



**SIMBIOSE MICORRÍZICA ARBUSCULAR EM PAU-FERRO (*Libidibia ferrea*
(Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz var. *ferrea*) VISANDO MAXIMIZAÇÃO DA
PRODUÇÃO DE FITOQUÍMICOS FOLIARES COM POTENCIAL MEDICINAL**

FRANCINEYDE ALVES DA SILVA

**RECIFE
FEVEREIRO/2014**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS**

**SIMBIOSE MICORRÍZICA ARBUSCULAR EM PAU-FERRO (*Libidibia ferrea*
(Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz var. *ferrea*) VISANDO MAXIMIZAÇÃO DA
PRODUÇÃO DE FITOQUÍMICOS FOLIARES COM POTENCIAL MEDICINAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biologia de Fungos.

Área de Concentração: Micologia aplicada.

FRANCINEYDE ALVES DA SILVA

Orientadora: Leonor Costa Maia

Co-orientador: Fábio Sérgio Barbosa da Silva.

**RECIFE
FEVEREIRO/2014**

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Silva, Francineyde Alves da

Simbiose micorrízica arbuscular em pau-ferro (*Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz var. *ferrea*) visando maximização da produção de fitoquímicos foliares com potencial medicinal / Francineyde Alves da Silva. – Recife: O Autor, 2014.

73 f.

Orientadores: Leonor Costa Maia, Fábio Sérgio Barbosa da Silva

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Biologia de Fungos, 2014.

Inclui referências

1. Plantas medicinais 2. Fungos 3. Simbiose 4. Micorriza 5. Leguminosa I. Maia, Leonor Costa (orient.) II. Silva, Fábio Sérgio Barbosa da (coorient.) III. Título.

581.634

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2014-277

**SIMBIOSE MICORRÍZICA ARBUSCULAR EM PAU-FERRO (*Libidibia ferrea*
(Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz var. *ferrea*) VISANDO MAXIMIZAÇÃO DA
PRODUÇÃO DE FITOQUÍMICOS FOLIARES COM POTENCIAL MEDICINAL**

FRANCINEYDE ALVES DA SILVA

Data da defesa: 24 / fevereiro / 2014

COMISSÃO EXAMINADORA

MEMBROS TITULARES

Dr. Fábio Sérgio Barbosa da Silva – (Co-orientador)
Universidade de Pernambuco

Dra. Lindete Miria Vieira Martins
Universidade Estadual da Bahia

Dr. Everardo Valadares de Sá Barreto Sampaio
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Cláudia Sampaio de Andrade Lima
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Uided Maaze Tibúrcio Cavalcante
Universidade Federal de Pernambuco

“Guia-me só a razão
Não me deram mais guia
Alumia-me em vão?
Só ela me alumia”

(**Guia-me só a razão**, poema
de Fernando Pessoa)

Agradecimentos

Humildemente a Deus, por me conceder a vida, e por estar presente em todos os momentos da minha caminhada, principalmente nos mais difíceis.

Aos meus queridos pais, Virgílio Alves da Silva (*in memorian*) e Iodália Alves da Silva, pelo amor incondicional, pela paciência, dedicação e incentivo à minha vida acadêmica.

À Felizete dos Santos, uma segunda mãe, pelo carinho, companheirismo e incentivo à minha vida acadêmica.

Aos meus irmãos, sobrinhos, primos, tios e cunhados, pelo carinho, amizade, companheirismo, incentivo, apoio e pelos momentos felizes juntos.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), pela concessão de bolsa de estudo.

À minha orientadora, Profa. Leonor Costa Maia, pela paciência, ensinamentos transmitidos e pela oportunidade de ser sua orientanda.

Ao meu co-orientador, Prof. Fábio Sérgio Barbosa da Silva, com quem aprendi a gostar dos FMA, e consequentemente a enfrentar o desafio de fazer o doutorado numa área tão distinta da minha (área da saúde); pela amizade, pelos ensinamentos transmitidos, pelo incentivo, pelo apoio moral em tantos momentos difíceis da caminhada.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos pelos ensinamentos transmitidos.

À Universidade de Pernambuco (UPE), por ter concedido a licença durante o período de duração do doutorado em Biologia de Fungos na Universidade de Federal de Pernambuco.

À Maria do Socorro Ribeiro Nunes, ex-diretora da UPE *Campus* Petrolina, pela amizade sincera e pelo apoio à pesquisa, concedendo o espaço para a implantação do Laboratório de Enzimologia e Fitoquímica Aplicado à Micologia (LEFAM), do campo experimental e pela colaboração na construção do telado experimental.

À Isabel Cristina de Oliveira, pela amizade e pela acolhida em sua residência todas as vezes em que precisei vir a Recife.

A todos os meus amigos, pela preocupação sincera, e pelas orações para meu fortalecimento nos momentos de dificuldade.

Aos meus colegas do doutorado pelo companheirismo e pelos bons momentos de descontração.

À Vilma dos Santos, pela amizade e ajuda em tantos momentos da caminhada.

A todos do LEFAM pelo companheirismo e pelos momentos de descontração.

A todos do Laboratório de Micorrizas pelo convívio durante o tempo em que eu estava cursando disciplinas.

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

RESUMO GERAL

Libidibia ferrea (pau-ferro), árvore da região semi-árida nordestina, tem potencial medicinal devido à presença de compostos secundários. Esta espécie forma associação com fungos micorrízicos arbusculares (FMA), que podem levar ao aumento na produção de compostos bioativos em plantas. O objetivo deste trabalho foi determinar o papel da simbiose micorrízica arbuscular e da adição de P ao substrato na produção de compostos em mudas produzidas em telado e em plantas estabelecidas em campo. O primeiro experimento foi um fatorial de dois tratamentos de inoculação (mistura de *Claroideoglossum etunicatum* + *Gigaspora albida* + *Acaulospora longula* e controle sem inoculação) e quatro níveis de P adicionado como superfosfato simples. O segundo e o terceiro experimentos, um em telado e um em campo, respectivamente, tiveram quatro tratamentos de inoculação: com *C. etunicatum*, *G. albida* e *A. longula* e controle (fungos nativos). Mudas foram mantidas por sete meses em telado e após foram avaliados os parâmetros de crescimento e feito o doseamento de compostos bioquímicos e fitoquímicos. Nas plantas mantidas em campo, também por sete meses, avaliou-se o crescimento e a concentração de ácido gálico. No 1º experimento, sem adição de P, as mudas inoculadas tiveram maior acúmulo de biomassa da parte aérea e a adição de P maximizou a biossíntese de carboidratos solúveis e de clorofila total. As mudas inoculadas com *G. albida*, no 2º experimento, tiveram os maiores diâmetro do caule e concentrações de clorofila *a*, proteínas totais e flavonoides totais. Em campo, 3º experimento, *G. albida* favoreceu a produção de plantas com maior altura e biossíntese de clorofila total, enquanto as mudas inoculadas com *C. etunicatum* produziram maior quantidade de ácido gálico. O sistema biotecnológico empregando FMA pode constituir alternativa para produção de mudas de *L. ferrea* com elevados teores de flavonoides foliares, além de favorecer a produção de ácido gálico em plantas estabelecidas em campo.

Palavras chave: Glomeromycota, compostos secundários, Leguminosae.

ABSTRACT

Libidibia ferrea (ironwood), a tree species of the Brazilian northeastern semi-arid region, has medicinal potential due to the presence of secondary compounds. The species forms association with mycorrhizal fungi (AMF), which can lead to increased production of bioactive compounds. The aim of this study was to determine the role of arbuscular mycorrhizal symbiosis and P addition to the substrate in the production of compounds in in greenhouse grown seedlings and field established plants. The first experiment was a factorial of two inoculation treatments (mixture of *Claroideoglomus etunicatum* + *Gigaspora albida* + *Acaulospora longula* and a control without inoculation) and four levels of P added as superphosphate. The second and third experiments, in greenhouse and field, respectively, had four inoculation treatments: with *C. etunicatum*, *G. albida* and *A. acaulospora* and control (native fungi). Seedlings were grown for seven months in the greenhouse and thereafter their growth parameters were evaluated and biochemical compounds and phytochemicals were assayed. In the field plants, also grown for seven months, growth and beyond the of gallic acid concentrations were evaluated. In experiment 1, without P addition, inoculated plants had higher shoot biomass accumulation and P addition maximized the biosynthesis of soluble carbohydrates and total chlorophyll. Seedlings inoculated with *G. albida*, in experiment 2, had the greatest stem diameter and, chlorophyll a, total protein and total flavonoids concentrations. In the field, experiment 3, *G. albida* inoculation favored the production of plants with greater height and total chlorophyll biosynthesis, while the seedlings inoculated with *C. etunicatum* produced larger amounts of gallic acid. The system employing biotechnological FMA can be an alternative to produce seedlings of *L. ferrea* with high levels of foliar flavonoids and to favor gallic acid production in field grown plants with high .

