é útil para a compreensão da fisiologia, ecologia, filogenia e estratégias de regeneração. Assim, as externalidades morfológicas e a expressão gênica das sementes contribuem para definição das diferentes formas de dispersão e estratégias de germinação (Paula *et al*., 2016).

Logo após a germinação, ocorre a reativação da atividade metabólica das sementes, que envolve a reparação e síntese "*de novo*" de DNA, mobilização e degradação de proteínas e mRNAs armazenados, transcrição e tradução de novos mRNAs seguidos por alongamento celular e protrusão da radícula (Nonogaki *et al*., 2010). Vale ressaltar que os carboidratos, lipídeos e proteínas são as principais reservas presentes nas sementes (Lima *et al*., 2008) e

irão suprir a demanda energética durante as fases de geminação e crescimento inicial de plântulas até que a planta inicie os mecanismos fotossintéticos necessários para síntese de seus recursos (Pritchard *et al*., 2002).

No contexto acima descrito, é sempre importante destacar que a dinâmica da mobilização de reservas do metabolismo primário ocorre também em resposta da expressão gênica e do ambiente de crescimento. De modo geral, os lipídeos foram a principal reserva de energia das Carapas, seja *C. guianensis* ou *C. vasquezii*, o teor mais expressivo ocorreu em sementes quiescentes de *C. guianensis* (63,7±4,7%) (Figura 6 A). A segunda maior reserva em sementes quiescentes foi amido para *C. guianensis* (17,1±0,2%) (Figura 6B) e açúcares solúveis para *C. vasquezii* (15,9±2,2%) (Figura 6C), que também é produto da degradação do amido, podendo ser proveniente da degradação dos lipídeos (Pritchard *et al*., 2002), e juntos são importantes fontes de glicose para o processo respiratório e consequente fonte de geração de energia durante o crescimento inicial de plântulas (He *et al*., 2015).

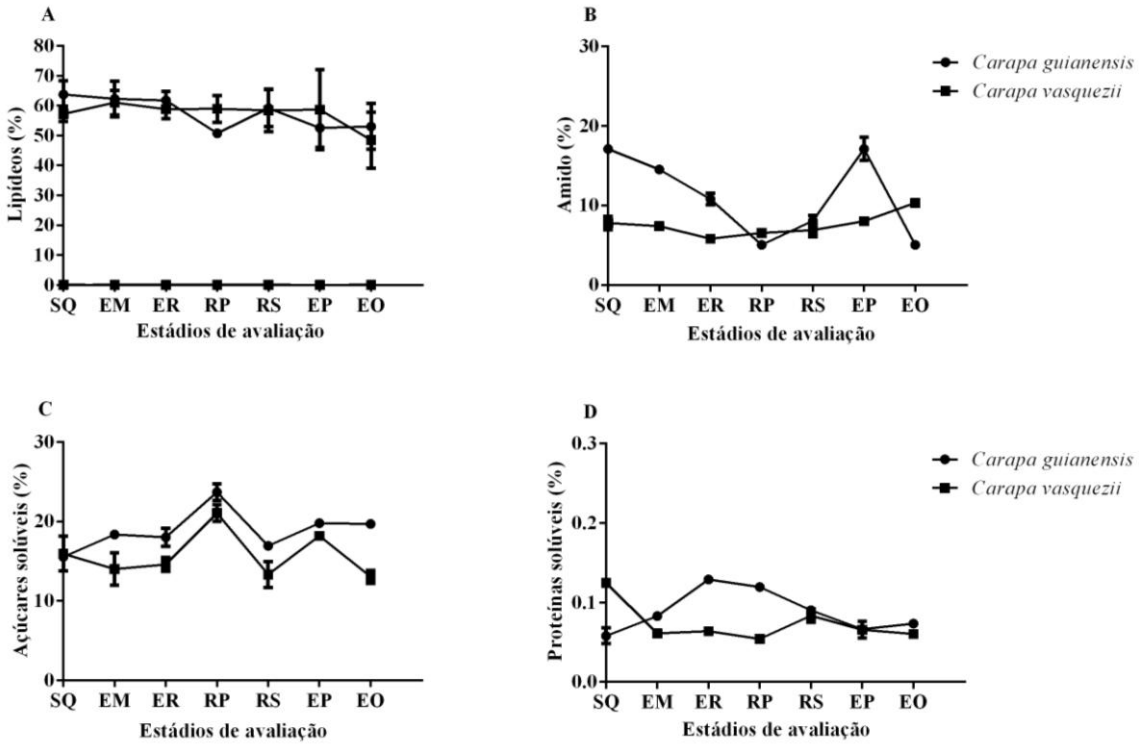

Figura 6: Dinâmica da mobilização de reservas do metabolismo primário durante a germinação e crescimento inicial de plântulas de *C. guianensis* e *C. vasquezii*.

* Estádios de avaliação: Semente quiescente (SQ); Semente embebida após 24 horas (EM); Emissão da raiz primária (ER); Alongamento da raiz primária (RP); Emissão da raiz secundária (RS); Emissão de epicótilo (EP) e Eofilo expandido (EO).

O alto teor de lipídeos e açúcares solúveis pode ser considerado um traço adaptativo que permite o crescimento dessas espécies em condições ambientais adversas, uma vez que essas reservas são transferidas para o embrião e plântula em crescimento com baixo gasto energético (Alencar *et al*., 2012), são também consideradas reservas compactadas de alto valor energético (Melo *et al*., 2015). Adicionalmente, esses componentes do metabolismo primário são de interesse da indústria devido à significativa contribuição do seu valor energético (Gous *et al*., 2015).

As proteínas solúveis foram as reservas de menores percentuais em Carapas, e a *C. guianensis* apresentou os maiores valores com variação de 0,05±0,0003 a 0,12±0,0003% (Figura 6D). Vale ressaltar que as reservas amido e proteínas solúveis foram os metabólitos que apresentaram menor variação durante os estádios de germinação e crescimento inicial de plântulas, principalmente em *C. vasquezii*, o que sugere diferentes mecanismos de regulação dos genes que codificam as enzimas responsáveis pela degradação desses metabólitos (Figura 6B e D).

A mobilização de proteínas em *C. vasquezii* iniciou logo após a embebição, porém a degradação dessa reserva em *C. guianensis* foi obervada somente após o alongamento da raiz primária (Figura 6D), o que representa estratégias diferenciadas das espécies para o uso dos recursos disponíveis. Após a embebição, inicia-se a produção de substratos, principalmente, a partir da produção de fito-hormônios, em particular o ácido giberélico (AG) que irá sinalizar a síntese de enzimas hidrolíticas especializadas para degradação de compostos do metabolismo primário, incluindo amido, lipídeos, proteínas, e durante todo processo, a planta migra de uma situação heterotrófica tornando-se autossuficiente após uma série de eventos fisiológicos, bioquímicos e morfológicos (He *et al*., 2015).

Neste trabalho, a espécie *C. guianensis* destacou-se com as maiores concentrações para a maioria das reservas, principalmente, quando considerado o último estádio (EO), com ênfase para açúcares solúveis (Figura 6C). Além disso, observou-se que a dinâmica de degradação de amido e proteínas solúveis foi variável durante os estádios de germinação e crescimento inicial de plântulas em *C. guianensis* e de menor variação em *C. vasquezii*.

Essas são evidências claras de estratégias diferentes entre as duas espécies, o que sugere ajustes metabólicos durante o início do crescimento como forma de garantir que os recursos sejam utilizados de modo eficiente (Li *et al*., 2015). O equilíbrio entre a síntese e a degradação de compostos orgânicos, também conhecido como *turnover*, determina o crescimento bem-sucedido e o desempenho das plantas permitindo-as maior sucesso de aclimatação em diferentes situações e ambientes de crescimento (Oracz e Stwaska, 2016).

Guardada a abrangência dessa abordagem, dentre os componentes do metabolismo primário aqui discutidos, os lipídeos, têm importância ecológica na dieta de diferentes organismos, biológica para o adequado funcionamento metabólico de plantas e animais e industrial no processamento de novos produtos.

Mesmo presentes em quantidades inferiores, quando comparada com as demais reservas do metabolismo primário em espécies do gênero *Carapa*, as proteínas solúveis são importantes no processo de germinação e crescimento inicial de plântulas, uma vez que sua disponibilização para o crescimento embrionário é regulada pelos aminoácidos que a compõem, e durante a germinação, sua relação com a dinâmica da água é condicionada pelas características hidrofóbicas ou hidrofílicas que diferem entre as espécies (Song, 2009).

O perfil proteico, por meio da análise de eletrofose em *SDS-PAGE*, foi obtido para as duas espécies consideradas, e possibilitou verificar bandas proteicas tanto em condições redutoras quanto não redutoras abaixo de 5 kDa e próxima a 10, 15, 25 kDa em ambas espécies vegetais durante os diferentes estádios da germinação e crescimento inicial de plântulas (Figura 7A, B, C e D). Fato surpreendente foi a presença de uma banda proteica específica na faixa entre 15 e 20 kDa, somente em *C. vasquezii*, e que está presente em todos os estádios de avaliação da germinação e crescimento inicial de plântulas.

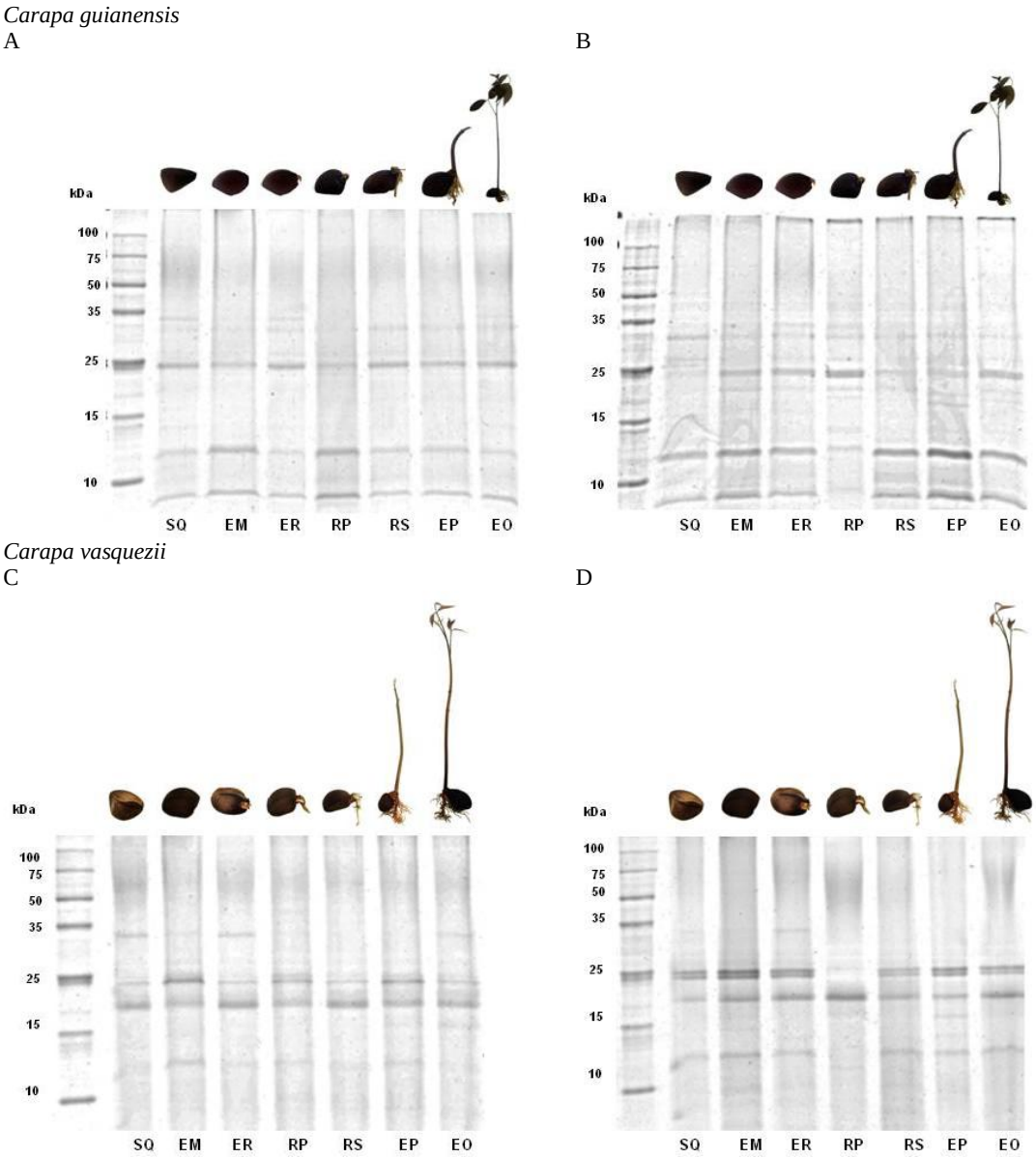

Figura 7: Perfis proteicos dos diferentes estádios da germinação e crescimento inicial de plântulas de *C. guianensis* e *C. vasquezii* na ausência e presença de beta-mercaptoetanol.

* A: Perfil proteico de *C. guianensis* sem β –mercaptoetanol. B: Perfil proteico de *C. guianensis* com *β* –mercaptoetanol. C: Perfil proteico de *C. vasquezii* sem *β* –mercaptoetanol. D: Perfil proteico de *C. vasquezii* com *β* –mercaptoetanol. Estádios de avaliação: Semente quiescente (SQ); Semente embebida após 24 horas (EM); Emissão da raiz primária (ER); Alongamento da raiz primária (RP); Emissão da raiz secundária (RS); Emissão do epicótilo (EP) e Eofilo expandido (EO).

Durante o processo de maturação das sementes, grandes quantidades de proteínas são acumuladas (Oracz e Stwaska, 2016), e logo após a ativação do metabolismo, no estádio de embebição, inicia-se a dinâmica de degradação dessas reservas para fornecimento de energia e biosíntese de novas proteínas (Galland *et al*., 2014). Algumas são altamente conservadas, e, então, reguladas por eventos ambientais, tais como presença ou ausência de nutrientes,

umidade e temperatura do solo, o que sugere a influência do ambiente de crescimento sobre a síntese e degradação dos componentes do metabolismo primário (Gutiérrez-Galeano *et al*., 2015).

3.4. Atividade proteolítica total, α amilase, fosfatase ácida e lipase em diferentes estádios da germinação e crescimento inicial de plântulas de *C. guianensis* e *C. vasquezii*

A maioria das atividades para as enzimas consideradas apresentaram valores médios superiores em *C. guianensis* quando comparada à atividade expressa em *C. vasquezii*, exceto para fosfatase ácida que apresentou maior atividade em *C. vasquezii* (Figura 8A, B, C e D). A mobilização de reservas primárias iniciou logo após a embebição, e nesse processo, a atividade de enzimas são ativadas para que ocorra a degradação do substrato disponibilizando energia que irá favorecer a germinação e crescimento inicial das plântulas (Yu *et al*., 2014).

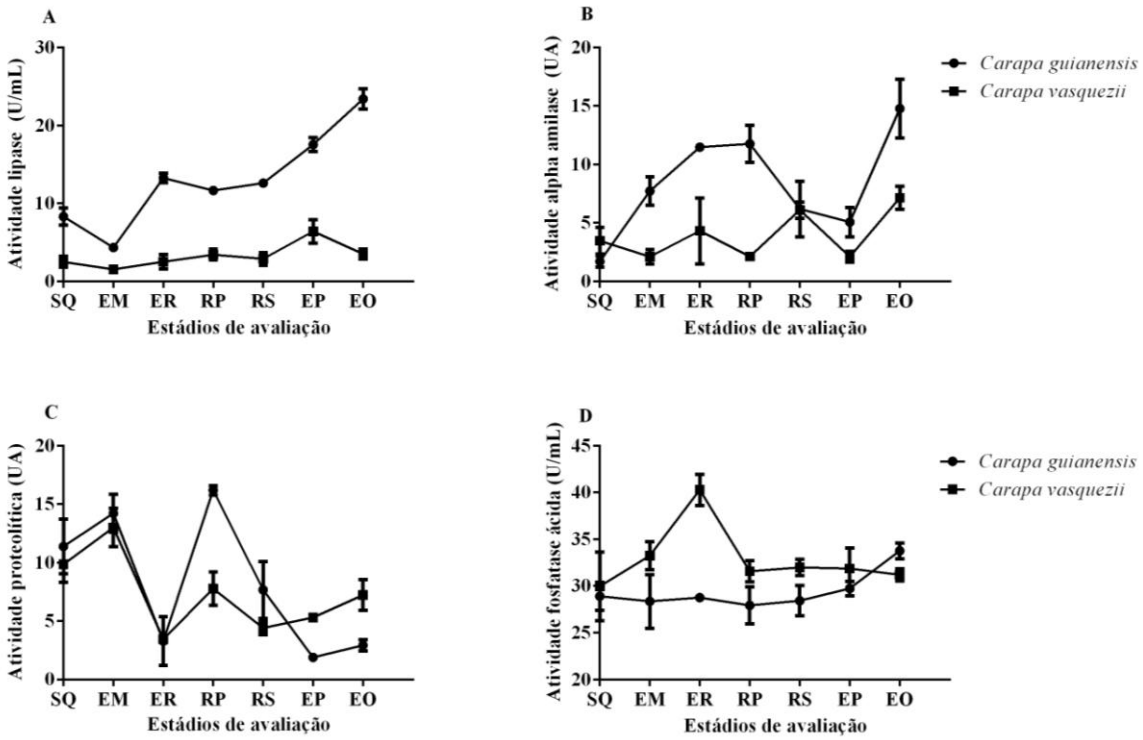

Figura 8: Dinâmica da atividade enzimática durante a germinação e crescimento inicial de plântulas de *C. guianensis* e *C. vasquezii*.

*Estádios de avaliação: Semente quiescente (SQ); Semente embebida após 24 horas (EM); Emissão da raiz primária (ER); Alongamento da raiz primária (RP); Emissão da raiz secundária (RS); Emissão do epicótilo (EP) e Eofilo expandido (EO).