Keywords: Glomeromycota, secondary compounds, Leguminosae

Lista de tabelas

Capítulo 1	Pág.
Tabela 1 - Interação de plantas medicinais com fungos micorrízicos arbusculares (FMA).....	16
Tabela 2 - Estudos da produção de compostos secundários na parte aérea de plantas medicinais inoculadas com fungos micorrizicos arbusculares.....	24
 Capítulo 2	
Tabela 1 -. Níveis de significância (valores de <i>p</i>) para as variáveis estudadas, levando em consideração os efeitos dos fatores isolados (P e FMA) e a interação FMA X P	38
Tabela 2 -. Colonização micorrízica e matéria seca da parte aérea (MSPA) em mudas de pau-ferro cultivadas em telado experimental, em solo com quatro níveis de P e inoculadas ou não com fungos micorrízicos arbusculares, sete meses após a inoculação	39
Tabela 3 - Concentração de clorofila total (ICF-Índice de Clorofila Falker), carboidratos solúveis (mg g planta ⁻¹) e atividade antioxidante (mg planta/mg DPPH) foliares em mudas de pau-ferro cultivadas em telado experimental, em solo com ou sem adição de P, independentemente dos fungos micorrízicos arbusculares, sete meses após a inoculação.....	40
Tabela 4 - Concentração de fenóis totais, flavonoides totais e taninos foliares em mudas de pau-ferro inoculados com FMA cultivadas em telado experimental, em solo com ou sem adição de P, sete meses após a inoculação.....	41
 Capítulo 3	
Tabela 1 - Altura, matéria seca da parte aérea, matéria seca da parte subterrânea, número de folhas e diâmetro do caule de mudas de pau-ferro, associadas ou não a fungos micorrízicos arbusculares (FMA), sete meses após a inoculação, em telado experimental.....	49

Tabela 2 - Concentração de proteínas totais, carboidratos solúveis, fenóis totais, flavonóides totais, taninos totais, clorofila total, clorofilas <i>a</i> e <i>b</i> foliares em mudas de pau-ferro e colonização micorrízica, associadas ou não a fungos micorrízicos arbusculares (FMA) sete meses após a inoculação, em telado experimental.....	49
---	----

Capítulo 4

Tabela 1 - Caracterização química do solo utilizado da área experimental nas profundidades de 0-20 e 20-40 cm.....	57
--	----

Tabela 2 - Altura, número de folhas, diâmetro do caule, colonização, densidade de esporos (DE) e incremento da inoculação em plantas de pau-ferro, inoculadas ou não com fungos micorrízicos arbusculares (FMA), sete meses após transplantio ao campo, em Petrolina, PE.....	59
---	----

Tabela 3 - Concentração de clorofila total, fenóis e taninos totais, ácido gálico e incremento da inoculação em plantas de pau-ferro, inoculadas ou não a fungos micorrízicos arbusculares (FMA), sete meses após transplantio ao campo, em Petrolina, PE.....	60
--	----

SUMÁRIO

	Pág.
1.INTRODUÇÃO.....	13
2. FUNDAMENTAÇÃO TEORICA.....	15
2.1. Simbiose micorrízica arbuscular.....	15
2.2. Plantas medicinais da Caatinga.....	18
2.2.1 <i>Libidibia ferrea</i>	19
2.3 Compostos secundários vegetais.....	20
2.3.1 Compostos fenólicos	21
2.3.2 Flavonoides totais.....	22
2.3.3 Taninos hidrolisáveis.....	22
2.3.4 Atividade antioxidante.....	22
2.4 Produção de fitoquímicos em plantas micorrizadas.....	23
3. COMPOSTOS BIOATIVOS FOLIARES EM MUDAS DE PAU-FERRO INOCULADAS COM FMA E CULTIVADAS EM SOLO ADUBADO COM FÓSFORO.....	33
Resumo.....	34
Introdução.....	34
Material e métodos.....	35
Resultados e discussão.....	38
Conclusões	42
4. PRODUÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS FOLIARES EM MUDAS MICORRIZADAS DE PAU-FERRO [<i>Libidibia ferrea</i> (Mart. ex. Tul.) L. P. Queiroz var. <i>ferrea</i>].....	43
Resumo.....	44
Introdução.....	44
Material e métodos.....	45
Resultados.....	48
Discussão.....	50
Conclusões	52
5 FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES AUMENTAM A PRODUÇÃO DE ÁCIDO GÁLICO EM FOLHAS DE <i>Libidibia ferrea</i> EM CAMPO.....	53

Resumo.....	54
Introdução.....	54
Material e métodos.....	55
Resultados e discussão.....	58
Conclusão	61
6. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64

1. INTRODUÇÃO

Plantas medicinais são ricas em compostos secundários com propriedades farmacológicas e o conhecimento popular dos efeitos terapêuticos dessas plantas vem sendo passado de geração em geração, ao longo dos séculos. As partes da planta utilizadas na preparação dos medicamentos caseiros incluem folhas, frutos, raízes, cascas do caule e/ou semente. Na região semi-árida nordestina há várias plantas medicinais, com destaque para *Libidibia ferrea* (Albuquerque *et al.*, 2007), árvore conhecida vulgarmente por pau-ferro ou jucá, pertencente à família Leguminosae (Maia, 2004).

O pau ferro é utilizado na medicina popular como anti-diabético, anti-catarral, cicatrizante, anti-térmico e anti-diarréico (Maia, 2004). Estudos farmacológicos comprovam que é preventivo contra o câncer (Nakamura *et al.* 2002), anti-inflamatório e analgésico (Carvalho *et al.*, 1996). O potencial terapêutico é devido à presença de compostos fitoquímicos em extratos do caule e das folhas, especialmente taninos, saponinas, esteroides, flavonoides, cumarina, fenóis (Gonzalez., 2005) e ácido gálico (Nakamura *et al.*, 2002).

Uma das formas de maximizar o crescimento de plantas com potencial medicinal é pelo uso de fungos micorrízicos arbusculares (FMA), que formam simbiose com a maioria das plantas, resultando em incremento no desenvolvimento vegetal. Incrementos em espécies de interesse farmacológico foram registrados em: *Castanospermum australe* (Abu-Zeyad *et al.*, 1999), *Passiflora alata* (Silva *et al.*, 2004) *Zingiber officinale* (Silva *et al.*, 2008), *Origanum vulgare* (Marrone-Fortunato & Avato, 2008), *Inula ensifolia* (Zubek *et al.*, 2010). Além do isolado de FMA, a escolha do substrato de cultivo das plantas é fundamental para se obter máximo benefício da micorrização (Silveira *et al.*, 2003). Estudos recentes têm comprovado que a simbiose micorrízica pode ser alternativa para maximização da produção de compostos químicos com potencial medicinal (Kapoor *et al.*, 2007; Chaudhary *et al.*, 2008), com a fitomassa produzida concentrando mais princípios ativos (Krishna *et al.*, 2005), o que é mais atrativo para a indústria farmacêutica.

Otimização da produção de compostos fitoquímicos medicinais, em função do uso de FMA, tem sido documentada, com aumento na produção de: artemisinina em *Artemisia annua* (Kapoor *et al.*, 2007; Chaudhary *et al.*, 2008); óleos essenciais em *Menta arvensis* (Gupta *et al.*, 2002); ácidos rosmarínico e cafeíco em *Ocimum basilicum* (Toussaint *et al.*,

2007); flavanonas em *Aloe vera* (Mota-Fernández *et al.*, 2011); e saponina em *Gymnema sylvestre* (Zimare *et al.*, 2013). Embora a produção de fitoquímicos por plantas de pau-ferro seja comprovada (Carvalho *et al.*, 1996; Nakamura *et al.*, 2002; Gonzalez, 2005), não se conhece o potencial de FMA em incrementar essa produção. Protocolos biotecnológicos para produção de mudas de pau-ferro, visando instalação de cultivos no semi-árido pernambucano são relevantes, pois a matéria-prima produzida nos plantios terá maior valor agregado para comercialização na indústria farmacêutica, contribuindo para diminuição do uso extrativista e proporcionando alternativa econômica para pequenos agricultores (Oliveira *et al.*, 2013). A seleção de fungos eficientes em promover o crescimento do pau-ferro pode ser alternativa para diversificação de culturas no Vale do Submédio São Francisco, especialmente para os pequenos produtores da região, além de representar possibilidade de aumento da oferta de fitoterápicos para a indústria fitoterápica e farmacêutica.

Considerando a hipótese de que os FMA influenciam o aumento da concentração de compostos secundários em plantas de *L. ferrea*, os objetivos deste estudo foram avaliar se a inoculação com FMA e a adubação fosfatada promovem incremento na produção de compostos foliares bioativos em mudas e plantas de pau-ferro.

No primeiro capítulo é apresentada a fundamentação teórica, abrangendo aspectos da simbiose micorrízica arbuscular, eficiência micorrízica em plantas medicinais e produção de fitoquímicos em plantas micorrizadas. O segundo capítulo trata do papel do P e de isolado micorrízico sobre a produção de biomoléculas foliares em *L. ferrea*. No terceiro capítulo é descrita a produção de compostos bioativos foliares em função do inóculo de FMA testado em telado. No quarto capítulo, com a intenção de validar a biotecnologia micorrízica em campo, foi verificado o efeito dos FMA sobre a produção de um composto secundário específico, o ácido gálico.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Simbiose micorrízica arbuscular

A simbiose mutualística entre certos fungos do solo e raízes de plantas é denominada micorriza (Sieverding, 1991). Com base na morfoanatomia das raízes colonizadas, as micorrizas são classificadas em: ectomicorriza, arbuscular, arbutoíde, monotropóide, ericóide e orquidóide. O tipo mais comum é a micorriza arbuscular, que se caracteriza pela formação de arbúsculos no córtex da raiz hospedeira (Smith & Read, 2008).