A espécie *C. guianensis* apresentou diminuição do desempenho para a maioria das enzimas consideradas a partir do alongamento da raiz primária (RP), exceto para lipase (Figura 8A) que apresentou aumento da atividade durante todos os estádios, indicando alto gasto de energia e provável utilização de lipídeos como suporte energético aos processos funcionais em curso na germinação e crescimento inicial de plântulas. Os principais produtos da degradação dos lipídeos, especialmente aqueles provenientes do ciclo do triacilglicerol (glicerol e ácidos graxos) também serão convertidos em açúcares fornecendo energia para germinação e crescimento da plântula (Yu *et al*., 2014).

A atividade enzimática em *C. vasquezii* apresentou baixa variação para maioria das análises contempladas neste trabalho, exceto para atividade proteolítica. No entanto, após o estádio de raiz secundária (RS), essa espécie apresentou baixa variação da atividade proteolítica (Figura 8C), o que refletiu também em menores varições na degradação de proteínas solúveis durante o crescimento inicial de plântulas jovens (Figura 6 D). O fato é que *C. vasquezii* dispõe de um aparato metabólico capaz de regular a degradação dos substratos contribuindo para maior germinabilidade e crescimento inicial de plântulas quando comparada com *C. guianensis*.

A atividade da enzima α amilase foi altamente variável, principalmente em *C. guianensis* (Figura 8B), o que contribuiu também na variação da dinâmica de carboidratos durante os estádios de germinação e crescimento inicial de plântulas (Figura 6B e C). A mobilização do amido é importante para disponibilização de açúcares, e esse processo ocorrerá, principalmente, pela ação da α amilase, uma enzima importante para clivagem do amido convertendo-o em açúcares simples que serão disponibilizados para plântula durante seu processo de crescimento (Yu *et al*., 2014).

3.5. Mobilização de macro e micronutrientes em diferentes estádios da germinação em espécies do gênero *Carapa*

Com relação à concentração dos nutrientes minerais, *C. vasquezii* apresentou valores superiores, exceto para potássio (K) e magnésio (Mg), nos quais as espécies apresentaram tendências de concentrações semelhantes ao longo da germinação e crescimento inicial das plântulas (Figura 9). A dinâmica de mobilização de macro e micronutrientes foi similar entre as espécies, com destaque para carbono (C) que teve seu maior nível de degradação no estádio de emissão do epicótilo (EP) em *C. guianensis*, porém em *C. vasquezii*, essa foi a fase de

maior concentração desse nutriente. Os demais nutrientes apresentaram mobilização desde os primeiros estádios avaliados, exceto potássio que apresentou declínio da concentração, principalmente após alongamento da raiz primária (RP).

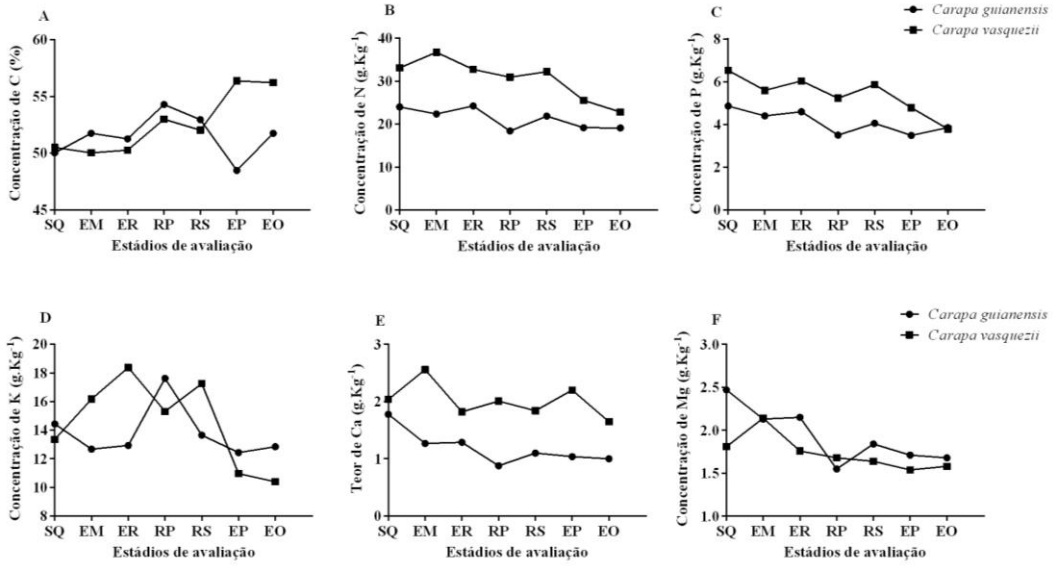

Figura 9: Dinâmica da mobilização de macronutrientes durante a germinação e crescimento inicial de plântulas de *C. guianensis* e *C. vasquezii*.

*Estádios de avaliação: Semente quiescente (SQ); Semente embebida após 24 horas (EM); Emissão da raiz primária (ER); Alongamento da raiz primária (RP); Emissão da raiz secundária (RS); Emissão do epicótilo (EP) e Eofilo expandido (EO).

Ao longo da história evolutiva, as plantas desenvolveram mecanismos que possibilitaram diferentes formas de síntese de compostos orgânicos e assimilação de nutrientes minerais, o que garante alternativas de ajustes, como por exemplo, na assimilação de carbono (C) ou nitrogênio (N) que podem ser fornecidos por meio da utilização de aminoácidos provenientes da síntese de proteínas, e a assimilação do fósforo (P) que poderá ser regulada pela substituição de alguns componentes dos fosfolipídeos por sulfosfolipídeos e glicolipídeos (Raven *et al*., 2005). Os mecanismos de economia e autorregulação na síntese e assimilação de macro e micronutrientes em plantas arbóreas são diferentes (Raven e Andrews, 2010).

A mobilização dos micronutrientes ocorreu desde o estádio de embebição (EM) (Figura 10A, B, C e D), exceto para ferro (Fe) e zinco (Zn) em *C. vasquezii* (Figura 10B e D), o qual apresentaram mobilização mais evidenciada somente após a emissão da radícula, pois são nutrientes de fácil mobilização (Ozturk *et al*., 2006). A mobilização do cobre (Cu) foi similar a que ocorreu com os macronutrientes, regulada durante os estádios de germinação e o

crescimento inicial de plântulas, especificamente, em *C. vasquezii* (Figura 10A), o que seria uma lacuna importante para pesquisas futuras. Os micronutrientes, como o ferro, zinco e manganês apresentam grande importância como componente essencial para atividade de algumas enzimas, considerado um importante nutriente para síntese proteica (Cakmak *et al*., 2011; Ozturk *et al*., 2006).

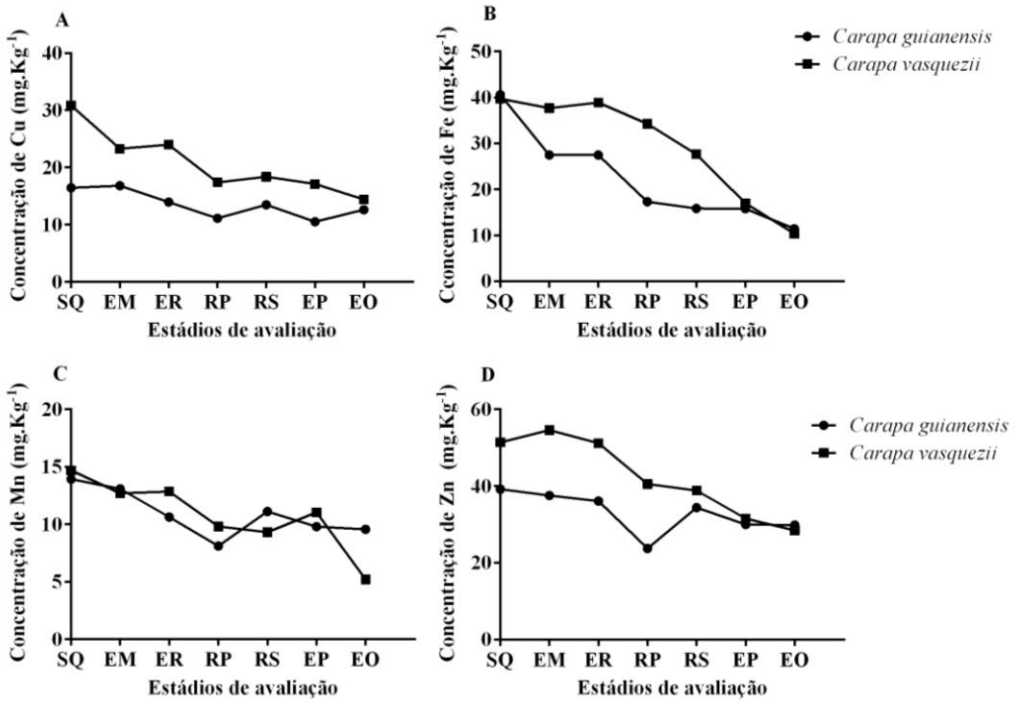

Figura 10: Dinâmica da mobilização de micronutrientes durante a germinação e crescimento inicial de plântulas de *C. guianensis* e *C. vasquezii*.

* Estádios de avaliação: Semente quiescente (SQ); Semente embebida após 24 horas (EM); Emissão da raiz primária (ER); Alongamento da raiz primária (RP); Emissão de raiz secundária (RS); Emissão do epicótilo (EP) e Eofilo expandido (EO).

4. CONCLUSÃO

As Carapas apresentam características morfofuncionais diferentes implicando estratégias de germinação e a mobilização de reservas primárias e de nutrientes minerais também diferentes que podem influenciar, decisivamente, na fisiologia da germinação dessas espécies. A espécie *C. guianensis* exibiu maior atividade metabólica de degradação das reservas orgânicas, apresentando maior atividade enzimática voltada, especialmente, para a atividade da lipase, que está associada à degradação dos lipídeos no processo de germinação e

crescimento inicial de plântulas. *C. vasquezii* apresentou baixa variação nos teores de reservas mobilizados e atividade metabólica durante os estádios de avaliação, principalmente no mecanismo associado à degradação dos lipídeos, amido e proteínas solúveis. Curiosamente essa espécie apresentou os maiores resultados para os parâmetros de embebição e germinação de sementes. No geral, as duas espécies apresentaram diferentes mecanismos quanto à mobilização de reservas primárias, o que caracteriza diferenças no aparato metabólico e uso das reservas durante a germinação e crescimento inicial de plântulas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alencar, N.L.M.; Innecco, R.; Gomes-Filho, E.; Gallão, M.I.; Alvarez-Pizarro, J.C.; Prisco, J.T.; Oliveira, A.B. de. 2012. Seed reserve composition and mobilization during germination and early seedling establishment of Cereus jamacaru D. C. ssp. jamacaru (Cactaceae). *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, 84(3): 823-832.

Alves, F.V.; Sá Junior, A. de; Santana, D.G.; Santos, C.M. dos. 2012. Composição química e qualidade fisiológica de sementes de girassol de plantas submetidas à competição intraespecífica. *Revista Brasileira de Sementes*, 34(3): 457-465. https://doi.org/10.1590/S0101-31222012000300013.

Bewley, J.D. 2001. Seed germination and reserve mobilization. *In:* _____. *Encyclopedia of Life Sciences*. Wiley, New York. p. 1-7.

Bezerra, I.W.L.; Teixeira, F.M.; Oliveira, A.S.; Leite, E.L.; Queiroz, K.C.S. 2004. αAmylase inhibitors from *Ficus* sp. seeds and their activities towards coleoptera insect. *Protein and Peptide Letters*, 11(2): 181-187.

Black, M.; Corbineau, F.; Grzesik, M.; Guy, P.; Côme, D. 1996. Carbohydrate metabolism in the developing and maturing wheat embryo in relation to is desiccation tolerance. *Journal Experiment of Botanic*, 47(295): 161-169.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.

Cakmak, I.; Torun, A.; Millet, E.; Feldman, M.; Fahima, T.; Korol, A.; Nevo, E.; Braun, H.J.; Özkan, H. 2011. *Triticum dicoccoides*: an important genetic resource for increasing zinc and iron concentration in modern cultivated wheat. *Soil Science and Plant Nutrition*, 50(7): 1047-1054. https://doi.org/10.1080/00380768.2004.10408573.

Candiano, G.; Bruschi, M.; Musante, L.; Santucci, L.; Ghinggeri, G.M.; Carnemollar, B.; Orecchia, P.; Zardi, L.; Righetti, P.G. 2004. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*, 25: 1327-1333. https://doi.org/10.1002/elps.200305844.

Czarna, M.; Kolodziejczak, M.; Janska, H. 2016. Mitochondrial proteome studies in seeds during germination. *Proteomes*, 4(19): 1-16. https://doi.org/10.3390/proteomes4020019.

Dembélé, U.; Lykke, A.M.; Koné, Y.; Témé, B.; Kouyaté, A.M. 2015. Use-value and importance of socio-cultural knowledge on Carapa procera trees in the Sudanian zone in Mali. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 11(14): 1-10.

Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A.; Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3): 350-356.

Embrapa. 1999. *Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes*. Embrapa Solos, Brasília, DF. 370pp.

Ferrraz, I.D.K.; Camargo, J.L.C.; Sampaio, P. de T.B. 2002. Sementes e plântulas de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl. e *Carapa procera* D. C.): aspectos botânicos, ecológicos e tecnológicos. *Acta Amazônica*, 32(4): 647-661.

Ferraz, I.D.K.; Camargo, J.L.C.; Sampaio, P. de T.B. 2003. *Andiroba (Carapa guianensis Aubl.; Carapa procera D. C.) Meliaceae*. INPA, Manaus. 6pp.

Funasaki, M.; Barroso, H. dos S.; Fernandes, V.L.A.; Menezes, I.S. 2016. Amazon rainforest cosmetics: chemical approach for quality control. *Química Nova*, 39(2): 194-209.

Galland, M.; Huguet, R.; Arc, E.; Cueff, G.; Job, D.; Rajjou, L. 2014. Dynamic proteomics emphasizes the importance of selective mRNA translation and protein turnover during Arabidopsis seed germination. *Molecular & Cellular Proteomics*, 13: 252-268. doi: 10.1074/mcp.M113. 032227.

Gous, P.W.; Gilbert, R.G.; Fox, G.P. 2015. Drought-proofing barley (Hordeum vulgare) and its impact on grain quality: a review. *Journal of the Institute of Brewing*, 121: 19-27. https://doi.org/10.1002/jib.187.

Gutiérrez-Galeano, D.F.; Toscano-Morales, R.; Calderón-Pérez, B.; Xoconostle-Cázares, B.; Ruiz-Medrano, R. 2015. Structural divergence of plant TCTPs. *Frontiers in Plant Science*, 5: 1-11. https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00361.

He, M.; Zhu, C.; Dong, K.; Zhang, T.; Cheng, Z.; Li, J.; Yan, Y. 2015. Comparative proteome analysis of embryo and endosperm reveals central differential expression proteins involved in wheat seed germination. *BioMed Central Plant Biology*, 15(97): 1-17. https://doi.org/10.1186/s12870-015-0471-z.

Kenfack, D. 2011. *Carapa vasquezii* (Meliaceae): a new species from western Amazonia. *Brittonia*, 63(1): 7-10.

Kumar, S.; Kikon, K.; Upadhyay, A.; Kanwar, S.S.; Gupta, R. 2005. Production, purification, and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic Bacillus coagulans BTS-3. *Protein Expression and Purification*, 41: 38-44. https://doi.org/10.1016/j.pep.2004.12.010.

Li, Z.; Phillip, D.; Neuhäuser, B.; Schulze, W.X.; Ludewig, U. 2015. Protein dynamics in young maize root hairs in response to macro- and micronutrient deprivation. *Journal of Proteome Research*, 14(8): 3362-3371. https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00399.

Lima, R.B.S.; Gonçalves, J.F. de C.; Pando, S.C.; Fernandes, A.V.; Santos, A.L.W. 2008. Primary metabolite mobilization during germination in rosewood (*Aniba rosaeodora* Ducke) seeds. *Revista Árvore*, 32(1): 19-25.

Maguire, J.D. 1962. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science*, 2: 176-177.

Maia, F.C.; Moraes, D.M. de; Moraes, R. de. C.P. 2000. Atividade total da fosfatase ácida e da α-amilase induzidas por ácido jasmônico em sementes de soja. *Revista Brasileira de Sementes*, 22(1): 259-263.

Melo, R.B. de; Franco, A.C.; Silva, C.O.; Piedade, M.T.F.; Ferreira, C.S. 2015. Seed germination and seedling development in response to submergence in tree species of the Central Amazonian floodplains. *AoB Plants*, 7: 1-12. https://doi.org/10.1093/aobpla/plv041

Miyazawa, M.; Pavan, M.A.; Muraoka, T.; Carmo, C.A.F. de S. do; Mello, W.J. de. 1999. Análises químicas de tecido vegetal. *In:* Silva, F.C. da (Ed). *Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes*. Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, Brasília, DF. p. 171-223.

Murphy, J.; Riley, J.P. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta*, 27:31-36.

Nonogaki, H.; Bassel, G.W.; Bewley, J.D. 2010. Plant science germination: still a mystery. *Plant Science*, 179: 574-581. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.02.010.

Oliveira, A.B. de; Bosco, M.R. de O. 2013. Biometria, determinação da curva de absorção de água em sementes e emergência inicial de plântulas de *Copernicia hospita* Martius. *Revista Brasileira de Agroecologia*, 8(1): 66-74.

Oracz, K.; Stawska, M. 2016. Cellular recycling of proteins in seed dormancy alleviation and germination. *Frontiers in Plant Science*, 7: 1-8. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01128.

Ozturk, L.; Atilla, M.; Yucel, C.; Torun, A.; Cekic, C.; Bagci, A. 2006. Concentration and localization of zinc during seed development and germination in wheat. *Physiologia Plantarum*, 128: 144-152. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2006.00737.x.

Paula, S. de O.; Sousa, J.A. de; Brito, E.S. de; Gallão, M.I. 2016. The morphological characterization of the dry seeds and reserve mobilization during germination in Morinda citrifolia L. *Revista Ciência Agronômica*, 47(3): 556-563. https://doi.org/10.5935/1806-6690.20160067.

Pritchard, S.L.; Charlton, W.L.; Baker, A.; Grahan, I.A. 2002. Germination and storage reserve mobilization are regulated independently in *Arabdopsis*. *Plant Journal*, 31: 639-647.

Raven, J.A.; Andrews, M. 2010. Evolution of tree nutrition. *Tree Physiology*, 30: 1050-1071. https://doi.org/10.1093/treephys/tpq056.

Raven, J.A.; Andrews, M.; Quigg, A.M. 2005. The evolution of oligotrophy: implications for breeding of crop plants for low input agricultural systems. *Annals of Applied Biology*, 146: 261-280.

Ricardo, L.M.; Paula-Souza, J.; Andrade, A.; Brandão, M.G.L. 2017. Plants from the Brazilian traditional medicine: species from the books of the Polish physician Piotr Czerniewicz (Pedro Luiz Napoleão Chernoviz, 1812-1881). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 27(3): 388-400. https://doi.org/10.1016/j.bjp.2017.01.002.

Silva, S.G.; Nunomura, R. de C.S. 2012. Liminoides isolados dos frutos de Carapa guianensis Aublet (Meliaceae). *Química Nova*, 35(10): 1936-1939.

Song, J. 2009. Insight into “insoluble proteins” with pure water. *FEBS Letters*, 583: 953-959. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.02.022.

Xavier Filho, J.; Campos, F.A.P.; Ary, M.B.; Silva, C.P.; Carvalho, M.M.M.; Macedo, M.L.R.; Lemos, F.J.A.; Grant, G. 1989. Poor correlation between the levels of proteinase inhibitors found in seeds of different cultivars of cowpea (*Vigna unguiculata*) and the resistance/susceptibility to predation by *Callosobruchus maculatus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37: 1139-1143.

Yu, Y.; Guo, G.; Lv, D.; Hu, Y.; Li, X.; Yan, Y. 2014. Transcriptome analysis during seed germination of elite Chinese bread wheat cultivar Jimai 20. *BioMed Central Plant Biology*, 14(20): 1-19.

CAPÍTULO 4

Perfil lipidômico do óleo de espécies do gênero *Carapa* e implicações sobre o crescimento micelial e germinação de esporos de fungos fitopatogênicos. Manuscrito em preparação para *Industrial Crops and Products.*

Perfil lipidômico do óleo de sementes de espécies do gênero *Carapa* e implicações sobre o crescimento micelial e germinação de esporos de fungos fitopatogênicos

RESUMO

Óleos de espécies do gênero *Carapa* são muito utilizados para o controle de enfermidades e produção de cosméticos. Neste trabalho caracterizou-se o perfil lipidômico do óleo de *Carapa guianensis* e *C. vasquezii* com ênfase nos compostos majoritários e suas implicações sinergéticas na inibição de fungos fitopatogênicos (*Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Fusarium oxysporum* e *Penicillium chrysogenum*). O óleo de *Carapa guianensis* apresentou as maiores concentrações de oelato de metila (42,3%), palmitato de metila (26,0%) e ácido oleico (12,5%) como compostos majoritários. *Carapa vasquezii* destacou-se pelas maiores concentrações de oelato de metila (38,6%), palmitato de metila (20,5%) e ácido oleico (14,5%). O óleo de *C. guianensis* apresentou uma particularidade que foi a presença dos compostos ácido mirístico (composto saturado) (0,1%), 11 - eicosanoato de metila (metil éster de ácido graxo que é composto insaturado) (0,1%), escaleno (0,1%) e *β*-sitosterol (0,1%). Por outro lado, foi verificado ácido araquídico (composto saturado) (0,15%) especificamente em *C. vasquezii*. Os óleos das duas espécies proporcionaram resultados satisfatórios para inibição fúngica na concentração de 250 µL/mL, destacando-se os maiores percentuais de inibição para o óleo de *C. vasquezii* que apresentou inibição do crescimento micelial para *Fusarium oxysporum* em todas as dosagens consideradas. Os óleos de sementes de Carapa apresentaram inibição da germinação de *A. flavus*, *A. niger*, *F. oxysporum* e *P. chrysogenum*, com este último fungo apresentando germinação 72 horas após instalação do experimento. Os óleos de *C. guianensis* e *C. vasquezii* apresentaram perfil lipidômico similares para os compostos majoritários, com diferenças nas concentrações em maior quantidade, principalmente, de ácidos graxos saturados em *C. vasquezii*, a espécie que apresentou melhores resultados de inibição fúngica para *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Fusarium oxysporum* e *Penicillium chrysogenum* com total inibição do crescimento micelial, sugerindo ações sinergéticas das substâncias no controle de fungos fitopatogênicos.

Palavras-chave: Andiroba; fitopatologia; lipídeos; sementes florestais.

Lipidomic profile of seed oil of species of the genus *Carapa* and implications for the control of phytopathogenic fungi

ABSTRACT

The oils of species of the genus *Carapa* are widely used for the control of diseases and the production of cosmetics. In this work, the lipidomic profile of the oil of *Carapa guianensis* and *C. vasquezii* was characterized, with emphasis on the major compounds and their synergistic implications in the inhibition of phytopathogenic fungi (*Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Fusarium oxysporum* and *Penicillium chrysogenum*). In this work, for oil of *Carapa guianensis*, it was verified that higher concentrations of methyl oleate (42.3%), methyl palmitate (26.0%) and oleic acid (12.5%) were present as major compounds. *Carapa vasquezii* was distinguished by the higher concentrations of methyl oleate (38.6%), methyl palmitate (20.5%) and oleic acid (14.5%). The oil of *C. guianensis* showed a particularity that was the presence of myristic acid compounds (saturated compound) (0.1%), methyl 11-eicosanoate (fatty acid methyl ester, which is unsaturated compound) (0.1 %), scalene (0.1%) and *β*-sitosterol (0.1%). On the other hand, arachidic acid (saturated compound) (0.15%) was found specifically in *C. vasquezii*. The oils of both species provided satisfactory results for fungal inhibition at the concentration of 250 µL/mL, with the highest percentages of inhibition for the oil of *C. vasquezii* which showed inhibition of mycelial growth for

Fusarium oxysporum at all dosages considered. The oils of Carapa seeds presented inhibition of the germination of *A. flavus*, *A. niger*, *F. oxysporum* and *P. chrysogenum*, with the latter fungus presenting germination 72 hours after installation of the experiment. The oils of *C. guianensis* and *C. vasquezii* present similar lipidomic profile for the major compounds, with differences in the concentrations in greater quantity mainly of saturated fatty acids in *C. vasquezii*, being the species that presented better results of fungal inhibition for *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Fusarium oxysporum* and *Penicillium chrysogenum* with total inhibition of mycelial growth, suggesting synergistic actions of the substances in the control of phytopathogenic fungi.

Keywords: Andiroba; phytopathology; lipids; forest seeds.

1. INTRODUÇÃO

A presença de componentes com princípio ativo, em óleos vegetais, e que sejam efetivos contra organismos causadores de doenças em animais ou plantas (fungos, vírus e bactérias) estimula a descrição da composição de substâncias naturais e impulsiona a investigação para descoberta de produtos com propriedades a serem implementadas na bioindústria (Nayak *et al*., 2010). Nessa perspectiva, produtos provenientes de plantas são importante meio para prospecção de substâncias com potencial para o controle de agentes causadores de doenças (Shokri, 2016).

Algumas espécies arbóreas são importantes do ponto de vista de estratégias da conservação, uma vez que são consideradas fontes múltiplas por apresentar madeira de boa qualidade e serem amplamente utilizadas para o controle de doenças (Rist *et al*., 2012; Dembélé *et al*., 2015). O gênero *Carapa* destaca-se nesse cenário, uma vez que sua madeira apresenta qualidades desejáveis para o mercado consumidor (Oliveira *et al*., 2015) e o óleo proveniente de suas sementes apresenta diversidade de compostos liminoides altamente oxigenados, considerados marcadores químicos presentes em espécies vegetais da família botânica Meliaceae (Sarria *et al*., 2011), e que são substâncias de interesse da bioindústria por apresentar princípios ativos associados a atividade antibacteriana, antipalúdica, antiviral (Funasaki *et al*., 2016) e antifúngica. No entanto, ainda não se tem encontrado relatos científicos sobre as propriedades do óleo de andiroba no crescimento micelial e germinação de esporos em fungos fitopatogênicos.

Diversos fungos especializaram-se no ataque de plantas como fontes energéticas, podendo causar prejuízos em culturas de interesse comercial. Para o controle dessas doenças, vem-se utilizando, convencionalmente, produtos químicos. Porém métodos alternativos têm sido aperfeiçoados, como por exemplo, a utilização de óleos vegetais. Adicionalmente, a conservação e comercialização de óleos vegetais podem oferecer oportunidades para

utilização de produtos com potencial econômico, incentivar a conservação de espécies valiosas e a beleza cênica de seus respectivos ambientes de crescimento. No entanto, pouca informação tem sido relatada sobre os perfis químicos e atividade biológica das moléculas presentes nos óleos extraídos de sementes de plantas arbóreas com fins na inibição de fungos fitopatogênicos (Nonviho *et al*., 2014). Além disso, registros sobre o espectro de atividade e os mecanismos de ação dessas substâncias ainda são pouco conhecidos, fato que reduz a credibilidade científica sobre os efeitos desses produtos no controle de doenças (Shokri, 2016). Dessa forma, o objetivo com este trabalho foi caracterizar o perfil lipidômico de óleos obtidos de sementes de espécies do gênero *Carapa* e as suas implicações na inibição de fungos fitopatogênicos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

As sementes foram coletadas a partir de 10 matrizes de cada espécie (*Carapa guianensis* e *C. vasquezii*) com ocorrência na Reserva Adolpho Ducke, Manaus, Amazonas (Figura 1). Os indivíduos foram georreferenciados para efeitos de localização.

Figura 1: Local de coleta de sementes para as análises da atividade antifúngica de óleos de duas espécies do gênero *Carapa*. Reserva Florestal Adolpho Ducke, Manaus, Amazonas, Brasil.

2.1. Extração de óleo de sementes de *Carapa* spp.

O material sólido do endosperma das sementes foi separado do tegumento, seco em estufa a 65ºC até a obtenção de massa constante e posteriormente, foi triturado em moinho analítico até a obtenção de um material finamente pulverizado. O hexano foi utilizado como solvente orgânico (Kittigowittana *et al*., 2013) para obtenção dos óleos por meio da extração via *Soxhlet* (Zhu *et al*., 2011; Djenontin *et al*., 2012).

Para extração do óleo, o material finamente pulverizado (2 a 2,5 g) foi acondicionado em cartuchos de papel filtro, utilizando-se 100 mL de solvente para extração do óleo. As amostras foram submetidas ao fluxo do solvente por um período de 6 horas, sob temperatura de 65°C. Em seguida, o solvente foi removido por evaporação (Chunhieng *et al*., 2008). O rendimento foi obtido pela relação entre a massa seca e a quantidade de óleo obtido. O óleo extraído foi acondicionado em frasco tipo âmbar e mantido sob refrigeração a 4°C para análises posteriores (Minzangi *et al*., 2011).

2.1.1. Análise do perfil lipidômico de óleos extraídos de sementes de *Carapa* spp.

A caracterização do perfil lipidômico de amostras de óleos de espécies do gênero *Carapa* foi realizada nos Laboratórios de Investigação Sistemática em Biotecnologia e Biodiversidade Molecular da Univisersidade Federal do Pará – UFPA. Os lipídeos obtidos das amostras de sementes foram submetidos ao processo de transesterificação em meio alcalino para análise dos compostos químicos, e foram identificados por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas – CG/EM (Chaves *et al*., 2004).

A reação de transesterificação em meio alcalino foi adaptada de Geris *et al*. (2007). Amostras de 10 mg foram diluídas em metóxido de potássio 2N (TBx-1) e submetidas a banho ultrassônico durante 2 minutos a 30ºC±2. Em seguida foram adicionados 200 µL de n-hexano, agitados suavemente durante 10 segundos e centrifugados durante 1 minuto a 10.000 rpm, e, então, utilizada a fase orgânica da solução que foi transferida para novos tubos (TBx-2).

Um volume de 110 µL de HCl 2N foi adicionado em cada tubo (TBx-1) de cada amostra, agitando-se novamente, durante 10 segundos. Posteriormente, adicionou-se 200 µL da mistura CH_2Cl_2:n-hexano na proporção de 1:1 (v/v), e a solução foi novamente agitada durante 10 segundos. Adicionou-se 1 mL de água deionizada para retirar o excesso de ácido

da fase orgânica, e centrifugou-se nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante de cada solução foi transferido para seu respectivo tubo (TBx-2) e as amostras foram concentradas com fluxo de gás inerte a 35ºC/5psi/20 minutos. As amostras concentradas foram submetidas ao processo de derivatização com BSTFA+1%TMCS.

A derivatização das amostras foi realizada com N,O-bis (trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA)+ 1% de trimetil-clorosilano (TMCS) para simular as moléculas livres que não foram transesterificadas e as demais que apresentavam hidroxilas livres. Nas amostras dos tubos (TBx-2) foram adicionados 50 µL do derivatizante e os tubos foram incubados em banho de ultrassom durante 20 minutos a 30ºC. Em seguida, os solventes foram evaporados a 35ºC/5psi/20 min e, posteriormente, adicionou-se 500 µL de n-hexano:CH_2Cl_2 na proporção de 1:1 (v/v) aos respectivos tubos, agitados suavemente durante 10 segundos e o conteúdo foi transferido para frascos de vidro de 2 mL com tampa e septo. Posteriormente foram analisados por Cromatografia Gasosa Acoplada ao Espectrômetro de Massa – CG/EM.

Nessas análises, o gás hélio foi utilizado como carreador a um fluxo de 1 mL.min.^{1}, com injeção de amostra de 1,0 µL no modo *Splitless*. As identificações das substâncias foram realizadas por meio da comparação dos espectros de massas com os das bibliotecas comerciais NIST2011, WILEY2009, FAMES2011 e o tempo de retenção de cada composto presente nas amostras.

2.2. Efeito de óleos de sementes de espécies do gênero *Carapa* sobre o crescimento micelial de fungos fitopatogênicos

Neste trabalho foram utilizados isolados de fungos fitopatogênicos cultivados no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA. Os fungos utilizados foram as seguintes espécies: *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Fusarium oxysporum* e *Penicillium chrysogenum*, todas espécies de fungos causadores de doenças a cultivos agrícolas.

Os agentes fitopatogênicos foram todos identificados morfologicamente em nível de espécie por comparações na literatura e auxílio de especialistas da área. Posteriormente, retiraram-se discos do meio de cultivo contendo a cultura monospórica com o auxílio de um vazador de cinco mm de diâmetro. Os discos contendo micélios da cultura monospórica foram posicionados no centro das placas de petri para o cultivo e manutenção das colônias fúngicas (Grigoletti Júnior e Lau, 1999).

2.2.1. Cultivo dos fungos fitopagênicos

O cultivo e a manutenção dos fungos foram realizados em 25 mL de meio de cultura *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) estéril, distribuídos em placas de petri (100 x 15 mm), mantidos em câmara de germinação do tipo *Biochemical Oxigen Demand* (B.O.D.), a 25±1ºC, umidade de 70% e fotoperíodo de 12 horas. O meio de cultura foi constituído de 65 g de (*Sabouraud Dextrose Agar*) dissolvido em 1 litro de água destilada, autoclavado durante 20 minutos, a 120ºC. Os procedimentos de manuseio das colônias fúngicas foram realizados em câmara de fluxo laminar contendo chama de fogo (Souza *et al*., 2011).

2.2.1.1.Obtenção das suspensões de estruturas reprodutivas

A obtenção das suspensões das estruturas reprodutivas foi realizada com a utilização de uma alça de *drigalski* (previamente flambada), após adição de 10 mL de água destilada aos meios de culturas contendo os respectivos fungos. As suspensões obtidas foram utilizadas para realização dos ensaios de inibição de crescimento e germinação dos fungos. Essas suspensões foram ajustadas para uma concentração de 2 x 10^5 conídios/mL. As análises foram realizadas com o auxílio de uma câmara de *Neubauer* em microscópio óptico (Olimpus System Microscope BX 60) (Souza *et al*., 2011).

2.2.1.2 Ensaio de inibição do crescimento fúngico em meio líquido

Os ensaios da inibição do crescimento micelial fúngico foram desenvolvidos em placas de microtitulação com 96 poços, adicionando-se 10 µL de suspensões de esporos (2x10^5 esporos/mL) e 90 µL de meio YPD (*Yeast Peptone Dextrose*). Tween 80 foi adicionado ao óleo como agente emulsificante.

As placas contendo as amostras de suspensões de esporos foram incubadas durante um período de 24 h na ausência de luz, a 27ºC. Após esse período, foram adicionadas as concentrações de óleo em diluição seriada (250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81; 3,9 e 0 µL de lipídeos/mL do meio de crescimento). Os controles negativos e positivos do crescimento micelial foram acetato de sódio 50 mM (pH 5,0) e peróxido de hidrogênio 200 mM, respectivamente, com adição de Tween 80 (1%) sobre os fungos fitopatogênicos. O

crescimento fúngico foi monitorado por meio de leituras espectrofotométricas com absorbância a 630 nm, em intervalos de 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 96, 108 e 120 horas em leitora de ELISA (Biotrak II Plate Reader, Amersham Biosciences), e encerradas as avaliações até os poços contendo a testemunha negativa apresentassem absorbância de 2 nm. Os valores foram representados em microlitro de óleo por mililitro de meio de cultura, a partir de quatro ensaios realizados independentemente para cada espécie fúngica (Souza *et al*., 2011).