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) são biotróficos obrigatórios e completam o ciclo de vida quando associados à raízes (Souza *et al.*, 2010). A simbiose micorrízica arbuscular é praticamente universal, ocorrendo na maioria dos *habitats* e em elevado número de plantas (Trindade *et al.*, 2003). Fósseis de FMA, datados do período Ordoviciano, há 460 milhões de anos (Redecker *et al.*, 2000), revelam a participação do grupo no processo de colonização do ambiente terrestre pelas plantas. Os FMA pertencem ao Filo Glomeromycota (Schüßler *et al.*, 2001) e estão divididos em 4 ordens, 13 famílias, 19 gêneros, e mais de 215 espécies descritas (Souza *et al.*, 2010); a reprodução é assexuada, com os esporos apresentando núcleos geneticamente diferentes (Hijri & Sanders, 2005).

A simbiose entre plantas e FMA tem início com uma série de eventos desencadeados por moléculas de sinalização e elicitores, liberadas pelos parceiros simbiotes; inicialmente ocorre penetração inter e intracelular no córtex da raiz, originando uma estrutura bastante ramificada, o arbúsculo, que é o sítio de troca de nutrientes e de sinais e compostos orgânicos entre os parceiros simbiotes (Bonfante *et al.*, 2009). Após estabelecimento na raiz, ocorre a formação do micélio externo, responsável pela absorção de nutrientes e água do solo, direcionando-os para a planta hospedeira, que em troca transfere carboidratos para o fungo (Moreira & Siqueira, 2002).

Os FMA atuam na nutrição da planta, aumentando a captação de nutrientes, principalmente P, em solos pobres (Yao *et al.*, 2008). A efetividade micorrízica varia com a espécie de planta e o FMA utilizado, sendo avaliada pela absorção de nutrientes e crescimento vegetal em relação ao controle não inoculado (Cavalcante *et al.*, 2009). A associação micorrízica estimula o crescimento de mudas economicamente importantes (Tristão *et al.*, 2006), inclusive plantas medicinais (Copetta *et al.*, 2006), como algumas

espécies pertencentes às famílias apiaceae, Asteraceae, Fabaceae, Apocynaceae, Liliaceae, Lamiaceae e Zingiberaceae (Tabela 1). Além disso, os FMA podem aumentar a concentração de clorofila foliar (Sheng *et al.*, 2008) e de metabólitos primários e secundários (Ratti *et al.*, 2010; Venkateswaslu *et al.* 2008; Prasad *et al.* 2011), maximizar a concentração foliar de nutrientes (Oliveira & Oliveira, 2004), proteger contra fungos patógenos (Borges *et al.*, 2007), controlar nematóides (Elsen *et al.*, 2008), prevenir a transferência de metais pesados da raiz para a parte aérea das plantas (Soares & Siqueira, 2008), minimizar o estresse salino (Yano-Melo *et al.*, 2003) e reduzir o estresse hídrico (Marulanda *et al.*, 2003).

Na região semi-árida brasileira, os FMA associam-se a muitas espécies de plantas da Caatinga (Souza *et al.*, 2003), incluindo algumas medicinais. Selecionar FMA eficientes em promover o crescimento de plantas, com propriedades farmacológicas, nativas da Caatinga, pode contribuir para melhorar a renda de agricultores e incrementar a produção de plantas medicinais.

Tabela 1: Interação de plantas medicinais com fungos micorrízicos arbusculares (FMA).

Espécie vegetal	FMA	Benefício	Referência
<i>Anethum graveolens</i> L. (Apiaceae)	<i>Glomus macrocarpum</i> <i>Glomus fasciculatum</i>	(+) (+)	Kapoor <i>et al.</i> (2002a)
<i>Artemisia annua</i> L. (Asteraceae)	<i>G. macrocarpum</i> <i>G. fasciculatum</i>	(+) (+)	Kapoor <i>et al.</i> (2007)
<i>Castanospermum australe</i> A. Cunn. & C. Fraser (Fabaceae)	<i>Glomus intraradices</i> <i>Gigaspora margarita</i>	(+) (+)	Abu-Zeyad <i>et al.</i> (1999)
<i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don (Apocynaceae)	<i>Glomus mosseae</i> <i>G. fasciculatum</i> <i>Glomus aggregatum</i> <i>G. intraradices</i>	(+) (+) (+) (+)	Ratti <i>et al.</i> (2010)
<i>Chlorophytum borivilianum</i> Santapau and Fernandes (Liliaceae)	<i>G. fasciculatum</i> <i>G. intraradices</i> <i>G. mosseae</i>	(+) (+) (+)	Dave & Tarafdar (2011)
<i>Cynara cardunculus</i> L. var. <i>scolymus</i> F. (Asteraceae)	<i>G. intraradices</i> <i>G. mosseae</i> <i>Glomus mix</i>	(0) (0) (+)	Ceccarelli <i>et al.</i> (2010)
<i>Echinacea purpurea</i> L. Moench (Asteraceae)	<i>G. intraradices</i>	(+)	Araim <i>et al.</i> (2009)

<i>Foeniculum vulgare</i> Mill (Apiaceae)	<i>G. macrocarpum</i> <i>G. fasciculatum</i>	(+) (+)	Kapoor <i>et al.</i> (2004)
<i>Mentha arvensis</i> L. (Kalka, Shivalik and Gomati) (Lamiaceae)	<i>G. fasciculatum</i>	(+)	Gupta <i>et al.</i> (2002)
<i>M. arvensis</i>	<i>G. clarum</i> <i>Glomus etunicatum</i> <i>Gigaspora margarita</i> <i>Acaulospora scrobiculata</i>	(+) (+) (+) (+)	Freitas <i>et al.</i> (2004)
<i>M. viridis</i>	<i>G. etunicatum</i> <i>Glomus lamellosum</i>	(+) (+)	Karagiannidis <i>et al.</i> (2011)
<i>Origanum vulgare</i> L. ssp. <i>hirtum</i> (Link) Ietswaart (Lamiaceae)	<i>Glomus viscosum</i>	(+)	Marrone-Fortunato & Avato (2008)
<i>Ocimum basilicum</i> L.var. genovese (Lamiaceae)	<i>G. mosseae</i> <i>G. margarita</i> <i>G. rosea</i>	(+) (+) (+)	Copetta <i>et al.</i> (2006)
<i>O. basilicum</i>	<i>Glomus caledonium</i> <i>G. mosseae</i> <i>G. intraradices</i>	(+) (+) (+)	Toussaint <i>et al.</i> (2007)
<i>O. vulgare</i> var. <i>cona</i> <i>O. vulgare hirtum</i> var. <i>Kalitera</i> <i>O. vulgare</i> b13/2 (Lamiaceae)	<i>G. mosseae</i>	(+)	Khaosaad <i>et al.</i> (2006)
<i>Salvia officinalis</i> L. (Lamiaceae)	<i>G. mosseae</i> <i>G. intraradices</i> Symbivit (seis espécies diferentes de <i>Glomus</i>)	(+) (+) (+)	Nell <i>et al.</i> (2009)
<i>Trachyspermum ammi</i> (Linn.) Sprague (Apiaceae)	<i>G. macrocarpum</i> <i>G. fasciculatum</i>	(+) (0)	Kapoor <i>et al.</i> (2002a)
<i>Trifolium pratense</i> L. (Fabaceae)	<i>G. mosseae</i>	(+)	Khaosaad <i>et al.</i> (2008)
<i>Zingiber officinale</i> L. (Zingiberaceae)	<i>Scutellospora heterogama</i> <i>Gigaspora decipiens</i> <i>Acaulospora koskei</i> <i>Entrophospora colombiana</i> Mix de FMA	(0) (0) (+) (+) (+)	Silva <i>et al.</i> (2008)

Benefício positivo (+), negativo (-), neutro (0).

2.2 Plantas medicinais da Caatinga

O bioma Caatinga ocupa uma área com cerca de 850.000 Km², que corresponde a grande parte da região semi-árida do Nordeste (Queiroz, 2009). Parte dessa área seca, denominada polígono das secas (Sampaio & Rodal, 2000), está situada nos estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e Minas Gerais (Drumond *et al.*, 2000). Nessa região, o clima é semi-árido, quente (temperatura média variando entre 24 °C e 26 °C) e com pluviosidade variando entre 250 e 800 mm anuais, podendo-se distinguir duas estações: uma chuvosa, com 3 a 5 meses, e uma seca, com 7 a 9 meses (Maia, 2004).

Espécies lenhosas e herbáceas de pequeno porte constituem a vegetação da Caatinga, assim como bromeliáceas e cactáceas (Drumond *et al.*, 2000). Tais plantas podem produzir acúleos e espinhos e cobertura descontínua de copas, características que têm relação com a escassez de água (Sampaio & Rodal, 2000). Na Caatinga, para as angiospermas, há registro de 4.467 espécies de plantas inseridas em 1.132 gêneros, pertencentes a 161 famílias (Flora do Brasil, 2014).

O conhecimento sobre o uso de plantas medicinais na cura de doenças faz parte da cultura popular (Agra *et al.*, 2007). Os erveiros, nos mercados, indicam a planta medicinal a ser utilizada para cada doença (Albuquerque *et al.*, 2007) e os diferentes modos de preparo, que podem ser na forma de maceração, decocção, infusão (Agra *et al.*, 2008), lambedor, banho diário e uso tópico (Alves *et al.*, 2007). Estudos etnobotânicos apontam que raízes, cascas, folhas, frutos e sementes de várias espécies de plantas nativas da Caatinga são utilizados pela população como medicinais (Almeida & Albuquerque, 2002; Almeida *et al.*, 2005; Albuquerque *et al.*, 2007; Agra *et al.*, 2007; Alves *et al.*, 2007).