2.2.1.3. Ensaio de inibição da germinação de estruturas reprodutivas

Amostras contendo suspensões de esporos na concentração de $40x10^5$ foram utilizadas para verificar o efeito de óleos de sementes de espécies de *Carapa* sobre a germinação de esporos de *A. flavus*, *A. niger*, *F. oxysporum* e *P. chrysogenum* na concentração de 250 μL/mL. As emulsões foram incubadas em tubos de 2 mL, a 25ºC na ausência de luz, e avaliadas a cada 12 horas, durante 48 horas, para acompanhamento da germinação de esporos fúngicos.

Como controles utilizaram-se suspensões de esporos ($40x10^5$) em meio de cultivo líquido (YPD) – controle negativo e peróxido de hidrogênio 200 mM – controle positivo, ambos com adição de Tween 80 a 1%. Decorrido o tempo de germinação, o material foi visualizado em microscópio óptico ("Olimpus System Microscope BX 60"). Os esporos foram considerados germinados quando apresentaram tubo germinativo de, no mínimo, duas vezes o comprimento da hifa (Souza *et al*., 2011).

2.3. Delineamento experimental e análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado para os bioensaios com fungos fitopatogênicos foi o inteiramente casualizado (DIC), obedecendo o esquema fatorial (2 óleos de diferentes espécies vegetais x 5 concentrações - 250; 125; 62,5; 31,25 e 0 μL/mL x 4 espécies de fungos) com 3 repetições para cada tratamento/dosagem de óleo. A variável resposta utilizada foi o percentual de inibição em absorbância de 630 nm. As análises de germinação de esporos foram feitas em triplicatas e fotodocumentadas.

Os resultados quantitativos foram submetidos à análise de variância, associada ao teste Tukey ao nível de 5% de significância. Realizou-se também o ajuste dos resultados de inibição à função polinomial quadrática e como critérios para o ajuste das equações foram considerados: 1) significância da função utilizada; 2) significância de seus coeficientes; 3) coeficiente de determinação (R^2). As análises foram realizadas por meio da linguagem de programação R (R Core Team, 2015).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Perfil lipidômico do óleo de sementes de espécies do gênero *Carapa*

As análises de Cromatografia Gasosa acoplada em Espectrometria de Massas - CG/EM possibilitaram a verificação de 23 compostos lipídicos no perfil da composição do óleo de C. *guianensis*, em amostras de óleos provenientes de matrizes da região de Manaus, Amazonas, Brasil (Tabela 1).

Tabela 1: Perfil lipidômico dos compostos majoritários presentes no óleo de *Carapa guianensis* Aubl. por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas. Amostras coletadas na Reserva Adolpho Ducke, Manaus, Amazonas, Brasil.

(Continua)

Componentes químicos	IK	Tr	%Area
Glicerol 3 TMS	1100	9,77	0,10
N-dodecanol 1TMS	1300	14,15	0,10
NI	1381	15,94	0,10
NI	1398	16,3	0,20
Ácido mirístico 1TMS	1477	17,92	0,11
Ácido 11-hexadecanoico 1TMS	1512	18,56	0,70
Palmitato de metila	1530	19,01	26,0
NI	1586	19,99	0,24
Ácido palmítico 1TMS	1603	20,31	8,02
Oleato de metila	1636	20,93	42,30
Estearato de metila	1644	21,25	6,04
Ácido oleico	1700	22,09	12,55

Tabela 1: Perfil lipidômico dos compostos majoritários presentes no óleo de *Carapa guianensis* Aubl. por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas. Amostras coletadas na Reserva Adolpho Ducke, Manaus, Amazonas, Brasil.

(Conclusão)

Componentes químicos	IK	Tr	%Area
Ácido esteárico 1TMS	1707	22,25	1,36
11-eicosanoato de metila	1733	22,71	0,15
Araquidoato de metila	1743	22,96	1,10
NI	1781	23,56	0,20
Benzoato de metila	1836	24,58	0,23
NI	1861	25,03	0,10
Lignocerato de metila	1924	26,09	0,15
Esqualeno	1965	26,79	0,10
β-sitosterol 1TMS	2311	30,34	0,10
NI	2388	30,94	0,10
NI	2713	32,71	0,15

*IK: Índice de rentenção de *Kovats*; Tr: Tempo de retenção em minutos.

Do total de 23 substâncias verificadas, 16 foram identificadas em nível molecular. Dentre as substâncias identificadas no óleo de *C. guianensis* coletada na região de Manaus, Amazonas, destacaram-se oelato de metila (42,3%), palmitato de metila (26,0%) e ácido oleico (12,5%) como compostos majoritários, considerando-se a abundância relativa dos compostos (Figura 2).

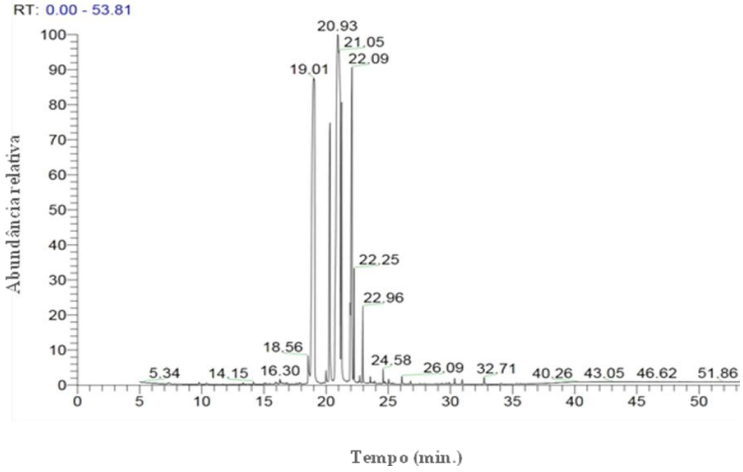

Figura 2: Perfil lipidômico das principais substâncias encontradas no óleo de *Carapa guianensis* Aubl. por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM). *Amostras coletadas na Reserva Adolpho Ducke, Manaus, Amazonas, Brasil.

Em *C. vasquezii* coletada em Manaus – AM, a exemplo do que ocorreu em *C. guianensis*, também foi verificada a presença de 23 substâncias na composição do óleo extraído das sementes. Deste total, apenas 13 foram identificadas em nível molecular (Tabela 2). A semelhança de *C. guianensis*, os ácidos graxos e ésteres metílicos de ácidos graxos foram os compostos majoritários na composição do óleo de *C. vasquezii* (Tabela 2).

Tabela 2: Perfil lipidômico dos compostos majoritários presentes no óleo de *Carapa vasquezii* Kenfack por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas. Amostras coletadas na rodovia AM – 010, Km 42, Manaus, Amazonas, Brasil.

(Continua)

Componentes químicos	IK	Tr	%Area
Glicerol 3TMS	1100	9,77	0,10
N-dodecanol 1TMS	1300	14,15	0,10
NI	1380	15,93	0,10
NI	1398	16,3	0,20
Ácido 11-hexadecanoico 1TMS	1511	18,56	0,14
Palmitato de metila	1535	19,01	20,54
NI	1586	19,98	0,11
Ácido palmítico 1TMS	1603	20,3	8,40
Oleato de metila	1636	20,95	38,60
Estearato de metila	1644	21,25	10,52

Tabela 2: Perfil lipidômico dos compostos majoritários presentes no óleo de *Carapa vasquezii* Kenfack por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas. Amostras coletadas na rodovia AM – 010, Km 42, Manaus, Amazonas, Brasil.

(Conclusão)

Componentes químicos	IK	Tr	%Area
Ácido oleico 1TMS	1700	22,09	14,50
Ácido esteárico 1TMS	1722	22,27	3,54
NI	1707	22,52	0,10
NI	1732	22,64	0,23
Araquidoato de metila	1743	22,94	1,12
NI	1784	23,61	0,75
Ácido araquídico 1TMS	1799	23,91	0,15
NI	1810	24,09	0,13
Benzoato de metila	1836	24,58	0,30
NI	1861	25,03	0,10
Lignocerato de metila	1924	26,09	0,12
NI	2388	30,94	0,10
NI	2713	32,71	0,10

*IK: Índice de rentenção de *Kovats*; Tr: Tempo de retenção em minutos.

O perfil lipidômico e os percentuais dos compostos majoritários foram similares entre as duas espécies, porém ressaltam-se diferenças para abundância relativa (Figura 3) e os percentuais de oelato de metila (38,6%), palmitato de metila (20,5%) e ácido oleico (14,5%) no óleo de *Carapa vasquezii* (Tabela 2). Nesse sentido, a composição química exibindo diferenças quantitativas e não necessariamente qualitativas de amostras oriundas do mesmo sítio florestal pode repercutir aspectos relacionados as diferenças genéticas das espécies. Ademais, os percentuais dos compostos presentes nos óleos podem conferir particularidades quanto suas frações biologicamente ativas.

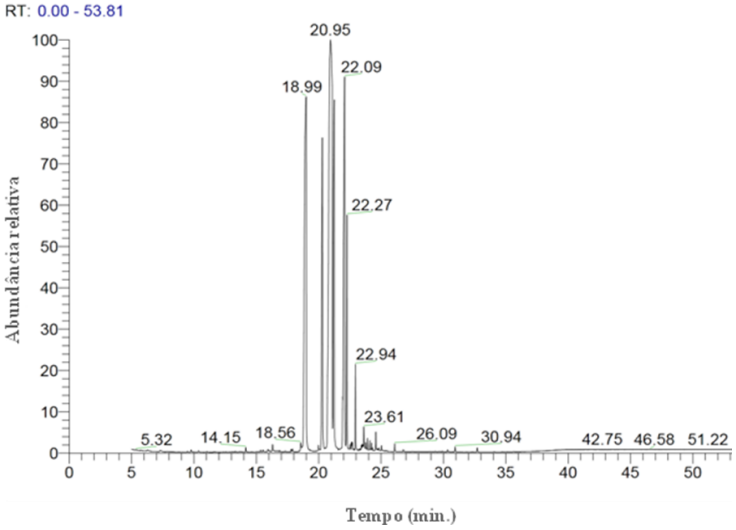

Figura 3: Perfil lipidômico das principais substâncias encontradas no óleo de *Carapa vasquezii* Kenfack por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas.

* Amostras coletadas na rodovia AM – 010, Km 42, Manaus, Amazonas, Brasil.

A composição do óleo de andiroba (*Carapa* spp.) é atrativo para indústria de cosméticos e farmacêutica, principalmente, pela presença de acilglicerol com altos níveis de insaturações, e também pela presença de terpenoides (Dioum *et al*., 2016), esteróis e liminoides com amplo espectro de aplicações (Cabral *et al*., 2013). A presença e teores dessas substâncias podem refletir a variabilidade genética das espécies (Milhomem *et al*., 2016). Valem destacar também que, as condições de armazenamento das sementes, as técnicas de extração dos óleos e análise dos compostos são fundamentais e influenciam na obtenção dos resultados (Boukhatem *et al*., 2014).

O perfil lipidômico revelou particularidades nos óleos de espécies do gênero *Carapa* que devem ser analisadas com especial atenção. O óleo de *C. guianensis* apresentou uma particularidade que foi a presença dos compostos ácido mirístico (composto saturado) (0,11%), 11 - eicosanoato de metila (metil éster de ácido graxo que é composto insaturado) (0,15%), escaleno (composto insaturado) (0,1%) e *β*-sitosterol (composto insaturado) (0,1%). Por outro lado, o ácido araquídico (composto saturado) (0,15%) foi observado, exclusivamente, em amostras de óleos de *C. vasquezii*. Além disso, as duas espécies (*C. guianensis* e *C. vasquezii*) compartilharam 12 moléculas do total de substâncias identificadas (Figura 4).

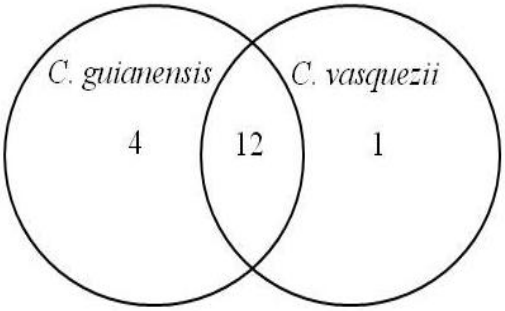

Figura 4: Diagrama de *Venn* com indicação do número de substâncias compartilhadas dos óleos entre as diferentes espécies do gênero *Carapa*.

Neste trabalho, do total de compostos identificados nas duas espécies vegetais (17) (Figura 4), houve predomínio de compostos saturados em *Carapa guianensis* (13 compostos) quando comparada com *C. vasquezii* (11). Por outro lado, o percentual da área de cada composto, assim como sua relação sinérgica com os demais compostos podem ser também um fator relevante para sua atividade biológica sobre organismos fitopatogênicos. O grau de insaturações dos compostos presentes nos óleos também é importante para caracterizar sua atividade fungicida, uma vez que ácidos graxos saturados podem apresentar maiores efeitos no controle de fungos fitopatogênicos (Liu *et al*., 2008). É interessante ressaltar que, de 12 compostos químicos compartilhados pelas duas espécies vegetais, 5 apresentaram maiores percentuais na composição do óleo de *C. vasquezii* (ácido palmítico – 8,4%; estearato de metila – 10%, ácido oleico – 14,5%; ácido esteárico – 3,5% e benzoato de metila – 0,3%).

3.2. Efeito de diferentes concentrações de óleos extraídos de sementes de Carapas sobre o crescimento micelial de fungos fitopatogênicos

O ajuste da inibição do crescimento micelial em função das diferentes concentrações de óleos de duas espécies de *Carapa* por meio da função polinomial revelou resultados promissores para o uso do óleo de Carapas no controle de agentes fitopatogênicos (*A. flavus*, *A. niger*, *F. oxysporum* e *P. chrysogenum*) (Tabela 3).

Tabela 3: Ajuste de modelo não linear (função quadrática) para o efeito da inibição de óleos de espécies do gênero *Carapa* sobre o crescimento micelial de quatro espécies fitopatogênicas de importância econômica.

Fungo	Óleo	Equação ajustada	R^2	*p-value*
A. flavus	*C. guianensis*	$Y=-0,0001444x^2+0,281x-3,806$	0,9846	0,0309
	C. vasquezii	$Y=-0,0009726x^2+0,6329x+22,74$	0,7478	0,0001
A. niger	*C. guianensis*	$Y=0,0004345x^2-0,043488x+10,48$	0,9169	0,0001
	C. vasquezii	$Y=-0,0003913x^2+0,422x-9,704$	0,8381	0,0001
F. oxysporum	*C. guianensis*	$Y=0,000589x^2+0,4963x-0,09477$	0,9682	0,0001
	C. vasquezii	$Y=-0,0009846x^2+0,6277x+27,69$	0,6538	0,0001
P. chrysogenum	*C. guianensis*	$Y=0,00055x^2-0,1377x+9,887$	0,9136	0,0001
	C. vasquezii	$Y=-0,0004751x^2+0,4718x-12,95$	0,8261	0,0001

Além disso, observou-se que, de modo geral, o óleo que apresentou maiores percentuais de atividade antifúngica foi o proveniente de sementes de *C. vasquezii* e que as espécies fúngicas mais sensíveis à atividade dos óleos foram *A. flavus* e *F. oxysporum*, uma vez que os percentuais de inibição dos óleos foram satisfatórios mesmo quando em concentrações inferiores a 100 µL/mL (Figura 5). Além da composição do óleo, outro fator relevante é a composição da parede celular fúngica, que vai influenciar sua maior ou menor sensibilidade às substâncias com potencial antifúngico. Nesse sentido, a composição da parede celular fúngica é importante como seu mecanismo de defesa, uma vez que fungos mais sensíveis apresentaram menores teores de esteróis, o que irá aumentar a fluidez de membranas fúngicas, quando em situações induzidas pelo efeito inibidor de ácidos graxos (Avis *et al.*, 2001). Mas os mecanismos de ação antifúngica dos óleos ou mesmo dos ácidos graxos para os óleos de espécies do gênero *Carapa* necessitam de maior investigação.

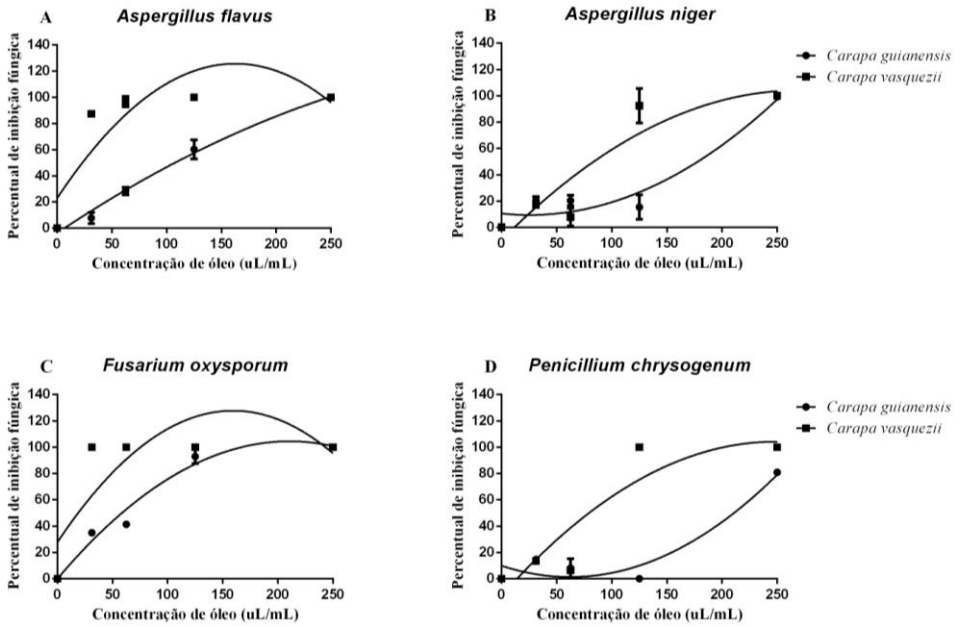

Figura 5: Efeito de diferentes dosagens de óleos de espécies do gênero *Carapa* sobre o crescimento fúngico de espécies fitopatogênicas.

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, o óleo proveniente da espécie *Carapa vasquezii* foi o que apresentou melhores resultados de inibição fúngica (Tabela 4). Adicionalmente, foi o óleo que apresentou concentrações superiores da maioria dos compostos químicos pertencentes ao grupo dos ácidos graxos saturados (estearato de metila – 10,5%, ácido palmítico – 8,4%, ácido esteárico – 3,5%, araquidoato de metila – 1,1%, benzoato de metila – 0,3%) quando comparado à composição do óleo de *C. guianensis*. Além disso, o óleo de *C. vasquezii* apresentou exclusivamente a presença do ácido araquídico (0,15%), também um composto saturado.

Tabela 4: Efeito antifúngico de óleos provenientes de sementes de duas espécies do gênero *Carapa* sobre fungos fitopatogênicos.

(Continua)

Fungo	**[ ] (µL/mL)**	**Inibição fúngica do óleo (%)**	
		C. guianensis	***C. vasquezii***
	0	0±0 Bd	0±0 Bb
	31,25	4,72±2,38 Bd	86,98±1,08 Aa
Aspergillus flavus	62,5	25,87±1,72 Bc	96,57±2,34 Aa
	125	58,89±4,32 Bb	100±0 Aa
	250	92,11±7,89 Aa	100±0 Aa

Tabela 4: Efeito antifúngico de óleos provenientes de sementes de duas espécies do gênero *Carapa* sobre fungos fitopatogênicos.

(Conclusão)

Fungo	[ ] (µL/mL)	Inibição fúngica do óleo (%)	
		C. guianensis	***C. vasquezii***
Aspergillus niger	0	0±0 Bc	0±0 Bb
	31,25	20,5±1,61 Bb	17,05±1,07 Bb
	62,5	20,36±2,29 Bb	7,72±3,94 Bb
	125	12,06±7,61 Bb	92,42±7,58 Aa
	250	99,28±0,72 Aa	100±0 Aa
Fusarium oxysporum	0	0±0 Be	0±0 Bb
	31,25	34,99±0,75 Bd	100±0 Aa
	62,5	41,36±0,82 Bc	100±0 Aa
	125	92,93±3,09 Bb	100±0 Aa
	250	100±0 Aa	100±0 Aa
Penicillium chrysogenum	0	0±0 Cc	0±0 Cc
	31,25	14,65±0,61 Bb	13,3±1,53 Bb
	62,5	8,04±4,14 Cbc	7,51±1,95 Ccb
	125	0±0 Cc	100±0 Aa
	250	80,93±0,54 Aa	99,57±0,42 Aa

*Médias das inibições fúngicas seguidas de letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente para o fator concentração e seguidas de letras maiúsculas iguais não diferem para o tipo de óleo.

Em estudo verificando ação antifúngica de ácidos graxos sobre o crescimento micelial de *Alternaria solani*, *Colletotrichum lagenarium*, *Fusarium oxysporum*, verificou-se inibição, sugerindo maior eficiência de ácidos graxos saturados quando comparados com insaturados (Liu *et al*., 2008). Em geral, a eficiência antifúngica dos ácidos graxos está associada com o aumento do comprimento da cadeia de carbonos (Sado-Kamdem *et al*., 2009), porém, o comprimento excessivo da cadeia de carbono dos ácidos graxos reduz a sua solubilidade dificultando a mistura do óleo ou composto ao meio de crescimento fúngico (Pohl *et al*., 2011). Ademais, os ácidos graxos saturados são mais estáveis e lineares, possuem a ausência de dupla ligação e, portanto, apresentam lenta peroxidação, assim, conservam suas propriedades por maior tempo (Liu *et al*., 2014).

3.3. Efeito de óleos de espécies do gênero *Carapa* sobre a germinação de estruturas reprodutivas de fungos fitopatogênicos

A atividade antifúngica de óleos de sementes de espécies de *Carapa* foi confirmada por meio do ensaio de inibição da germinação de esporos, no qual, verificou-se que a germinação de esporos de *A. flavus*, *A. niger*, *F. oxysporum* e *P. chrysogenum* foi inibida utilizando 250 µL/mL do óleo de *C. guianensis* e *C. vasquezii*. Ressalta-se que em *A. flavus* (óleo de *C. vasquezii*) e *A. niger* (óleo de *C. guianensis* e *C. vasquezii*) iniciou-se germinação em alguns esporos após 24 horas (Figura 6 – C, E e F).

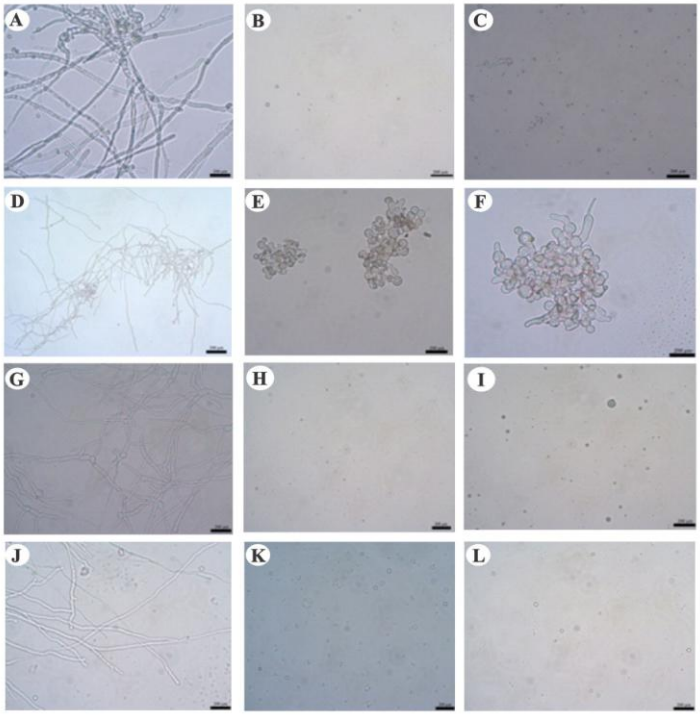

Figura 6: Germinação de esporos fúngicos submetidos à ação de óleos de *Carapa*.

* A: Teste controle para germinação de *Aspergillus flavus*. B: Ação do óleo de *C. guianensis* após a lavagem dos esporos fúngicos de *A. flavus*. C: Ação do óleo de *C. vasquezii* após a lavagem dos esporos fúngicos de *A. flavus*. D: Teste controle para germinação de *A. niger*. E: Ação do óleo de *C. guianensis* após a lavagem dos esporos fúngicos de *A. niger*. F: Ação do óleo de *C. vasquezii* após a lavagem dos esporos fúngicos de *A. niger*. G: Teste controle para germinação de *F. oxysporum*. H: Ação do óleo de *C. guianensis* após a lavagem dos esporos fúngicos de *F. oxysporum*. I: Ação do óleo de *C. vasquezii* após a lavagem dos esporos fúngicos de *F. oxysporum*. J: Teste controle para germinação de *P. chrysogenum*. K: Ação do óleo de *C. guianensis* após a lavagem dos esporos fúngicos de *P. chrysogenum*. L: Ação do óleo de *C. vasquezii* após a lavagem dos esporos fúngicos de *P. chrysogenum*.* Escala: 200 µm.

Vale ressaltar que os mecanismos de ação de óleos vegetais sobre o crescimento e germinação de esporos ainda não estão bem esclarecidos. Alguns trabalhos sugerem

alterações morfológicas, especificamente na parede celular com o aumento da fluidez da membrana, seguida da destruição de organelas incluindo a mitocôndria e o núcleo, e, finalmente, a desorganização do conteúdo citoplasmático seguido de degradação generalizada e lise celular (Polh *et al*., 2011; Shokri, 2016). Neste trabalho, identificamos inibição do crescimento micelial e da germinação de esporos de *A. flavus*, *A. niger*, *F. oxysporum* e *P. chrysogenum* após submetê-los a diferentes concentrações de óleos extraídos de sementes de *C. guianensis* e *C. vasquezii*. Mas, o real mecanismo de ação ainda precisa ser investigado.

4. CONCLUSÃO

Espécies do gênero *Carapa* apresentam perfil lipidômico diferentes em termos quantitativos e certa similaridade do ponto de vista qualitativo, embora a presença dos ácidos graxos saturados também ressaltem possíveis diferenças destas espécies. De modo geral, o óleo das duas espécies (*C. guianensis* e *C. vasquezii*) apresentou resultados promissores para a inibição do crescimento micelial e germinação de esporos de *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Fusarium oxysporum* e *Penicillium chrysogenum*. Curiosamente, *C. vasquezii* foi a espécie que apresentou os maiores resultados médios para inibição fúngica e as maiores concentrações de ácidos graxos saturados na composição do óleo.

Portanto, estudos posteriores devem ser realizados no sentido de fundamentar o mecanismo de ação das substâncias presentes em óleos de espécies vegetais do gênero *Carapa* no intuito de identificar o princípio ativo de cada componente químico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Avis, T.J.; Traquair, P.; Boekhout, J. 2001. Specificity and mode of action of the antifungal fatty acid cis -9-Heptadecenoic acid produced by Pseudozyma flocculosa. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(2): 956-960. https://doi.org/10.1128/AEM.67.2.956.

Boukhatem, M.N.; Ferhat, M.A.; Kameli, A.; Saidi, F.; Kebir, H.T. 2014. Lemon grass (*Cymbopogon citratus*) essential oil as a potent anti-inflammatory and antifungal drugs, *Libyan Journal of Medicine*, 9: 1-10.

Cabral, E.C.; Cruz, G.F. da; Simas, R. de C.; Sanvido, G.B.; Gonçalves, L. de V.; Leal, R.V.P. *et al*. 2013. Typification and quality control of the Andiroba (*Carapa guianensis*) oil via mass spectrometry fingerprinting. *Analytical Methods*, 5: 1385-1391.

Chaves, M.H.; Barbosa, A.S.; Moita Neto, J.M.; Aued-Pimentel, S.; Lago, J.H.G. 2004. Caracterização química do óleo da amêndoa de *Sterculia striata* St. Hil. et Naud. *Química Nova*, 27(3): 404-408.

Chunhieng, T.; Hafidi, A.; Pioch, D.; Brochier, J.; Montet, D. 2008. Detailed study of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H. B. K.) oil micro-compounds: phospholipids, tocopherols and sterols. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 65(19): 1374-1380.

Dembélé, U.; Lykke, A.M.; Koné, Y.; Témé, B.; Kouyaté, A.M. 2015. Use-value and importance of socio-cultural knowledge on Carapa procera trees in the Sudanian zone in Mali. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 11(14): 1-10.

Dioum, M.D.; Seck, M.; Silvestre, V.; Planchat, A.; Loquet, D.; Lhoard, S.; Barille-Nion, S.; Remaud, G.; Robins, R.J.; Tea, I. 2016. A Ring-D-Seco-Tetranortriterpenoid from Seeds of Carapa procera Active against Breast Cancer Cell Lines. *Planta Med*, 82: 967-972.

Djenontin, T.S.; Wotto, V.D.; Avlessi, F.; Lozano, P.; Sohounhloué, D.K.C.; Pioch, D. 2012. Composition of *Azadirachta indica* and *Carapa procera* (Meliaceae) seed oils and cakes obtained after oil extraction. *Industrial Crops and Products*, 38: 39-45.

Funasaki, M.; Barroso, H. dos S.; Fernandes, V.L.A.; Menezes, I.S. 2016. Amazon rainforest cosmetics: chemical approach for quality control. *Química Nova*, 39(2): 194-209.

Geris, R.; Santos, N.; Amaral, B.; Maia, I.; Castro, V.; Carvalho, J.R.M. 2007. Biodiesel de soja: reação de transesterificação para aulas práticas de química orgânica. *Química Nova*, 30(5): 1369-1373.

Grigoletti Júnior, A.; Lau, D. 1999. Crescimento de isolados de *Cylindrocladium spathulatum* da Ervamate de cinco Regiões do Estado do Paraná. *Boletim de Pesquisa Florestal*, 38: 67-75.

Kittigowittana, K.; Wongsakul, S.; Krisdaphong, P.; Jimtaisong, A.; Saewan, N. 2013. Fatty acid composition and biological activities of seed oil from rubber (Hevea brasiliensis) cultivar RRIM 600. *International Journal of Applied Research in Natural Products*, 6(2): 1-7.

Liu, S.; Ruan, W.; Li, J.; Xu, H.; Wang, J.; Gao, Y.; Wang, J. 2008. Biological control of phytopathogenic fungi by fatty acids. *Mycopathologia*, 166: 93-102. https://doi.org/10.1007/s11046-008-9124-1.

Liu, X.; Han, R.; Wang, Y.; Li, X.; Zhang, M.; Yan, Y. 2014. Fungicidal activity of a medium-chain Fatty acids mixture comprising caprylic, pelargonic and capric acids. *Plant Pathology Journal*, 13(1): 65-70.

Milhomem-Paixão, S.S.R.; Fascineli, M.L.; Roll, M.M.; Longo, J.P.F.; Azevedo, R.B.; Pieczarka, J.C.; Salgado, H.L.C.; Santos, A.S.; Grisolia, C.K. 2016. The lipidome, genotoxicity, hematotoxicity and antioxidant properties of andiroba oil from the Brazilian Amazon. *Genetics and Molecular Biology*, 39(2): 248-256. https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2015-0098.

Minzangi, K.; Kaaya, A.N.; Kansiime, F.; Tabuti, J.R.S.; Samvura, B.; Grahl-Nielsen, O. 2011. Fatty acid composition of seed oils from selected mmwild plants of Kahuzi-Biega National Park and surroundings, Democratic Republic of Congo. *African Journal of Food Science*, 5(4): 219-226.

Nayak, B.S.; Kanhai, J.; Milne, D.M.; Swanston, W.H.; Mayers, S.; Eversley, M.; Rao, A.V.C. 2010. Investigation of the wound healing activity of Carapa guianensis L. (Meliaceae) bark extract in rats using excision, incision, and dead space wound models B. *Journal of Medicinal Food*, 13(5): 1141-1146. https://doi.org/10.1089/jmf.2009.0214.

Nonviho, G.; Paris, C.; Muniglia, L.; Sessou, P.; Agbangnan, D.C.P.; Brosse, N.; Sohounhloué, D. 2014. Chemical characterization of Lophira lanceolata and Carapa procera seed oils: analysis of fatty acids, sterols, tocopherols and tocotrienols. *Research Journal of Chemical Sciences*, 4(9): 57-62.

Oliveira, L.L. de; Henriques, A.B.; Macedo, A.F. 2015. The effect of growth regulators on two different *in vitro*- cultured explants of *Carapa guianensis*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 9(6): 169-178.

Pohl, C.H.; Kock, J.L.F.; Thibane, V.S. 2011. Antifungal free fatty acids: a review. *In:* Méndez-Vilas, A. (Ed). *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. Formatex Research Center, Badajoz. p. 61-71.

R Core Team. 2015. *R: a language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Rist, L.; Shanley, P.; Sunderland, T.; Sheil, D.; Ndoye, O.; Liswanti, N.; Tieguhong, J. 2012. The impacts of selective logging on non-timber forest products of livelihood importance. *Forest Ecology and Management*, 268: 57-69.

Sado-kamdem, S.L.; Vannini, L.; Guerzoni, M.E. 2009. Effect of α-linolenic, capric and lauric acid on the fatty acid biosynthesis in Staphylococcus aureus. *International Journal of Food Microbiology*, 129: 288-294. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.12.010.

Sarria, A.L.F.; Soares, M.S.; Matos, A.P.; Fernandes, J.B.; Vieira, P.C.; Silva, F. das G.F. da. 2011. Effect of triterpenoids and limonoids isolated from Cabralea canjerana and Carapa

guianensis (Meliaceae) against Spodoptera frugiperda (J. E. Smith). *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung Tübingen*, 66c: 245-250.

Shorkri, H. 2016. A review on the inhibitory potential of Nigella sativa against pathogenic and toxigenic fungi. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 6(1): 21-33.

Souza, D.P.; Freitas, C.D.T.; Pereira, D.A.; Nogueira, F.C.; Silva, F.D.A.; Salas, C.E.; Ramos, M.V. 2011. Laticifer proteins play a defensive role against hemibiotrophic and necrotrophic phytopathogens. *Planta*, 234: 183-193.

Zhu, Y.; Xu, J.; Mortimer, P.E. 2011. The influence of seed and oil storage on the acid levels of rubber seed oil, derived from *Hevea brasiliensis* grown in Xishuangbanna, China. *Energy*, 36(8): 5403-5408.

CAPÍTULO 5

Cultivo *in vitro* de embriões zigóticos e segmentos nodais de *Carapa guianensis* Aublet e *Carapa vasquezii* Kenfack de ocorrência na Amazônia Central. Manuscrito em preparação para *African Journal of Biotechnology*.

Cultivo *in vitro* de embriões zigóticos e segmentos nodais de *Carapa guianensis* Aublet e *Carapa vasquezii* Kenfack de ocorrência na Amazônia Central

RESUMO

A propagação das espécies arbóreas com produção em larga escala e produtos de alta qualidade por meio de técnicas a partir de células e tecidos têm sido interesse na silvicultura moderna. Assim, neste trabalho investigou-se o estabelecimento de plântulas *in vitro* a partir de embriões zigóticos e segmentos nodais de *Carapa guianensis* e *C. vasquezii*. Embriões zigóticos foram cultivados em meio MS (Murashige e Skoog) suplementado com Ácido Indol 3-Acético (AIA) (0; 0,5; 1 e 2 mg/L), 6-Benzilaminopurina (BAP) (0; 0,5; 1 e 3 mg/L) e respectivas interações. Segmentos nodais foram seccionados a partir de mudas de *C. guianensis* e *C. vasquezii* com seis meses de idade. Os tratamentos utilizados para o cultivo de segmentos nodais foram: AIA (0; 0,5 1 e 2 mg/L), BAP (0; 0,5 e 1 mg/L) e respectivas interações. Thidiazuron (TDZ) foi utilizado na concentração de 2,5 mg/L. As avaliações foram realizadas diariamente. A contaminação por fungos ocasionou perda de 37,0% de embriões zigóticos de *C. guianensis* e 57,3% de *C. vasquezii*. A utilização de AIA no primeiro experimento favoreceu o crescimento radicular, principalmente na concentração de 2 mg/L de AIA e interação de 1 mg/L (AIA) x 1 mg/L (BAP), e o crescimento da parte aérea apresentou melhores resultados na concentração de 3 mg/L (BAP) em *C. guianensis*. A utilização de segmentos nodais possibilitou a formação de calos para as duas espécies, principalmente, quando submetidos a 0,5 mg/L BAP, 1 AIA x 0,5 BAP mg/L e 1 mg/L em *C. guianensis* e sob a influência de 0,5 mg/L BAP, 1 AIA x 1 BAP mg/L e 2 AIA x 1 BAP mg/L em *C. vasquezii*. A utilização de TDZ não possibilitou alterações nos explantes utilizados. Novos trabalhos devem ser realizados para o aperfeiçoamento de protocolos de assepsia utilizando fontes de explantes de espécies florestais.