Segundo Drumond *et al.* (2000), pau-ferro (*Libidibia ferrea* Mart. ex Tul. LP. Queiroz), sabiá (*Mimosa caesalpiniiifoli* Benth.), angico (*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan), aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. Allemão), juazeiro (*Ziziphus joazeiro* Mart.), catingueira (*Caesalpinia pyramidalis* Tul.) e marmeleiro (*Croton sonderianus* Muell. Arg.), entre outras, se destacam como medicinais na caatinga, e são usadas pela população pelas propriedades: diurética, antiasmática, antidiarréica, adstringente, antisséptica, antiulcerogênica e antifebril.

O uso indiscriminado dessas plantas pode ser danoso à saúde devido às interações, aos efeitos colaterais e às intoxicações (Alves *et al.*, 2007). Por outro lado, o uso extrativista pode induzir a prática da coleta excessiva de partes das plantas (Almeida &

Albuquerque, 2002). Por isso, o manejo apropriado, o cultivo e a domesticação de espécies medicinais são alternativas para obter matéria prima de interesse farmacêutico, diminuindo, dessa forma, o extrativismo descontrolado (Reis *et al.*, 2003). Nesse âmbito, alternativas biotecnológicas, como a simbiose micorrízica, devem ser estudadas visando estabelecimento de cultivos das plantas mais utilizadas pela população como medicinais.

Estudos multidisciplinares envolvendo as áreas de etnobotânica, fitoquímica, farmacologia, química orgânica sintética e química medicinal viabilizam a validação prévia do uso terapêutico de plantas medicinais, conduzindo à descoberta de novos medicamentos (Maciel *et al.*, 2002). “O decreto 5.813 de 22 de junho de 2006 aprovou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, estabelece diretrizes e linhas prioritárias para o desenvolvimento de ações pelos diversos parceiros em torno de objetivos comuns voltados à garantia do acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos em nosso país, ao desenvolvimento de tecnologias e inovações, assim como o fortalecimento das cadeias e dos arranjos produtivos, ao uso sustentável da biodiversidade brasileira e ao desenvolvimento do Complexo produtivo da Saúde” (MS, 2006).

2.2.1 *Libidibia ferrea*

Libidibia ferrea (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz var. *ferrea* (= *Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul.) é exemplo de espécie arbórea da família Leguminosae, muito utilizada pela população para diversos fins, em especial pela ação terapêutica (Maia, 2004).

Conhecida vulgarmente como pau-ferro e jucá, *L. ferrea* é uma árvore com 5 a 7 m de altura; o tronco mede de 10 a 30 cm de diâmetro, a casca é cinza-escuro, fina e lisa; as folhas são verde escuro por cima e verde claro por baixo, alternas, constituídas de 2 a 4 pares de pinas e cada pina com 4 a 6 pares de folíolos menores, oblongos e glabros (Maia, 2004); há presença de tricomas glandulares de coloração vermelha escura, dispersas na face abaxial nas folhas da plântula (Galdino *et al.*, 2007); flores pequenas e amarelas, em panículas; o fruto é uma vagem, com 6-8 cm de comprimento e aproximadamente 1,5 cm de largura, coriácea e com polpa seca; sementes marrons e duras (Maia, 2004). As sementes de *L. ferrea* apresentam dormência, sendo necessárias intervenções mecânicas (Lima *et al.*, 2006) ou químicas com ácido sulfúrico (Biruel *et al.*, 2007) para permitir a

permeabilidade do tegumento à água e favorecer a germinação, que ocorre entre 7 a 15 dias; o tamanho ideal para transplântio é atingido em 8 a 9 meses (Lorenzi, 2002).

O pau-ferro é uma árvore que tem diversas utilidades, sendo usada como medicamento, na indústria madeireira, na ornamentação pública, na restauração florestal de áreas degradadas, como forrageira para os animais e na fabricação de tinturas naturais (Maia, 2004).

A indicação terapêutica empírica do pau-ferro foi investigada cientificamente, sendo comprovada sua eficiência no tratamento de doenças pela constatação de atividade antiulcerogênica, antiinflamatória, analgésica, hipoglicemiante, anticancerígena, anti-histaminica, antimicrobiana, anticoagulante, e cicatrizante (Bacchi *et al.*, 1995; Carvalho *et al.*, 1996; Coelho, 2004; Gonzalez, 2005; Sampaio *et al.*, 2009; Cavalheiro *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2010). As principais formas de uso são: chá (decocção e infusão), lambedor e garrafada (Balbach, 1992; Maia, 2004; Agra *et al.*, 2007).

O poder terapêutico do pau-ferro é devido à presença de compostos secundários como saponinas, flavonoides, cumarina, antraderivados, fenóis, taninos, quinonas, triterpenos, alcalóides, lactonas-sesquiterpenicas (Gonzalez, 2005; Almeida *et al.*, 2005; Cavalheiro *et al.*, 2009, Souza *et al.*, 2006). Compostos ativos isolados e identificados do pau-ferro foram estudados com relação à função terapêutica. O galato de metila e ácido gálico são preventivos contra o câncer (Nakamura *et al.*, 2002), enquanto o ácido elágico e o ácido elágico 2-(2,3,6-trihidroxi-4-carboxifenil) podem amenizar complicações do diabetes (Ueda *et al.*, 2001); a chalcona paufferol A possui ação anticancerígena (Nozaki *et al.*, 2007).

Devido às propriedades farmacológicas comprovadas e ao amplo uso popular, *L. ferrea* foi incluída na Relação Nacional de Plantas Medicinais de interesse ao Sistema Único de Saúde (SUS) (Rennisus) divulgada pelo Ministério da Saúde em fevereiro de 2009 (<http://portal.saude.gov.br>).

2.3 Compostos secundários vegetais

O potencial terapêutico das plantas medicinais deve-se à presença de compostos secundários, cujo conteúdo varia com a influência de fatores como nutrientes, estágio de

desenvolvimento, sazonalidade, temperatura, idade, altitude, ritmo circadiano, radiação UV e disponibilidade hídrica (Gobbo-Neto & Lopes, 2007).

Os compostos secundários produzidos pelos vegetais são originados a partir do metabolismo da glicose, pela via do acetato e do ácido chiquímico (Santos, 2003). São agrupadas em terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados, cujas funções são proteger as plantas contra herbívoros e patógenos, como vírus, bactérias, fungos e nematóides, atuando também como agentes na simbiose planta-microrganismos (Taiz & Zeiger, 2004). Devido às diversas funções, esses compostos são de grande importância para as indústrias farmacêutica, agronômica, alimentar e cosmética (Santos, 2003).

2.3.1 Compostos fenólicos

Compostos fenólicos possuem uma ou mais hidroxilas ligadas ao benzeno, sendo a estrutura do fenol base para todos os compostos fenólicos (Vermerris & Nicholson, 2006); são formados por duas rotas metabólicas, a do ácido chiquímico e a do ácido malônico (Taiz & Zeiger, 2004).

A condensação aldólica do fosfoenolpiruvato e da eritrose-4-fosfato forma o ácido chiquímico, que pode ser metabolizado em ácido gálico ou ácido corísmico, originando os aminoácidos aromáticos, dentre estes a fenilalanina (Santos, 2003). A enzima fenilalanina-amônia-liase (PAL) catalisa a reação em que a fenilalanina perde uma molécula de amônia dando origem ao ácido cinâmico; nas reações subsequentes há adição de hidroxilas e outros substituintes, produzindo variados compostos fenólicos (Taiz & Zeiger, 2004).

Os compostos fenólicos são classificados em: fenilpropanóides, cumarinas, ácidos fenólicos (ex.: ácido gálico e ácido salicílico), flavonoides, fenóis simples, taninos hidrolisáveis, ligninas e taninos condensados, entre outros (Carvalho *et al.*, 2003).

Os compostos fenólicos são quantificados por meio de reagentes cromogênicos como vanilina, sais do ácido fosfomolibdico e cloreto férrico em meio ácido (Carvalho *et al.*, 2003). Uma das técnicas mais empregadas inclui o método de Follin-Ciocalteu, que é uma modificação do método descrito por Follin-Dennis, que inclui a adição do sulfato de lítio aos reagentes fosfomolibdico e fosfotungstístico (Vermerris & Nicholson, 2006).

As principais propriedades biológicas dos compostos fenólicos são atividade hepatestimulante, antibacteriana, antiviral, anti-inflamatório, antioxidante,

hipocolesterolêmica, analgésico tópico e hepatoprotetor (Carvalho *et al.* 2003), o que justifica o interesse da indústria de fármacos.

2.3.2 Flavonoides totais

Flavonoides são compostos fenólicos originados por duas rotas biossintéticas, a do ácido chiquímico que origina o anel B e a ponte de três carbonos e do acetato (via ácido malônico), que origina o anel A (Santos, 2003). A chalcona, precursora dos flavonoides, é formada a partir da *p*-coumaril-CoA e de três moléculas de malonil-CoA, com a reação catalisada pela enzima chalcona sintase (Heldt, 2005). Os flavonoides podem ser classificados em auronas, flavonas, isoflavonoides, flavonóis, chalconas, flavanonas, flavanas, entre outros, e possuem propriedades terapêuticas como anti-inflamatória, hormonais, antiviral, antitumoral, antimicrobiana anti-hemorragico (Zuanazzi & Montanha, 2003). Os métodos de estudo para flavonoides incluem cromatografia de camada delgada, cromatografia líquida de alta eficiência, reagente Follin-Ciocalteu e reação de precipitação com cloreto de alumínio em meio alcalino (Zuanazzi & Montanha, 2003).

2.3.3 Taninos hidrolisáveis

Taninos são formados comumente pela β -D-glicose, um poliol central, que se liga com o ácido gálico por meio de reações de esterificação; são classificados em galotaninos e elagitaninos, cujo precursor é o β -1,2,3,4,6-pentagaloil-D-glicose. Possuem propriedades terapêuticas antioxidantes, anti-inflamatórias e como cicatrizante (Santos & Mello, 2003). Os principais métodos para análise incluem reação com iodeto de potássio, oxidação com óxido nítrico (Vermerris & Nicholson, 2006), solução de cloreto férrico, reagentes de Folin-Denis e Folin-Ciocalteu, além da precipitação de proteínas (Santos & Mello, 2003).

2.3.4 Atividade antioxidante

Os radicais livres são formados durante as reações de oxidação do metabolismo normal dos organismos, no entanto, em condição de estresse a concentração é aumentada causando danos às células. Para se protegerem desses danos, os organismos utilizam mecanismos enzimáticos (catalase, glutathione peroxidase e superóxido dismutase) e substâncias antioxidantes (compostos fenólicos, vitamina C e E) (Vermerris & Nicholson,

2006). As principais espécies reativas de oxigênio (EROs) incluem radical óxido nítrico, hidroxila, peróxido de hidrogênio, ânion superóxido (Taiz & Zeiger, 2004).

Os compostos fenólicos com potencial antioxidante têm sido investigados em plantas medicinais (Ruiz-Terán *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2005). Estudos têm demonstrado que plantas medicinais da Caatinga possuem grande atividade antioxidante e sugerem que tal atividade tem relação com o alto conteúdo de fenólicos (Silva *et al.*, 2011) e pode estar relacionada com a atividade antiinflamatória da planta estudada (Desmarchelier *et al.*, 1999).

2.4 Produção de fitoquímicos em plantas micorrizadas

Os fitoquímicos também participam da interação planta/FMA, pois durante o processo de formação da simbiose micorrízica há aumento, nas raízes, de compostos como flavonoides (Larosse *et al.*, 2002), carotenóides (Fester *et al.*, 2002), derivados do ciclohexanona (Vierheilig *et al.*, 2000), resitina, solavetivona (Yao *et al.*, 2003), ácidos benzóico e cinâmico (Ponce *et al.*, 2009) e estrigolactonas (Garcia-Garrido *et al.*, 2009). Foram identificados e isolados compostos secundários de acúmulo transitório, estimulados no estágio inicial da colonização pelos FMA, e compostos secundários de acúmulo contínuo, indicando correlação com o estabelecimento do fungo na raiz (Peipp *et al.*, 1997).

Um dos benefícios da colonização micorrizica nas plantas é o aumento na concentração de metabólitos primários e secundários (Oliveira *et al.*, 2013), devido à formação das estruturas simbióticas, os arbúsculos, que tornam ativas as vias biossintéticas das mitocôndrias, especificamente o ciclo de Krebs (Lohse *et al.*, 2005), resultando em aumento na taxa fotossintética (Wright *et al.*, 1998). Considerando que as vias metabólicas não ocorrem de modo independente, a alteração no metabolismo primário resulta em mudanças no metabolismo secundário (Santos, 2003).

Há pouco tempo, o acúmulo de fitoquímicos na parte aérea de plantas micorrizadas era documentado apenas como mudanças fisiológicas no crescimento e na nutrição vegetal (Toussaint, 2007). Estudos recentes têm comprovado que a simbiose micorrizica pode ser alternativa na maximização da produção de compostos químicos com potencial medicinal (Kapoor *et al.*, 2007; Chaudhary *et al.*, 2008), concentrando na parte aérea mais princípios ativos (Krishna *et al.*, 2005), o que é atrativo para a indústria farmacêutica.

A produção otimizada de compostos fitoquímicos medicinais na parte aérea em função do uso de FMA tem sido documentada em vários estudos, conduzidos em casa de vegetação ou em campo (Tabela 2). Devido ao interesse comercial dos óleos essenciais, em especial para a indústria farmacêutica, grande parte dos trabalhos foi inicialmente direcionada à pesquisa de óleos essenciais em plantas medicinais micorrizadas pertencentes às famílias Asteraceae e Lamiaceae (Chaudhary *et al.*, 2008; Binet *et al.*, 2011; Karagiannidis *et al.*, 2012).

Tabela 2. Estudos da produção de compostos secundários na parte aérea de plantas medicinais inoculadas com fungos micorrizicos arbusculares

Planta medicinal	Efeito do FMA na produção	Compostos secundários	Referências
Família/ Espécie			
TERPENOS			
APIACEAE			
<i>Anethum graveolens</i> L.	<i>Glomus macrocarpum</i> > <i>Glomus fasciculatum</i> >	Óleos essenciais	Kapoor <i>et al.</i> (2002a)
<i>Coriandrum sativum</i> L.	<i>G. macrocarpum</i> > <i>G. fasciculatum</i> >	Óleos essenciais	Kapoor <i>et al.</i> (2002b)
<i>Foeniculum vulgare</i> Mill	<i>G. macrocarpum</i> > <i>G. fasciculatum</i> >	Óleos essenciais	Kapoor <i>et al.</i> (2004)
<i>Trachyspermum ammi</i> (Linn.) Sprague	<i>G. macrocarpum</i> > <i>G. fasciculatum</i> >	Óleos essenciais	Kapoor <i>et al.</i> (2002a)
ASTERACEAE			
<i>Arnica montana</i> L.	Inóculo nativo (Karkonosze)= Inóculo nativo (Kurpie) = <i>Glomus intraradices</i> UNIJAG PL24-1 = <i>G. intraradices</i> BEG 140 = <i>Glomus Mix</i> =	Lactonas sesquiterpênicas totais	Jukiewicz <i>et al.</i> 2010
<i>Artemisia annua</i> L.	<i>G. macrocarpum</i> > <i>G. fasciculatum</i> >	Artemisinina Óleos essenciais	Chaudhary <i>et al.</i> (2008)
	<i>G. macrocarpum</i> > <i>G. fasciculatum</i> >	Artemisinina	Kapoor <i>et al.</i> (2007)
<i>Inula ensifolia</i> L.	<i>G. intraradices</i> UNIJAG PL- Bot = <i>G. intraradices</i> UNIJAG PL Kap = <i>Glomus clarum</i> UNIJAG PL 13 = Inóculo nativo =	Derivados do timol [10-isobutiriloxi-8,9-epoxitímol isobutirato e mistura de 10-(2-metilbutiriloxi)-8,9-epoxitímol. Isobutirato e 10-isovaleroiloxi-8,9-epoxitímol Isobutirato]	Zubek <i>et al.</i> (2010)

	<i>G. intraradices</i> UNIJAG PL-Bot < <i>G. intraradices</i> UNIJAG PL Kap < <i>G. clarum</i> UNIJAG PL13-2 < Inóculo nativo <	Derivado de timol [7-isobutiriloxitimol éter metílico]	
<i>Santolina chamaecyparissifolia</i> L.	<i>Glomus lamellosum</i> >	Óleos essenciais	Karagiannidis <i>et al.</i> (2012)
<i>Weddellia chinensis</i> (Osbeck) Merrill.	<i>Acaulospora deligata</i> > <i>Glomus aggregatum</i> > <i>Gigapora margarita</i> > <i>Glomus feugianum</i> > <i>G. fasciculatum</i> > <i>Glomus rubiforme</i> > <i>Scutellospora heterogama</i> >	Saponinas	Nisha & Rajeshkumar (2010)
APOCYNACEAE			
<i>Gymnema sylvestre</i>	<i>G. fasciculatum</i> > <i>Glomus mosseae</i> >	Saponina [ácido gimnêmico]	Zimare <i>et al.</i> (2013)
GERANIACEAE			
<i>Geranium dissectum</i> L.	<i>G. lamellosum</i> >	Óleos essenciais	Karagiannidis <i>et al.</i> (2012)
LAMIACEAE			
<i>Lavandula angustifolia</i> L.	<i>G. lamellosum</i> >	Óleos essenciais	Karagiannidis <i>et al.</i> (2012)
<i>Mentha arvensis</i> L.	<i>G. clarum</i> > <i>G. etunicatum</i> > <i>G. margarita</i> > <i>Acaulospora scrobiculata</i> >	Óleos essenciais Mentol	Freitas <i>et al.</i> (2004)
<i>Mentha arvensis</i> Cultivares: Shivalik Gomti e Kalka	<i>G. fasciculatum</i> <	Óleos essenciais	Gupta <i>et al.</i> (2002)
<i>Mentha viridis</i> L.	<i>G. etunicatum</i> > <i>Gl. Lamellosum</i> >	Óleos essenciais	Karagiannidis <i>et al.</i> (2011)
<i>Ocimum basilicum</i> L.	<i>G. fasciculatum</i> > <i>G. intraradices</i> > <i>G. etunicatum</i> > <i>G. mosseae</i> =	Óleos essenciais Óleos essenciais	Rasouli-Sadaghiani <i>et al.</i> (2010) Toussaint <i>et al.</i> (2008)
<i>O. basilicum</i> L. var. <i>genovese</i>	<i>Gigaspora rosea</i> > <i>G. margarita</i> > <i>G. rosea</i> >	Acetato de bornil Eugenol metílico Óleos essenciais	Copetta <i>et al.</i> (2007) Copetta <i>et al.</i> (2006)
<i>Origanum dictamnus</i> L.	<i>G. lamellosum</i> >	Óleos essenciais	Karagiannidis <i>et al.</i> (2012)
<i>Origanum onites</i> L.	<i>G. etunicatum</i> >	Óleos essenciais	Karagiannidis <i>et al.</i>