Palavras-chave: Andiroba; calos; micropropagação; propagação *in vitro*; reguladores de crescimento.

***In vitro* culture of zygotic embryos and nodal segments of *Carapa guianensis* Aubl. and *Carapa vasquezii* Kenfack of occurrence in Central Amazonia**

ABSTRACT

The propagation of tree species with large-scale production and high-quality products, using techniques from cells and tissues, has been of interest in modern forestry. Thus, in this work, the establishment of *in vitro* seedlings from zygotic embryos and nodal segments of *Carapa guianensis* and *C. vasquezii* was investigated. Zygotic embryos were cultured on MS medium (Murashige and Skoog) supplemented with Indole 3-Acetic Acid (IAA) (0; 0.5; 1 and 2 mg/L), 6-Benzylaminopurine (BAP) (0; 0.5; 1 and 3 mg/L) and respective interactions. Nodal segments were sectioned from seedlings of *C. guianensis* and *C. vasquezii* at six months of age. The treatments used for the cultivation of nodal segments were: IAA (0; 0.5 1 and 2 mg/L), BAP (0; 0.5 and 1 mg/L) and respective interactions. Thidiazuron (TDZ) was used at the concentration of 2.5 mg/L. Evaluations were performed daily. Fungal contamination resulted in loss of 37.0% of zygotic embryos of *C. guianensis* and 57.3% of *C. vasquezii*. The use of IAA favored the root growth of zygotic embryo culture at the concentration of 2 mg/L of IAA and interaction of 1 mg/L (IAA) x 1 mg/L (BAP), and the aerial part showed better results in the concentration at 3 mg/L (BAP) concentration in *C. guianensis*. The use of nodal segments allowed the formation of calluses for the two species, especially when submitted to 0.5 mg/L BAP, 1 IAA x 0.5 BAP mg/L and 1 mg/L in *C. guianensis*, and under influence of

0.5 mg/L BAP, 1 IAA x 1 BAP mg/L and 2 IAA x 1 BAP mg/L in *C. vasquezii*. The use of TDZ did not allow changes in the explants used. New work should be done to improve asepsis protocols using sources of explants of forest species.

Keywords: Andiroba; calluses; micropropagation; *in vitro* propagation; growth regulators.

1. INTRODUÇÃO

A produção natural de sementes de espécies do gênero *Carapa* apresenta-se de forma irregular e, por esta razão, existem dificuldades na oferta de seus produtos, visando, principalmente, ao fortalecimento e ao abastecimento do mercado consumidor do óleo obtido a partir de suas sementes (Oliveira *et al*., 2015). Além disso, as sementes de espécies desse grupo taxonômico são consideradas recalcitrantes (Umarani *et al*., 2015), o que dificulta o armazenamento e, além disso, apresentam grande níveis de ataque de predadores (Plowden, 2004).

A silvicultura carece de maior atenção para os processos de propagação de espécies arbóreas, uma vez que já é conhecido o nível de dificuldade de obtenção de mudas em qualidade e quantidade suficientes para suprir demandas, sejam de caráter ecológico ou econômico. Diante dessas dificuldades, a busca por métodos de aperfeiçoamento de propagação de árvores seja via sexuada ou assexuada tem se intensificado.

Nesse sentido, torna-se importante a criação de sistemas de produção que possam suprir essa demanda e contribuir para o fortalecimento de cadeias produtivas de alto rendimento de espécies de interesse florestal. Os métodos convencionais de melhoramento oferecem possibilidades limitadas para o suprimento de demandas crescentes do setor florestal que contemplem programas visando o desenvolvimento de novos híbridos, seleção e teste de genótipos com características desejáveis (Minocha e Jain, 2000).

A regeneração de plantas por meio do cultivo *in vitro*, considerando a organogênese ou embriogênese zigótica, é uma alternativa potencial de propagação de espécies e/ou indivíduos com características de interesse, visando o melhoramento genético e a preservação de germoplasma de espécies com importância florestal (Minocha e Jain, 2000). No entanto, essa técnica de produção de espécies arbóreas em ambiente controlado ainda precisa ser aperfeiçoada, uma vez que cada espécie apresenta suas peculiaridades, devido, principalmente, aos fatores que interferem na germinação, conservação e crescimento das plantas, como a contaminação e ausência de protocolos estabelecidos para espécies lenhosas (Martendal *et al*., 2013).

A propagação em condições assépticas é um método potencial para espécies com problemas na regularidade da produção de sementes (Oliveira *et al*., 2015), pois possibilita a oferta de plantas de boa qualidade em qualquer época do ano (Muthusamy *et al*., 2014), e garante produtividade em larga escala, acelerando o processo de propagação convencional e a produção de plantas geneticamente idênticas (Zhou e Wu, 2006). Todas essas questões que cercam a propagação de espécies vegetais têm sido diagnosticadas, com avanços tecnológicos para muitas espécies de interesse agrícola e poucos são os estudos com espécies arbóreas de importância econômica que ocorrem na Amazônia.

Este trabalho foi proposto com objetivo de investigar o potencial de estabelecimento de plântulas *in vitro* a partir de embriões zigóticos e segmentos nodais de *Carapa guianensis* e *Carapa vasquezii* sob a influência de diferentes dosagens de reguladores de crescimento, visando à obtenção de plântulas completas com a finalidade de estabelecer protocolo de cultivo dessas espécies vegetais em ambiente controlado.

2. MATERIAL E MÉTODOS

As sementes foram coletadas de 10 matrizes de cada espécie vegetal (*C. guianensis* e *C. vasquezii*), totalizando 20 matrizes localizadas na Reserva Adolpho Ducke, na cidade de Manaus – Amazonas – Figura 1. O clima da região é classificado como do tipo Af, com temperatura média anual de 26,7°C, de baixa variação, e pluviosidade anual de 2.420 mm, sendo agosto o mês de menor índice pluviométrico (Alvares *et al*., 2014).

Figura 1: Local de coleta de sementes para o ensaio de cultivo *in vitro* de embriões zigóticos e segmentos nodais de duas espécies do gênero *Carapa*.

As sementes foram coletadas diretamente das plantas no período da frutificação (abril de 2016). O material fértil foi coletado para identificação taxonômica e depositado no herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, sob o número de tombamento 261947 (*C. guianensis*) e 261953 (*C. vasquezii*).

Dois protocolos de cultivo *in vitro* foram testados neste trabalho, o primeiro foi para o cultivo de embriões zigóticos, e o segundo para o cultivo de segmentos nodais em duas espécies do gênero *Carapa* (Figura 2). As sementes foram coletadas e submetidas, imediatamente, ao processo de desinfestação com a utilização de hipoclorito 2,5% durante 10 minutos e, posteriormente, lavadas em água corrente (Waldow *et al*., 2013). Sementes (100 de cada espécie) foram semeadas no intuito de produzir mudas para obter os segmentos nodais utilizados como fonte de explantes do segundo experimento (Figura 2); e outra quantidade (200 sementes de cada espécie) foram retiradas o tegumento e acondicionadas no escuro. Em seguida, as sementes livres do tegumento foram submetidas novamente ao processo de desinfestação com a utilização de hipoclorito 0,5% durante 10 minutos no escuro, e submetidas à tríplice lavagem com água destilada (Sousa *et al*., 2015).

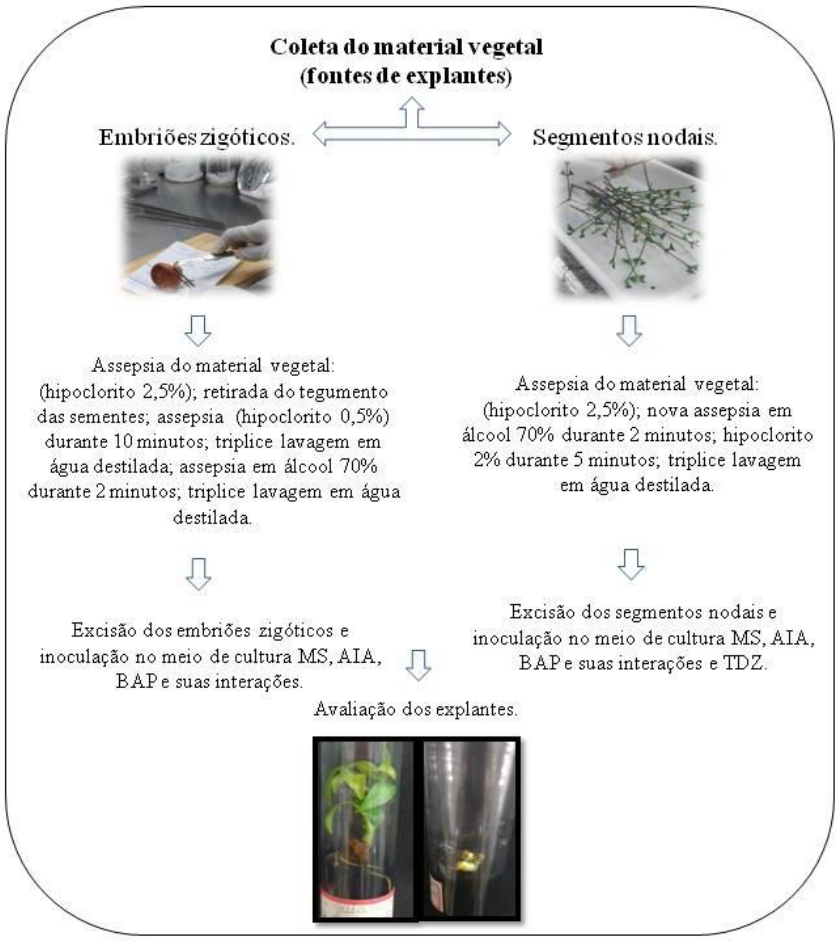

Figura 2: Protocolo para o cultivo *in vitro* de embriões zigóticos e segmentos nodais de duas espécies do gênero *Carapa*.

Após a desinfestação das sementes, os eixos embrionários foram excisados e inoculados em meios de cultivo MS descritos por Musashige e Skoog (1962) suplementados com carvão ativado e *Phytagel* como agente geleificante. Para estimular o crescimento das estruturas radiculares e aéreas utilizaram-se os hormônios Ácido Indol 3-Acético (AIA) nas concentrações de 0; 0,5; 1 e 2 mg/L e 6-Benzilaminopurina (BAP) nas concentrações de 0; 0,5; 1 e 3 mg/L, totalizando a combinação de 16 tratamentos com 12 repetições.

Os embriões permaneceram durante 15 dias no escuro, e, após a emissão do epicótilo, foram acondicionados sob a influência de fotoperíodo de 12 horas (Maciel *et al*., 2016). A germinação, o crescimento do epicótilo, o crescimento de raízes primárias e secundárias e eofilos foram avaliados, diariamente, durante 30 dias.

O cultivo de segmentos nodais sob a influência de diferentes reguladores de crescimento foi realizado em plantas jovens de *C. guianensis* e *C. vasquezii* após quatro (4) meses de idade. A assepsia do material foi realizada inicialmente em água corrente e

hipoclorito a 2,5% durante 10 minutos. Os segmentos nodais foram submetidos à assepsia em álcool 70%, durante 2 minutos, e submetidos à tríplice lavagem em água destilada na câmara de fluxo laminar. Em seguida, nova assepsia em hiploclorito a 2%, durante 5 minutos, e tríplice lavagem em água destilada. Após desinfestação, os segmentos nodais foram excisados e inoculados em meio MS suplementados com 0; 0,5; 1 e 2 mg/L de AIA; 0; 0,5 e 1 mg/L de BAP e interações desses reguladores de crescimento. O Thidiazuron (TDZ) foi um tratamento adicional utilizado na concentração de 2,5 mg/L (Oliveira *et al*., 2015).

O delineamento experimental conduzido foi o inteiramente casualizado (DIC) considerando duas (2) espécies vegetais (*C. guianensis* e *C. vasquezii*), 16 tratamentos e 12 repetições para cada tratamento. Os resultados de germinação foram submetidos à Análise de Variância de Medidas Repetidas ao longo do tempo, após atender a premissa de esfericidade ($p<0,05$) (teste de Mauclhy). Os resultados de crescimento das plântulas sob o efeito dos diferentes reguladores de crescimento foram submetidos às análises descritivas (média e erro padrão da média) e analisados em gráficos de *box plots* para aferir a dispersão dos dados ao longo da mediana. E os dados obtidos a partir dos segmentos nodais foram contabilizados, e, também, descritas as principais características das estruturas obtidas. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do *software* estatístico e linguagem de programação R (R Core Team, 2015).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de *C. guianensis* e *C. vasquezii*

Após 30 dias da instalação do experimento, germinaram 71 embriões zigóticos de *C. guianensis* (37,0%) e 25 de *C. vasquezii* (13,0%) do total de embriões inoculados no experimento. Do total de embriões germinados (71), 11 de *C. guianensis* (15,0%) apresentaram estruturas de plantas normais (formação de raízes e parte aérea), e quanto a *C. vasquezii*, apenas 2 indivíduos (8,0%) apresentaram estruturas completas.

Com relação à contaminação por fungos verificou-se que ocorreu contaminação em 37,0% de embriões pertencentes a *C. guianensis* e 57,3% em *C. vasquezii*. Na fase de estabelecimento da cultura, a contaminação pode comprometer o trabalho de micropropagação, uma vez que possibilita perdas de indivíduos (Pereira *et al*., 2011). Em caso de contaminação exógena, a possibilidade de controle dos principais agentes contaminantes

(fungos e bactérias) é considerável; e quando a contaminação é endógena, ou seja, proporcionada por fungos exo e endofíticos, poderão ocorrer grandes limitações na produção por meio da propagação *in vitro* (Pereira *et al*., 2011; Andrade *et al*., 2014).

Após aplicação da Análise de Variância de Medidas Repetidas, considerando o número médio de embriões germinados para cada espécie, observou-se que os dados atenderam a premissa de esfericidade ($p>0,05$), apresentando diferença significativa na média de embriões germinados ao longo do período de 30 dias ($p<0,001$). *C. guianensis* foi a espécie com maior média de embriões germinados (45,87±4,85), quando comparada com *C. vasquezii* (16,25±2,33) (Figura 3).

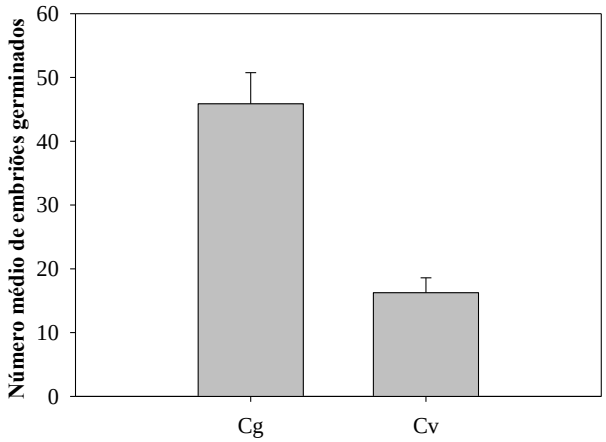

Figura 3: Número médio de embriões germinados de *C. guianensis* (Cg) e *C. vasquezii* (Cv) em meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962).

O cultivo de embriões zigóticos *in vitro* mostrou uma técnica eficiente para obtenção de plântulas completas e conservação de material genético de *C. guianensis* e *C. vasquezii*. Esse método possibilita uma produção de alta qualidade combinada com impacto reduzido sobre o meio ambiente, uma vez que pode auxiliar na conservação das espécies, fortalecendo sistemas de produção e, assim, poderá minimizar a pressão sobre florestas naturais, e inclui o desenvolvimento de protocolos eficientes para a produção vegetal e melhoramento genético (Cappelletti *et al*., 2016). Adicionalmente, permite a viabilidade de propágulos e do material genético durante um longo período de tempo.

O processo de desinfestação, incluindo a combinação de concentrações alternativas do agente asséptico em tempos distintos de ação, assim como a concentração ideal dos reguladores de crescimento objetivando sucesso do cultivo *in vitro* são essenciais para o

estabelecimento de protocolos (Su *et al*., 2011). As células vegetais, órgãos e tecidos exibem uma notável capacidade para regenerar novos órgãos quando submetidos a diferentes concentrações de hormônios estimuladores do crescimento (Pulianmackal *et al*., 2014).

A germinação de embriões de *C. guianensis* e *C. vasquezii* iniciou logo no primeiro dia após a instalação do experimento. *C. guianensis* apresentou os melhores resultados para todas as concentrações utilizadas dos reguladores de crescimento para as variáveis germinação, crescimento de raiz primária e secundária, e emissão das estruturas da parte aérea (epicótilo e eofilo). Por outro lado, foi a espécie com menor percentual de perdas por contaminação fúngica – 37,0% (71 amostras contaminadas) e bacteriana 2,1% (4 amostras contaminadas). Em *C. vasquezii* foi observado menor sucesso na produção de plantas completas, apresentando em contrapartida, os maiores valores de perdas por contaminação fúngica – 57,3% (110 amostras contaminadas) e ausência de contaminação bacteriana.

Após 30 dias de avaliações, do total de 71 embriões germinados de *C. guianensis*, 66,2% emitiram raiz primária (47 amostras), 14,1% emitiram raiz secundária (10 amostras) e 34,4% emitiram pecíolo cotiledonar (28 amostras). No entanto, dos 25 embriões zigóticos que germinaram de *C. vasquezii*, 56,0% emitiram raiz primária (14 amostras), 8,0% emitiram raiz secundária (2 amostras) e 36,0% emitiram pecíolo cotiledonar (9 amostras). Com relação à emissão da parte aérea, apenas 7,0% das amostras germinadas de *C. guianensis* emitiram o epicótilo (5 amostras) e 1,4% emitiram eofilo (1 amostra) de um total de 71 embriões germinados. Em *C. vasquezii*, somente 4% dos embriões germinados, de um total de 25 amostras, emitiram parte aérea (epicótilo e eofilo) (1 amostra).

A última avaliação foi realizada após 210 dias de instalação do experimento. Do total de embriões germinados para *Carapa guianensis* (71), 74,6% apresentaram crescimento de raiz primária e/ou estruturas da parte aérea (53 amostras), destes, 79,2% apresentaram somente crescimento de raízes primárias (42 amostras) e 20,7% foram classificados como plantas normais (parte aérea e sistema radicular completo) (11 amostras). Em *C. vasquezii*, dos 25 embriões germinados inicialmente, 72,0% apresentaram crescimento de raiz primária e/ou parte aérea (18 amostras), 88,9% apresentaram somente crescimento de raiz primária (16 amostras) e apenas 11,1% foram considerados plantas normais (parte aérea e sistema radicular completo) (2 amostras).

Os melhores valores para o crescimento da raiz primária em *C. guianensis* foram proporcionados na concentração de 2 mg/L de AIA (variação de 0 a 4,5 cm), seguido do meio MS (variação de 0 a 4 cm) e na concentração de 1 mg/L de BAP (variação de 0,3 a 3,8 cm) (Figura 2). *C. vasquezii* apresentou os melhores resultados quando na presença de 0,5 mg/L

de AIA (variação de 0,7 a 2,6 cm), seguido do meio MS na ausência de reguladores de crescimento (variação de 0,9 a 2,5 cm) e sob a influência de 1 mg/L de AIA (variação de 0 a 1,9 cm) (Figura 4). A resposta de uma espécie vegetal a um determinado regulador de crescimento externo é explicada em parte por algumas características, tais como: o número e afinidade de receptores proteicos e também a concentração e propriedades de substâncias endógenas (hormônios, proteínas, açúcares solúveis, amido) no explante utilizado (Ulisses *et al*., 2011).

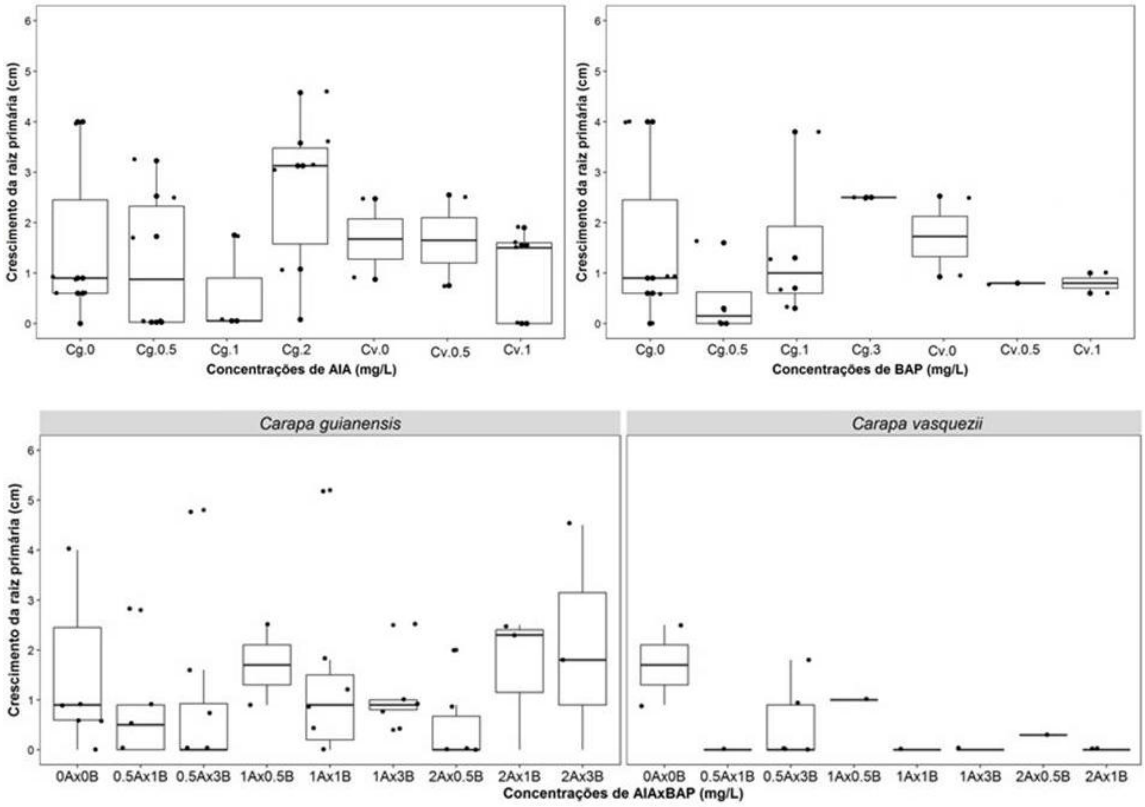

Figura 4: Crescimento da raiz primária sob o efeito de diferentes dosagens de reguladores de crescimento em *C. guianensis* (Cg) e *C. vasquezii* (Cv).

*A: AIA - Ácido Indol 3-Acético; B: BAP - 6-Benzilaminopurina.

Na interação entre AIA e BAP, os maiores valores absolutos para o desenvolvimento da raiz primária foi proporcionado pelos indivíduos submetidos a 1 mg/L de AIA suplementado com 1 mg/L de BAP, apresentando valores com variação de 2 a 5,1 cm, seguido da interação entre 0,5 mg/L de AIA suplementado com 3 mg/L de BAP (variação de 3 a 3,5 cm) e 2 mg/L de AIA com 3 mg/L de BAP (variação de 1 a 4,5 cm) (Figura 4). *C. vasquezii* apresentou os maiores valores obtidos para crescimento da raiz primária,

proporcionados quando submetidos ao meio MS sem adição de reguladores de crescimento (2 cm de comprimento), seguido da interação de 0,5 mg/L de AIA suplementado com 3 mg/L de BAP, apresentando variação entre 0,5 a 0,9 cm de comprimento da raiz primária (Figura 4). Na Figura 5, são apresentadas amostras de embriões zigóticos germinadas que apresentaram raiz primária sob o efeito de diferentes reguladores de crescimento.

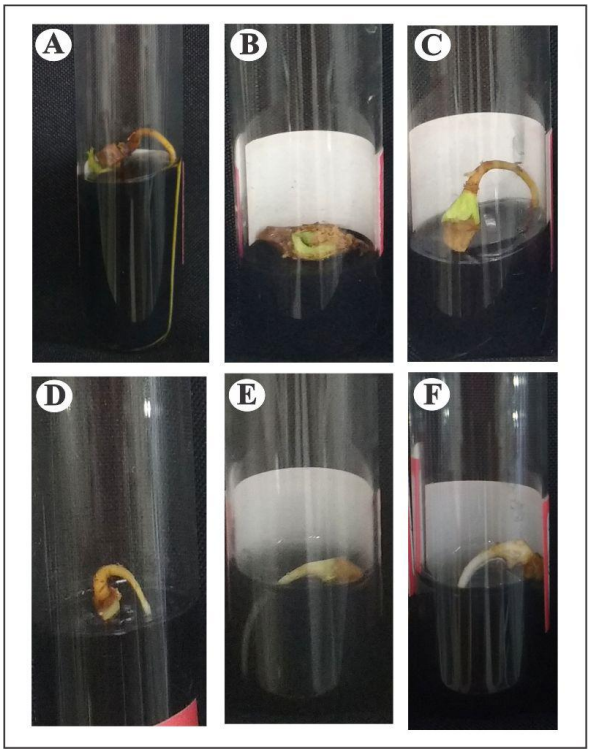

Figura 5: Raiz primária em cultivos *in vitro* de embriões zigóticos submetidos a diferentes concentrações de reguladores de crescimento.

* A: *Carapa guianensis* – 0,5 mg/L AIA. B: *C. guianensis* – 2 AIA x 1 mg/L BAP. C: *C. guianensis* – 2 mg/L AIA. D: *C. vasquezii* – 1 mg/L BAP. E: *C. vasquezii* – 0,5 mg/L AIA. F: *C. vasquezii* – 1 AIA x 3 mg/L BAP.

Com relação ao crescimento da parte aérea, os melhores valores para *C. guianensis* foram proporcionados na presença de 3 mg/L de BAP com variação dos valores de 3,7 a 4,9 cm, seguido do tratamento com a concentração de 1 mg/L de BAP (variação de 2 a 3,5 cm) (Figura 6). Já os dois indivíduos considerados de estruturas completas (sistema radicular e parte aérea) de *C. vasquezii* apresentaram 2,5 cm de crescimento da parte aérea em meio MS e na interação de 1 mg/L de AIA suplementado com 3 mg/L de BAP, respectivamente (Figura 6).

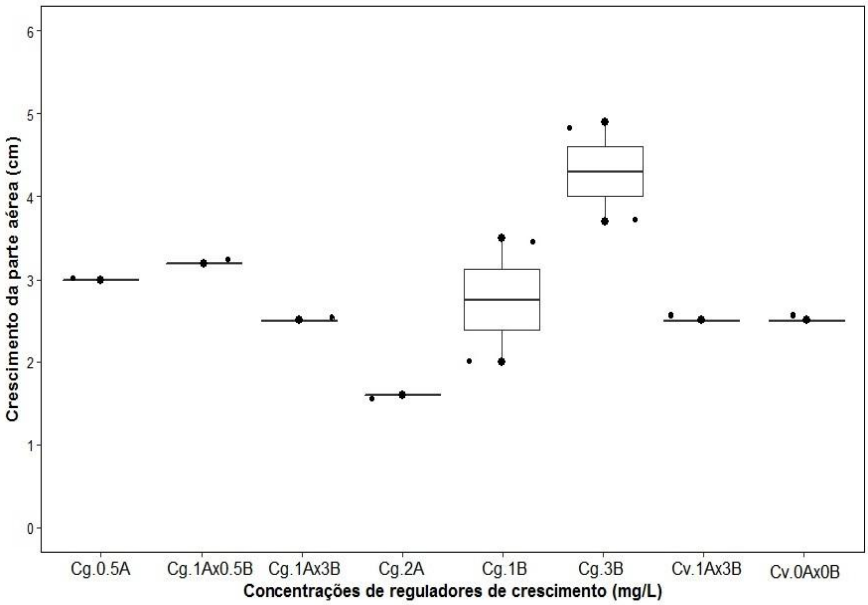

Figura 6: Crescimento da parte aérea de *Carapa guianensis* (Cg) e *C. vasquezii* (Cv) sob o efeito de diferentes dosagens de hormônios indutores do crescimento.

*Cg: *C. guianensis*; Cv: *C. vasquezii*; A: AIA - Ácido Indol 3-Acético; B: BAP - 6-Benzilaminopurina.

Além disso, verificou-se que, independentemente do tratamento, houve uma relação negativa entre o crescimento de raiz primária e a presença de epicótilo (parte aérea). Nesse sentido, foi identificado em *C. guianensis* e *C. vasquezii* quanto maior o tamanho médio da raiz primária menor a probabilidade de presença de parte aérea (Figura 7). Essa relação sugere que a estratégia no investimento de raízes primárias ocorreu, principalmente, na ausência da emissão de parte aérea, de modo que, a cada centímetro no crescimento de raiz primária foram reduzidas as chances de emissão da parte aérea em 98% em *C. vasquezii* (p = 0,03) e 44% em *C. guianensis* (p = 0,01).

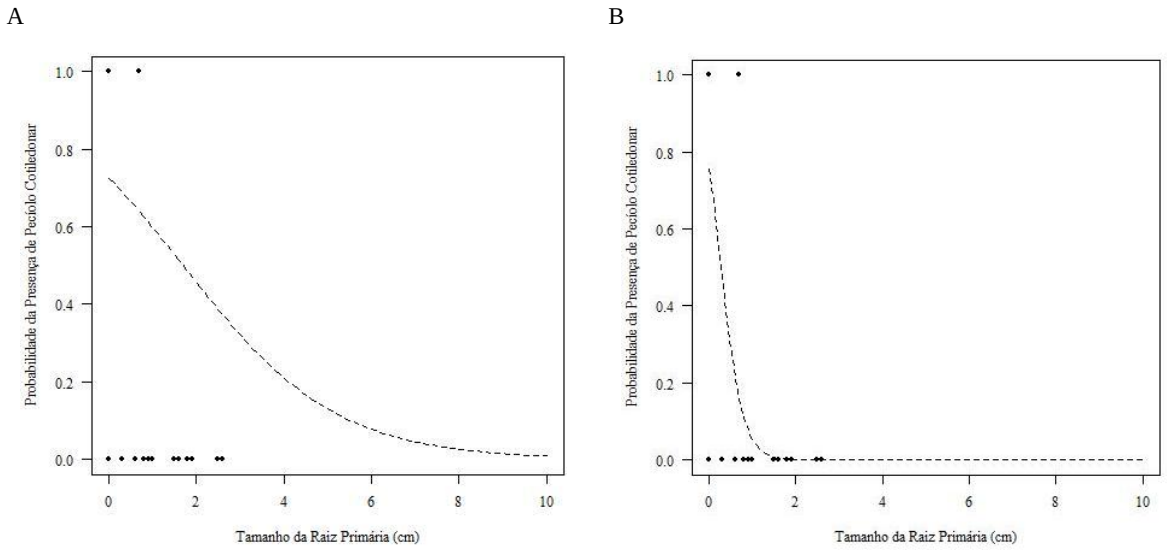

Figura 7: Ajuste da probabilidade de surgimento da parte aérea (epicótilo) em função do crescimento da raiz primária. A: *C. guianensis*; B: *C. vasquezii*.

O regulador de crescimento AIA foi o principal responsável pelo crescimento da raiz primária, considerando tanto a dosagem individual do regulador de crescimento (2mg/L) ou na combinação com BAP (1 AIA x 1 mg/L BAP), para as duas espécies do gênero *Carapa*, e por ser uma auxina age de forma a favorecer o crescimento de raízes (Xu *et al*., 2006). Entretanto, o meio de cultura MS na ausência de reguladores de crescimento também proporcionou resultados promissores para o crescimento de raiz primária (Figura 4 e 5). A utilização de reguladores de crescimento vegetal adicionados ao meio de cultura tem a função de suprir prováveis deficiências de fitormônios nos explantes oriundos da planta matriz com o objetivo de induzir os processos de desdiferenciação e rediferenciação celular (Almeida *et al*., 2015). Logo após a indução do enraizamento, as auxinas são transportadas em células radiculares, atuando, principalmente, no afrouxamento da parede celular, estimulando a ativação da expressão gênica, o que irá sinalizar o investimento em crescimento e arquitetura de raízes (Woodward e Bartel, 2005).

Com relação ao número de raízes secundárias tanto para *C. guianensis* quanto para *C. vasquezii*, observaram-se melhores resultados absolutos quando as espécies foram submetidas ao tratamento de meio MS na ausência de reguladores de crescimento, uma vez que foram obtidos valores extremos com variação de 9 a 20 raízes secundárias para esse tratamento (Figura 8). Outro tratamento que apresentou resultados positivos para o investimento em produção de raízes secundárias em *C. guianensis* foi a concentração de 2 mg/L de AIA, no

qual identificou-se uma variação nas unidades amostrais de 6 a 16 raízes secundárias (Figura 8).

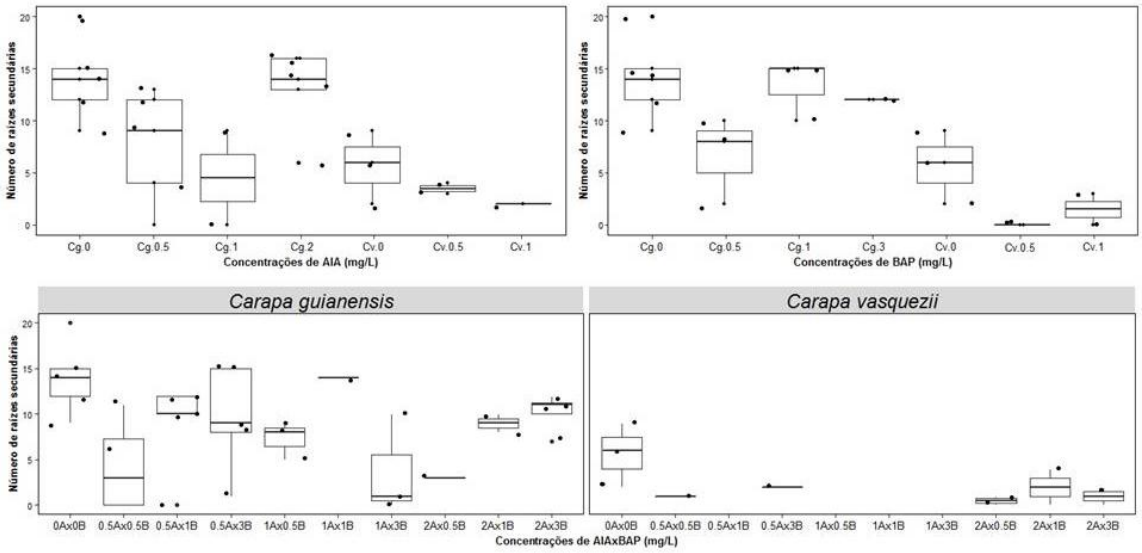

Figura 8: Número de raízes secundárias sob o efeito de diferentes dosagens de reguladores de crescimento em *C. guianensis* (Cg) e *C. vasquezii* (Cv).