	<i>G. lamellosum</i> =		(2011)
<i>Origanum vulgare</i> var. cona <i>O. vulgare</i> b13/2	<i>G. mosseae</i> >	Óleos essenciais	Khaosaad <i>et al.</i> (2006)
<i>Plectranthus amboinicus</i> Lour) Spreng.	<i>Acaulospora bireticulata</i> > <i>Acaulospora scrobiculata</i> > <i>G. margarita</i> > <i>G. aggregatum</i> > <i>Glomus geosporum</i> > <i>G. mosseae</i> > <i>S. heterogama</i> >	Saponinas	Rajeshkumar <i>et al.</i> (2008)
<i>Salvia officinalis</i> L.	Symbivit (mix espécies de <i>Glomus</i>) = <i>G. mosseae</i> = <i>G. intraradices</i> =	Óleos essenciais	Nell <i>et al.</i> (2009)
	<i>G. lamelloum</i> >	Óleos essenciais	Karagiannidis <i>et al.</i> (2012)
COMPOSTOS FENÓLICOS			
ANACARDIACEAE			
<i>Myracrodruon urundeuva</i> Fr. Engler Allemão	<i>Acaulospora longula</i> > <i>Gigaspora albida</i> =	Fenóis totais Flavonóides	Oliveira <i>et al.</i> (2013)
APOCYNACEAE			
<i>Catharantus roseus</i> L. G. Don	<i>Glomus</i> spp >	Fenóis totais	Rosa-Mera <i>et al.</i> (2011)
ASPHODELACEAE			
<i>Aloe vera</i> L.	<i>G. fasciculatum</i> > <i>Glomus claroideum</i> >	Flavanonas	Mota-Fernández <i>et al.</i> (2011)
	<i>G. fasciculatum</i> = <i>G. claroideum</i> >	Flavonóis	
ASTERACEAE			
<i>Arnica montana</i> L.	Inóculo nativo (Karkonosze) = Inóculo nativo (Kurpie) = <i>Glomus intraradices</i> NIJAG PL24-1 = <i>G. intraradices</i> BEG 140 = <i>Glomus Mix</i> =	Ácidos fenólicos	Jukiewicz <i>et al.</i> (2010)
<i>Cynara cardunculus</i> L. var. <i>scolymus</i> F.	<i>Glomus mix</i> > <i>G. intraradices</i> > <i>Glomus mosseae</i> =	Fenóis totais	Ceccarelli <i>et al.</i> (2010)
<i>Echinacea purpurea</i> L.	<i>G. intraradices</i> >	Fenóis totais	Araim <i>et al.</i> (2009)
<i>Weddilla chinensis</i> (Osbeck) Merril.	<i>A. deligata</i> > <i>G. aggregatum</i> > <i>G. margarita</i> >	Fenóis totais Ortodihidroxifenol	Nisha & Rajeshkumar (2010)

	<i>G. feugianum</i> >		
	<i>G. fasciculatum</i> >		
	<i>G. rubiforme</i> >		
	<i>S. heterogama</i> >		
	<i>A. deligata</i> >	Flavonoides	
	<i>G. aggregatum</i> >	Taninos	
	<i>G. margarita</i> >		
	<i>G. feugianum</i> <		
	<i>G. rubiforme</i> <		
	<i>S. heterogama</i> <		
FABACEAE			
<i>Anadenanthera colubrina</i> (Vell.) Brenan	Mistura de FMA (<i>G. albida</i> e <i>A. longula</i>) >	Taninos totais Fenóis totais Flavonoides	Pedone-Bonfim <i>et al.</i> (2013)
<i>Trifolium pratense</i> L.	<i>G. mosseae</i> >	Isoflavona: biochanina A	Khaosaad <i>et al.</i> (2008)
HYPERICACEAE			
<i>Hypericum perforatum</i> L.	<i>Rhizophagus intraradices</i> > (<i>Glomus intraradices</i>) <i>Funneliformis mosseae</i> = (<i>G. mosseae</i>) Mix FMA >	Derivados da antraquinona [hipericina]	Zubek <i>et al.</i> (2012)
	<i>R. intraradices</i> = (<i>G. intraradices</i>) <i>F. mosseae</i> = (<i>G. mosseae</i>) Mix FMA >	Derivados da antraquinona [pseudohipericina]	
LAMIACEAE			
<i>Ocimum basilicum</i> L. Cultivar Purple (Petra)	<i>G. intraradices</i> =	Fenólicos totais Ácido caftárico Ácido chicórico Ácido rosmarínico	Lee & Scagel (2009)
Cultivar Genovese Italian			
<i>O. basilicum</i> L.	<i>G. mosseae</i> =	Ácido rosmarínico ÁcidoCaféico Fenóis	Toussaint <i>et al.</i> (2008)
	<i>G. intraradices</i> =	Ácido Cafeíco	Toussaint <i>et al.</i> (2007)
	<i>Glomus caledonium</i> > <i>G. mosseae</i> >		
<i>Plectranthus amboinicus</i> (Lour) Spreng.	<i>A. bireticulata</i> > <i>A. scrobiculata</i> > <i>G. margarita</i> > <i>G. aggregatum</i> > <i>G. geosporum</i> > <i>G. mosseae</i> > <i>S. heterogama</i> >	Fenóis totais o-Dihidroxifenóis Flavonóides	Rajeshkumar <i>et al.</i> (2008)

	<i>A. bireticulata</i> >	Taninos	
	<i>A. scrobiculata</i> >		
	<i>G. margarita</i> >		
	<i>G. aggregatum</i> >		
	<i>G. geosporum</i> >		
	<i>G. mosseae</i> >		
	<i>S. heterogama</i> <		
<i>Salvia officinalis</i> L.	<i>G. intraradices</i> >	Fenóis totais Flavonóides totais	Geneva <i>et al.</i> (2010)
	Symbivit (Mix de espécies de <i>Glomus</i>) =	Fenóis totais Ácido rosmarínico	Nell <i>et al.</i> (2009)
	<i>G. mosseae</i> =		
	<i>G. intraradices</i> =		
PUNICACEAE			
<i>Punica granatum</i> L.	<i>G. mosseae</i> >	Fenóis totais	Singh <i>et al.</i> (2012).
	<i>Acaulospora laevis</i> >		
	<i>Glomus manhotis</i> >		
	Mix de espécies de FMA >		
THEACEAE			
<i>Camellia sinensis</i> (L). O. Kuntze	Mix FMA nativos > FMA cultivados <	Polifenóis totais	Singh <i>et al.</i> 2010
COMPOSTOS NITROGENADOS			
APOCYNACEAE			
<i>Catharantus roseus</i> L. G. Don	<i>G. fasciculatum</i> >	Vincristina	Ratti <i>et al.</i> (2010)
	<i>G. intraradices</i> =	Catarantina	
	<i>G. mosseae</i> >	Vindolina	
	<i>G. aggregatum</i> >	Vinblastina	
	Espécies de <i>Glomus</i> >	Vinblastina	Rosa-Mera <i>et al.</i> (2011)
ASTERACEAE			
<i>Wedilla chinensis</i> (Osbeck) Merrill.	<i>A. deligata</i> >	Alcalóides	Nisha & Rajeshkumar (2010)
	<i>G. aggregatum</i> >		
	<i>G. feugianum</i> <		
	<i>G. margarita</i> >		
	<i>G. rubiforme</i> <		
	<i>G. fasciculatum</i> >		
	<i>S. heterogama</i> <		
FABACEAE			
<i>Castanospermum</i> <i>australe</i> A. Cunn. & C. Fraser	<i>G. intraradices</i> > <i>G. margarita</i> >	Castanospermina	Abu-Zeyad <i>et al.</i> (1999)
LAMIACEAE			
<i>Plectranthus</i> <i>amboinicus</i> (Lour) Spreng.	<i>A. bireticulata</i> >	Alcalóides	Rajeshkumar <i>et al.</i> (2008)
	<i>A. scrobiculata</i> >		
	<i>G. margarita</i> >		
	<i>G. aggregatum</i> >		
	<i>G. geosporum</i> >		

G. mosseae >
S.heterogama >

THEACEAE

<i>Camellia sinensis</i> (L). O. Kuntze	<i>Mix FMA nativos</i> > Fungos cultivados >	Cafeína	Singh <i>et al.</i> (2010)
--	---	---------	----------------------------

Produção de fitoquímicos em plantas micorrizadas, com relação ao controle: (>) maior (=) igual (<) menor

A produção de biomoléculas na parte subterrânea vegetal, classicamente relacionada à comunicação entre simbioses, também tem recebido atenção nas pesquisas sobre produção de compostos bioativos em função de FMA. Fenóis totais no bulbo de *Allium cepa* L (Perner *et al.*, 2008), óleo-resina no rizoma de *Zingiber officinale* Roscoe (Silva *et al.*, 2008), ácidos sesquiterpênicos nas raízes de *Valeriana officinalis* L. (Nell *et al.*, 2010), saponinas em tubérculo de *Chlorophytum borivilianum* L. (Dave & Tarafdar, 2011), colchicina no tubérculo de *Gloriosa superba* L. (Yadav *et al.*, 2013), ácidos fenólicos na raiz de *Echnacea purpurea* (L.) Moench (Araim *et al.*, 2009) e ácidos fenólicos e lactonas sesquiterpênicas em raízes de *Arnica montana* L. (Jurkiewicz *et al.*, 2010) tiveram a concentração modulada pela micorrização. Além disso, foram registrados aumentos de compostos secundários em plantas utilizadas na dieta humana como nutracêuticas: leucopeno em *Solanum lycopersicum* L. (Givoannetti *et al.*, 2012), compostos fenólicos antioxidantes em *C. cardunculus* (Cecarrel *et al.*, 2010) e compostos fenólicos em *Lactuca sativa* L. (Baslam & Goigoechea, 2012).

No Brasil, o primeiro trabalho com plantas medicinais micorrizadas visando aumento na produção de compostos bioativos foi realizado por Freitas *et al.* (2004), os quais observaram em *M. arvensis* incremento na produção e qualidade de óleos essenciais. Quatro anos depois, Silva *et al.* (2008) registraram maior produção de óleo resina no rizoma de *Z. officinale* inoculada com *S. heterogama*, *Gigaspora decipiens*, *Acaulospora koskei*, *Entrophospora colombiana* e mistura dos quatro isolados. Recentemente, no Nordeste, Oliveira *et al.* (2013) e Pedone-Bonfim *et al.* (2013) observaram aumento na produção de compostos fenólicos nas espécies arbóreas medicinais nativas da Caatinga, *M. urundeuva* e *A. colubrina*, respectivamente, quando em associação com FMA.

Isolados distintos de FMA podem influenciar diferentemente a quantidade e qualidade dos compostos terpenóides, nitrogenados e fenólicos em diferentes espécies de plantas medicinais (Copetta *et al.*, 2006; Toussaint *et al.*, 2007; Kapoor *et al.*, 2002a; Khaosaad *et al.*, 2006). Em *O. basilicum* var. *genovese* colonizada por *G. rosea* houve

aumento na produção de óleos essenciais, de cânfora e de α -terpineol; por outro lado, em plantas inoculadas com *G. margarita* registraram baixas concentrações de eucalipitol, linalol e eugenol (Copetta *et al.*, 2006). Similarmente, os frutos de *Anethum graveolens* e de *Trachyspermum ammi* inoculadas com *G. macrocarpum* tiveram maior concentração de óleos essenciais que plantas inoculadas com *G. fasciculatum* (Kapoor *et al.*, 2002a). Associadas a *G. mosseae*, os genótipos *O. vulgare* b 13/2 e *Origanum vulgare* var. cona apresentaram aumento na concentração de óleos essenciais, porém em *O. vulgare* ssp. *hirtum* var. *Kaliterea* esse benefício não foi documentado (Khaosaad *et al.*, 2006). Esses registros apontam para a necessidade de seleção de isolados de FMA quando o objetivo é otimizar a produção de compostos bioativos.

Alterações nas concentrações de alcalóides também foram registradas em *C. australe* e *C. roseus* por influência indireta da colonização micorrízica (Abu-Zeyad *et al.*, 1999; Ratti *et al.*, 2010). Em *C. roseus*, *G. mosseae* foi mais eficiente do que *G. aggregatum* e *G. fasciculatum* em induzir aumento na produção de alcalóides na raiz, no caule e nas folhas (Ratti *et al.*, 2010). Por outro lado, em *C. australe*, *G. intraradices* foi mais eficiente do que *G. margarita* em maximizar a produção de castanospermina (Abu-Zeyad *et al.*, 1999). Quanto aos compostos fenólicos, a colonização de *E. purpurea* por *G. intraradices* favoreceu a concentração desses compostos nas raízes com relação ao controle, com destaque para o ácido caftárico e ácido chicórico (Araim *et al.*, 2009).

Os Fenólicos, são compostos antioxidantes que protegem os organismos contra os radicais livres (Vermerris & Nicholson, 2006). Em raízes colonizadas por FMA foi verificada grande quantidade de espécies reativas ao oxigênio (Fester e Hause, 2005); tal incremento é justificado pelo aumento no número de enzimas antioxidantes (Lambais *et al.*, 2003) e de compostos fenólicos antioxidantes (Toussaint *et al.*, 2007) em plantas micorrizadas. Ceccarelli *et al.* (2010) registraram que a colonização micorrízica arbuscular em *C. cardunculum* induziu aumento do conteúdo fenólico com poder antioxidante, resultando em maior atividade antirradicais livres na parte aérea. Porém, Geneva *et al.* (2010) observaram que em *S. officinalis* houve redução da atividade de enzimas antioxidantes importantes, como a ascorbato peroxidase, a superóxido dismutase e a catalase, sugerindo que a colonização micorrízica provavelmente não tenha causado estresse oxidativo.

Os seguintes mecanismos foram propostos para explicar como os FMA modulam a produção de metabólitos secundários nas raízes e na parte aérea das plantas: sinalização entre os simbioses mutualísticos, nutrição melhorada, resposta de defesa, alterações no perfil hormonal, alta taxa de fotossíntese, aumento dos níveis de espécies reativas do oxigênio, ativação de rotas metabólicas, aumento do conteúdo de moléculas sinalizadoras envolvidas na síntese de compostos fenólicos, maior atividade e expressão gênica de enzimas chave de rotas metabólicas (Larose *et al.*, 2002; Kapoor *et al.*, 2002a; Copetta *et al.*, 2006; Toussaint *et al.*, 2007; Chaudhary *et al.*, 2008; Dave & Tarafdar, 2011; Zimare *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013, Ceccarelli *et al.*, 2010). No entanto, para Toussaint (2007), os mecanismos que os FMA utilizam para induzir aumento dos compostos fitoquímicos na parte aérea das plantas hospedeiras ainda não estão esclarecidos. Larose *et al.* (2002) observaram que a sinalização entre os simbioses aumenta a concentração de flavonóides na raiz de *Medicago sativa* cv. Steel, dependendo do estágio da simbiose e da espécie de FMA inoculado. Por outro lado, Copetta *et al.* (2006) e Zubek *et al.* (2010) sugeriram que é a resposta de defesa à colonização micorrízica que eleva a concentração de compostos secundários, considerando que a atividade antifúngica é uma das funções dos óleos essenciais.

A nutrição melhorada das plantas micorrizadas, especialmente em fósforo (Kapoor *et al.*, 2002a) e em nitrogênio (Toussaint *et al.*, 2007; Mota-Fernandez *et al.*, 2011), pode incrementar a produção de terpenóides e de ácidos fenólicos. Contudo, há controvérsias sobre a influência da fertilização fosfatada em aumentar a produção de compostos bioativos em plantas medicinais. Kapoor *et al.* (2002a) apontaram o P como um possível indutor da produção e da qualidade de óleos essenciais em *A. graveolens* e *T. ammi* inoculadas com *G. macrocarpum* e *G. fasciculatum*. Para Toussaint *et al.* (2007), o aumento na produção de ácido rosmarínico e ácido caféico em *O. basilicum* pode ter sido influenciado tanto pelo P como mediado diretamente pelo FMA. Em *S. officinalis* micorrizada não houve alteração na produção de ácidos fenólicos, enquanto o alto teor de P aumentou a concentração de ácido rosmarínico nas folhas (Nell *et al.*, 2009). Contrariamente, Freitas *et al.* (2004) observaram que a micorrização de *M. arvensis*, associada a aplicação de P, reduziu os teores de mentol e a qualidade dos óleos essenciais, enquanto sem a adição de P, as plantas tiveram aumento de 88 % no teor de óleos essenciais e 89 % no teor de mentol, que o controle não inoculado. Pedone-Bonfim *et al.*

(2013) registraram que o benefício da nutrição fosfatada associada à inoculação micorrízica foi dependente do composto fenólico considerado.

O aumento do número de tricomas glandulares em folhas de *O. basilicum* var. *genovese*, devido a mudanças hormonais induzidas por FMA, pode estar relacionado à maior concentração de óleos essenciais (Copetta *et al.*, 2006). No entanto, resultados contrários foram encontrados por Marone-Fortunato & Avato (2008), os quais verificaram que apesar de *G. viscosum* ter induzido aumento significativo na densidade de glândulas nas folhas de *O. vulgare*, o incremento não foi suficiente para produzir mudanças claras na síntese e acúmulo de óleos essenciais.