*Cg: *C. guianensis*; Cv: *C. vasquezii*; A: AIA - Ácido Indol 3-Acético; B: BAP - 6-Benzilaminopurina.

No total, foram obtidas 10 plântulas com estruturas completas (Tabela 1), incluindo compartimento aéreo e radicular. Ressalta-se que plântulas *C. guianensis* sob a presença de 3 mg/L de BAP apresentaram os maiores valores para as variáveis analisadas neste trabalho, destacando-se o número de segmentos nodais como uma estrutura que possibilita a replicação clonal desses indivíduos. O sucesso da produção *in vitro* depende do ajuste de um protocolo adequado para cada espécie ou variedade a ser micropropagada (Ulisses *et al*., 2011).

Tabela 1: Efeito de diferentes concentrações de reguladores de crescimento sobre o crescimento de plântulas a partir do cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de *C. guianensis* e *C. vasquezii*.

Espécie	Reg. de Crescimento (mg/L)	Raiz 1ª (cm)	Quant./Raiz 2ª	Parte Aérea (cm)	N. de segmentos nodais
C. guianensis	1 BAP	1.9	10	2	2
	1 BAP	3	15	3.5	12
	3 BAP	3.5	12	4.9	17
	3 BAP	3	12	3.7	17
	0.5 AIA	3.5	13	3	8
	1 AIA x 0.5 BAP	3.5	6	3.2	7
	1 AIAx3BAP	3.4	15	2.5	13
	2 AIA	2	16	1.6	4
C. vasquezii	0 AIA x 0 BAP	2	9	2.5	7
	1 AIA x 3 BAP	2	2	2.5	9

A obtenção de plântulas completas de espécies arbóreas por meio do cultivo de embriões zigóticos (Figura 9) é um processo complexo que requer esforço para elaboração de protocolos no intuito de estimular a produção em massa de espécies de interesse econômico, dando um passo importante para a reprodução clonal de indivíduos de alto desempenho. Dessa forma, ressalta-se a necessidade de trabalhos complementares que possam aprimorar os protocolos de produção *in vitro* de espécies vegetais arbóreas e a implantação de cultivos a partir de embriões zigóticos em espécies de *Carapa*.

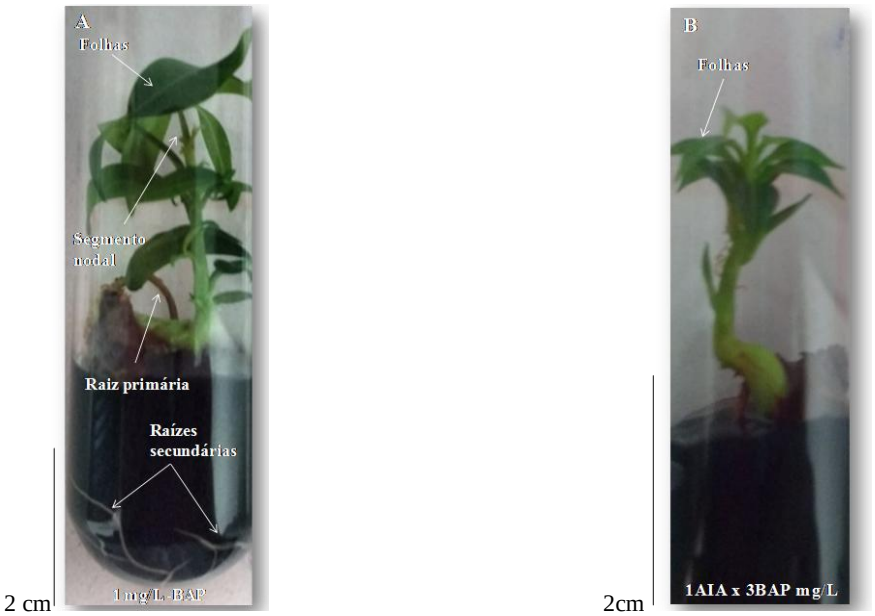

Figura 9: Plantas completas cultivadas *in vitro* utilizando meio de cultivo MS suplementado com reguladores de crescimento. A: *C. guianensis*. B: *C. vasquezii*.

Dessa forma, os níveis de competência para regeneração, assim como as respostas de crescimento vegetal em função dos reguladores de crescimento utilizados é específico, ou seja, apresenta variação entre espécies (Pulianmackal *et al*., 2014), e essas duas espécies vegetais (*C. guianensis* e *C. vasquezii*) apresentam relativa habilidade para regeneração, a partir do cultivo de embriões zigóticos *in vitro* sem a necessidade de suplementação de hormônios externos, assim como observado em raízes de *Arabidopsis* (Xu *et al*., 2006). Vale ressaltar que as espécies do gênero *Carapa*, objetos desta pesquisa, apresentaram percentuais de perdas por contaminação diferenciadas, sugerindo a investigação alternativa, buscando protocolos e priorizando ajustes que minimizem essas perdas. Diferentes protocolos de propagação em massa e alta eficiência de regeneração devem ser estabelecidos (Deore e Johnson, 2008; Kumsa, 2017).

3.2. Cultivo *in vitro* de segmentos nodais de plantas jovens de *C. guianensis* e *C. vasquezii*

Os resultados do cultivo de segmentos nodais foram promissores para ambas as espécies, porém com algumas perdas por contaminação. Após três dias de instalação do experimento, foram observadas contaminações ocasionadas pela colonização de fungos em 11 amostras de *C. guianensis* e 14 amostras de *C. vasquezii*, e oxidação em duas amostras de *C. guianensis* e uma em *C. vasquezii*.

No oitavo dia, após inoculação dos segmentos em meio de cultura MS suplementado com reguladores de crescimento (AIA, BAP suas interações e TDZ), observaram-se a intensificação de pontuações translúcidas com início de formação de calos em ambas espécies (*C. guianensis* e *C. vasquezii*). Além disso, observou-se em *C. vasquezii*, a partir do oitavo dia após a inoculação dos segmentos nodais, principalmente nos tratamentos 0,5 mg/L AIA e 2 AIA x 1 mg/L BAP (Figura 10 D e F).

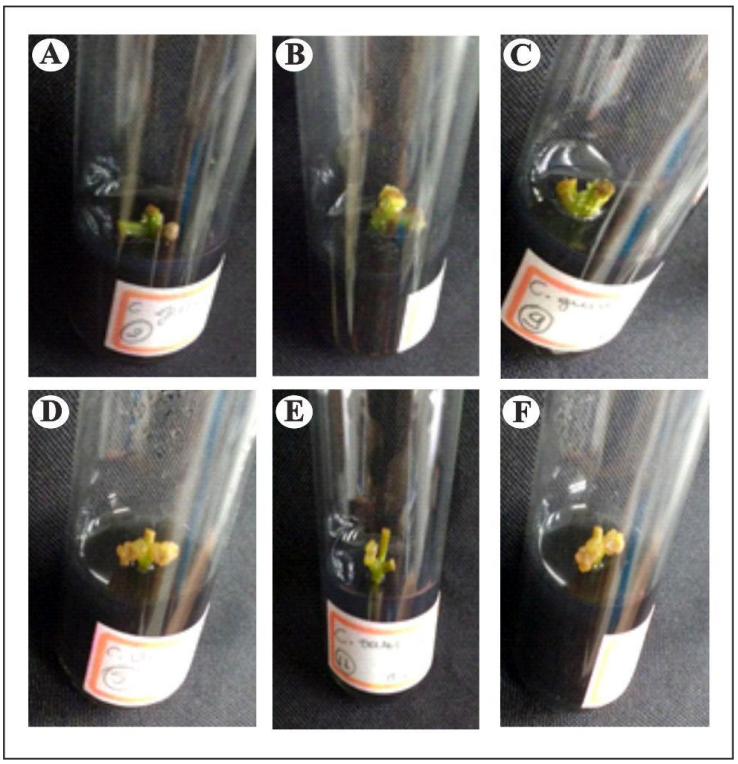

Figura 10: Cultivo *in vitro* de segmentos nodais de duas espécies do gênero *Carapa* utilizando diferentes dosagens de reguladores de crescimento.

* *C. guianensis* – 0,5 mg/L BAP. B: *C. guianensis* – 1 AIA x 0,5 mg/L BAP. C: *C. guianensis* – 1 mg/L BAP. D: *C. vasquezii* – 0,5 mg/L BAP. E: *C. vasquezii* – 1 AIA x 1 mg/L BAP. F: *C. vasquezii* – 2 AIA x 1 mg/L BAP.

Até o oitavo dia de avaliação do experimento de cultivo *in vitro* de segmentos nodais de duas espécies do gênero *Carapa*, foi possível identificar que *C. vasquezii* apresentou as melhores respostas com relação à indução de calogênese. Citocininas e auxinas foram capazes de induzir a produção de calos, destacando-se o tratamento de 0,5 mg/L de AIA, uma vez que a ação das auxinas podem inibir a produção de brotos, favorecendo ao processo de calogênese. No entanto, quando cultivado *in vitro*, o tecido irá sofrer modificações dependentes do balanço entre citocinas e auxinas (Jardim *et al*., 2010).

4. CONCLUSÃO

A espécie *Carapa guianensis* quando comparada a *C. vasquezii* apresentou melhores resultados diante do protocolo proposto para o cultivo de plântulas *in vitro* a partir de embriões zigóticos. A utilização de reguladores de crescimento AIA e BAP favoreceu o compartimento radicular e de parte aérea, respectivamente. Porém resultados satisfatórios, evidenciados a partir do crescimento de raízes e da parte aérea, também foram verificados

para o cultivo em meio MS na ausência de reguladores de crescimento, sugerindo a elevada totipotência dos tecidos. O cultivo *in vitro* de segmentos nodais de ambas espécies do gênero *Carapa* responderam com a formação de calos a partir das estruturas utilizadas, principalmente, quando submetidos ao regulador de crescimento BAP e na interação AIA e BAP. Os resultados do cultivo *in vitro* foram promissores para a propagação de espécies do gênero *Carapa* utilizando diferentes fontes de explantes (embriões zigóticos e segmentos nodais). Estudos complementares devem ser realizados no sentido de aperfeiçoar os protocolos sugeridos, visando a melhorias na propagação de espécies arbóreas e a otimizar o sistema de produção silvicultural na Amazônia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida, C.S.; Silva, A.V.C. da; Araújo, A.G. de; Lêdo, A. da S. 2015. Respostas morfogenéticas de jenipapeiro em diferentes condições de cultura *In Vitro*. *Revista Caatinga*, 28(1): 58-64.

Alvares, C.A.; Stape, J.L.; Sentelhas, P.C.; Gonçalves, J.L. de M.S. 2014. Köppen's climate classification map for Brazil Clayton. *Meteorologische Zeitschrift*, 22(6): 711-728.

Andrade, R.A. de; Bagatim, A.G.; Jasper, S.P. 2014. Soursop contamination and sprouting in function of the fungicide in the culture médium. *Comunicata Scientiae*, 5(3): 326-330.

Cappelletti, R.; Sabbadini, S.; Mezzetti, B. 2016. The use of TDZ for the efficient in vitro regeneration and organogenesis of strawberry and blueberry cultivars. *Scientia Horticulturae*, 207: 117-124.

Deore, A.C.; Johnson, S. 2008. High-frequency plant regeneration from leaf-disc cultures of Jatropha curcas L.: an important biodiesel plant. *Plant Biotechnology Reports*, 2: 7-11.

Jardim, L.S.; Sampaio, P. de T.B.; Costa, S.D.S.; Blair, C.D.Q.; Leonardo, H.; Brandão, M. 2010. Efeito de diferentes reguladores de crescimento na regeneração in vitro de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). *Acta Amazônica*, 40(2): 275-280.

Kumsa, F. 2017. Effect of growth regulators on indirect organogenesis of two grapevines (*Vitis vinifera* L.) cultivars. *African Journal of Biotechnology*, 16(16): 852-859.

Maciel, A.L. de R.; Rodrigues, F.A.; Pasqual, M.; Carvalho, C.H.S. de. 2016. Large-scale, high-efficiency production of coffee somatic embryos. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 16: 102-107.

Martendal, C. de O.; Bernardino, M.M.; Pereira, F.D.; Hara, A.M. 2013. In vitro cultivation of zygotic embryos from Murici (*Byrsonima cydoniifolia* A. Juss.): establishment, disinfection, and germination. *Acta Scientiarum*, 35(2): 221-229.

Minocha, R.; Mjain, S. 2000. Tissue culture of woody plants and its relevance to molecular biology. *Molecular Biology of Wood Plants*, 1: 315-339.

Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.

Muthusamy, A.; Vidya, K.S.; Pratibha, P.K.; Rao, M.R.; Vidhu, S.B.; Guruprasad, K.P.; Raghavendra, U.; Gopinath, P.M.; Satyamoorthy, K. 2014. Establishment of an in vitro plantlet regeneration protocol for unique varieties of brinjal (*Solanum melongena* L.) var. *Mattu gulla* and *Perampalli gulla*. *Indian Journal of Experimental Biology*, 52: 80-88.

Oliveira, L.L. de; Henriques, A.B.; Macedo, A.F. 2015. The effect of growth regulators on two different *in vitro*- cultured explants of *Carapa guianensis*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 9(6): 169-178.

Pereira, G.A.; Correa, L. de S.; Boliani, A.C. 2011. Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de explantes de bananeira “grande naine” em diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 222-226. Volume especial.

Plowden, C. 2004. The ecology and harvest of andiroba seeds for oil production in the Brazilian Amazon. *Conservation & Society*, 2(2): 251-270.

Pulianmackal, A.J.; Kareem, A.V.; Durgaprasad, K.; Trivedi, Z.B.; Prasad, K. 2014. Competence and regulatory interactions during regeneration in plants. *Frontiers in Plant Science*, 5: 142.

R Core Team. 2015. *R: a language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Sousa, G.G.; Rosa, Y.B.C.J.; Macedo, M.C.; Soares, J.S. 2015. Aclimatização de *Brassavola tuberculata* com a utilização de ANA em diferentes substratos. *Horticultura Brasileira*, 33(2): 208-215.

Su, Y.H.; Liu, Y.B.; Zhang, X.S. 2011. Auxin-cytokinin interaction regulates meristem development. *Molecular Plant*, 4: 616-625.

Ulisses, C.; Albuquerque, C. de; Willadino, L.; Camara, T.R. 2011. Indução de embriões somáticos a partir de embriões zigóticos de *Heliconia bihai* (L.) L. cv. Lobster Claw Two. *Revista Ceres*, 58(5): 537-541.

Umarani, R.; Aadhavan, E.K.; Faisal, M.M. 2015. Understanding poor storage potential of recalcitrant seeds. *Current Science*, 108(11): 2023-2034.

Waldow, D.A.G.; Reiniger, L.R.S.; Golle, D.P.; Curti, A.R. 2013. In vitro culture of zygotic embryos of *Butia eriospatha*. *Semina: Ciências Agrárias*, 34(5): 2179-2188.

Woodward, A.W.; Bartel, B. 2005. Auxin: regulation, action and interaction. *Annals of Botany*, 95: 707-735.

Xu, J.; Hofhuis, H.; Heidstra, R.; Sauer, M.; Friml, J.; Scheres, B. 2006. A molecular framework for plant regeneration. *Science*, 311(5759): 385-388.

Zhou, L.G.; Wu, J.Y. 2006. Development and application of medicinal plant tissue cultures for production of drugs and herbal medicinals in China. *Natural Product Reports*, 23: 789-810.

CONCLUSÃO GERAL

Toda base de dados obtida para o conjunto de informações que foram apresentados e discutidos nesta tese sugerem que espécies do gênero *Carapa* apresentam divergências moleculares e morfofuncionais.

As Caparas apresentam divergência, considerando o perfil lipidômico e os marcadores moleculares cloroplastídicos (psbA-trnH e rbcL). Os resultados sugerem que *C. guianensis* e *C. vasquezii* apresentam divergência quanto ao metabolismo dos lipídeos, como evidenciado no perfil lipidômico e molecular, pela árvore filogenética confirmada pelo teste de *barcoding gap*. O conjunto dessas informações irá contribuir para subsidiar aspectos de classificação botânica e também estratégias de uso e conservação desse recurso florestal.

Com ênfase para as variáveis morfométricas, tamanho das sementes e comprimento do hilo e, nas características bioquímicas, perfil lipidômico, diferenças marcantes foram apresentadas para as espécies *C. guianensis* e *C. vasquezii*. Esses resultados morfológico e bioquímico se mostraram robustos o suficente para confirmar as diferenças interespecíficas, podendo contribuir para fundamentar a caracterização das espécies do gênero *Carapa*.

Os óleos extraídos de sementes destas espécies apresentaram atividade antifúngica sobre agentes fitopatogênicos, possibilitando 100% de inibição do crescimento micelial.

A espécie *Carapa guianensis*, quando comparada a *C. vasquezii*, apresentou melhores resultados para propagação *in vitro*, diante dos protocolos estabelecidos a partir de embriões zigóticos. A utilização de reguladores AIA e BAP favoreceu o crescimento radicular e de parte aérea, respectivamente. Porém, crescimento de raízes e da parte aérea também foram verificados para o cultivo em meio MS na ausência de reguladores de crescimento, sugerindo a elevada totipotência dos tecidos. O cultivo *in vitro* de segmentos nodais de ambas espécies do gênero *Carapa* responderam com a formação de calos a partir das estruturas utilizadas, principalmente, quando submetidos ao regulador de crescimento BAP e na interação AIA e BAP. Os resultados do cultivo *in vitro* foram promissores para a propagação de espécies do gênero *Carapa* utilizando diferentes fontes de explantes (embriões zigóticos e segmentos nodais) e podem auxiliar a propagação das Carapas e otimizar o sistema de produção silvicultural dessas espécies na Amazônia.