Os FMA formam associação com a maioria das espécies vegetais da Caatinga (Souza *et al.*, 2003), dentre as quais *L. ferrea* (Gatai *et al.*, 2011). O conhecimento sobre a condição micorrízica da espécie vegetal é importante para garantir sucesso na produção de mudas, sobretudo em condições adversas, como solos pobres em nutrientes (Santana, 2010) ou contaminados (Gatai *et al.*, 2011). A eficiência de FMA sobre o crescimento de espécies de *Caesalpinia* é conhecida (Carneiro *et al.*, 1998), porém não está documentado o papel da simbiose em otimizar a produção de compostos bioativos em plantas desse gênero. Nesse contexto, o emprego da tecnologia micorrízica pode ser alternativa promissora, pois esse benefício foi registrado em outras espécies da Caatinga como *M. urundeuva* (Oliveira *et al.*, 2013) e *A. colubrina* (Pedone-Bonfim *et al.*, 2013).

Para a região semi-árida, os agricultores poderão cultivar mudas de plantas medicinais, tornando possível o comércio de matéria prima, evitando o extrativismo indiscriminado e agregando valor à sua economia.

3. COMPOSTOS BIOATIVOS FOLIARES EM MUDAS DE PAU-FERRO INOCULADAS COM FMA E CULTIVADAS EM SOLO ADUBADO COM FÓSFORO ¹

¹ Trabalho a ser submetido para publicação na Industrial Crops and Products.

3. COMPOSTOS BIOATIVOS FOLIARES EM MUDAS DE PAU-FERRO INOCULADAS COM FMA E CULTIVADAS EM SOLO ADUBADO COM FÓSFORO

RESUMO

A aplicação de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) associada à fertilização fosfatada pode otimizar a biossíntese de compostos bioativos. *Libidibia ferrea* é utilizada pela população do nordeste do Brasil como recurso terapêutico, devido às suas propriedades medicinais. Plantas dessa espécie formam simbiose com FMA e foi testada a hipótese de que a fertilização fosfatada aumenta a produção de compostos bioativos foliares, com os benefícios maximizados em plantas micorrizadas. Portanto, objetivou-se verificar o efeito da inoculação micorrízica e da adubação fosfatada na produção de biomoléculas foliares em mudas de *L. ferrea*. Plântulas foram transferidas para potes com 1,2 kg de solo adubado ou não com 13, 31 e 55 mg de P_2O_5 /kg de solo. Solo-inóculo contendo 300 esporos de um mix de *Claroideoglomus etunicatum* + *Gigaspora albida* + *Acaulospora longula* foi depositado nas raízes e as plantas mantidas em telado experimental por sete meses. A inoculação micorrízica favoreceu o acúmulo de matéria seca da parte aérea das plantas, dispensando a fertilização do substrato, enquanto a adição de P maximizou a biossíntese de carboidratos solúveis e de clorofila total. No entanto, a aplicação conjunta de FMA e P não incrementa a produção de compostos bioativos foliares em mudas de pau-ferro.

Palavras-chave: Glomeromycota, metabolismo secundário, nutrição fosfatada.

1. INTRODUÇÃO

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) são abundantes no solo e associam-se simbioticamente a raízes da maioria das espécies vegetais. A associação propicia aumento no crescimento da planta, devido à absorção de nutrientes do solo, principalmente fósforo (Smith & Read, 2008). Em solos pobres em P, plantas micorrizadas são beneficiadas devido à atuação do micélio externo, que explora área além dos limites das raízes (Moreira & Siqueira, 2002). No entanto, níveis elevados de P no solo prejudicam a associação (Carneiro *et al.*, 2004), suprimindo diversos benefícios ao hospedeiro.

Diversas plantas nativas da Caatinga formam associação micorrízica (Souza *et al.* 2003), incluindo medicinais. Entre essas, destaca-se *L. ferrea* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz

var. *ferrea* (Gatai *et al.*, 2011), conhecida vulgarmente como pau-ferro (Lorenzi, 2002), leguminosa utilizada pela população por possuir considerável potencial medicinal (Almeida *et al.*, 2005). Plantas de *L. ferrea* possuem propriedades antiulcerogênica (Bacchi *et al.*, 1995), antiinflamatória, analgésica (Carvalho *et al.*, 1996), anticancerígena (Nakamura *et al.*, 2002) e antibacteriana (Sampaio *et al.*, 2009). Essas características estão associadas à presença de compostos secundários com potencial medicinal, como flavonoides, fenóis, taninos, entre outros (Gonzalez, 2005).

Uma das ferramentas tecnológicas para aumentar a produção de compostos de importância farmacológica é a utilização de FMA eficientes (Oliveira *et al.*, 2013), que podem favorecer o acúmulo de compostos primários e secundários em plantas medicinais (Ratti *et al.*, 2010; Cecarelli *et al.*, 2010; Dave & Tarafdar, 2011). Nesse sentido, o P é conhecido por modular a atuação dos FMA na biossíntese de moléculas (Pedone-Bonfim *et al.*, 2013). No entanto, como os resultados são conflitantes (Kapoor *et al.*, 2004; Toussaint *et al.*, 2007; Copetta *et al.*, 2006; Chaudhary *et al.*, 2008; Dave & Tarafdar, 2011; Zimare *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013; Ceccarelli *et al.*, 2010), são necessários estudos para definir o papel da simbiose na maximização da síntese de compostos bioativos em *L. ferrea*. Com isso busca-se estabelecer protocolo biotecnológico de baixo custo para produção de plantas com elevados teores de fitoquímicos nas folhas e, portanto, mais atrativas para a indústria de fitoterápicos. Além disso, *L. ferrea* é um modelo experimental de relevância, considerando que forma simbiose com FMA (Gatai *et al.*, 2011).

Neste estudo foi testada a hipótese de que a fertilização fosfatada aumenta a produção de compostos bioativos foliares, com os benefícios maximizados em plantas inoculadas com FMA. Assim, o objetivo deste trabalho foi determinar o efeito da inoculação micorrízica e da adubação fosfatada na produção de biomoléculas foliares em mudas de *L. ferrea*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Substrato

Foi utilizado latossolo de área de Caatinga nativa, coletado no município de Petrolina-PE, apresentando: matéria orgânica 2,48 g kg⁻¹; pH_(H₂O-1:2,5) 4,9; Condutividade Elétrica 3,16 ds m⁻¹; P 5,50 mg dm⁻³; K 0,18 cmol_c dm⁻³; Ca 2,5 cmol_c dm⁻³; Mg 3,5 cmol_c dm⁻³; Na 0,47 cmol_c dm⁻³ e Al 0,05 cmol_c dm⁻³. Partes do solo foram adubadas com 13, 31

e 55 mg kg⁻¹ de P₂O₅ e após análise apresentaram, respectivamente, 7,4; 7,9 e 8,4 mg dm⁻³ de P.

2.2 Material vegetal

Mudas de *L. ferrea* foram preparadas a partir de sementes (adquiridas em área de Caatinga), cuja dormência foi quebrada por meio de escarificação química com ácido sulfúrico por 20 minutos, seguida por lavagem com água corrente e água destilada (Biruel *et al.*, 2007). A germinação foi realizada em recipientes com capacidade para 50 mL, contendo vermiculita granulação média.

2.3 Inoculação micorrízica

Plântulas com duas folhas definitivas foram transferidas para potes com 1,2 Kg de solo (não esterilizado), com ou sem superfosfato simples, e na região das raízes foi depositado solo-inóculo contendo um mix de 300 glomerosporos (1:1:1) de *Claroideoglomus etunicatum* (W.N. Becker & Gerd.) C. Walker & A. Schüßler (UFPE 06) + *Gigaspora albida* N. C. Schenck & G. S. Sm. (UFPE 01) + *Acaulospora longula* Spain & N. C. Schenck (UFPE 21). O experimento foi mantido em telado experimental (Universidade de Pernambuco – Campus Petrolina, Brasil) por sete meses, em condições ambientais de temperatura e umidade relativa do ar variando entre 21,0 °C e 32,6 °C e 26,5 % e 76,7 %, respectivamente.

2.4 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial de 2 x 4: 2 tratamentos de inoculação (controle não inoculado e inoculado com mix de FMA) x 4 níveis de P (solo natural ou adubado com superfosfato simples), em 5 repetições.

2.5 Avaliações de crescimento vegetal e do FMA

Ao final do experimento foram avaliados: matéria seca da parte aérea (MSPA), clorofila total e colonização micorrízica. A matéria seca foi determinada quando o material vegetal atingiu peso constante em estufa (45 °C). O teor de clorofila foi estimado *in vivo* com auxílio do CFL1030 - Medidor Eletrônico de Teor de Clorofila clorofiLOG, e os dados expressos em Índice de Clorofila Falker (ICF). Raízes foram retiradas dos substratos, lavadas, clarificadas (KOH 10 %, p/v e H₂O₂ 10 %, v/v) e coradas com azul de

Trypan (0,05 %, p/v) (Phillips & Hayman, 1970) e o percentual de colonização micorrízica foi estimado pelo método de intersecção de quadrantes (Giovannetti & Mosse, 1980).

2.6 Avaliações bioquímicas e fitoquímicas:

2.6.1 Preparo do extrato etanólico

Foi preparado extrato vegetal macerando-se 500 mg de folhas secas picotadas em frascos âmbar (80 mL) com 20 mL de etanol (95 %), por 12 dias a 20 °C e ao abrigo da luz. Ao final desse período o extrato foi filtrado em gaze e re-filtrado em papel de filtro qualitativo e armazenado em frasco âmbar (- 4 °C) (Brito *et al.*, 2008). No extrato etanólico foram quantificados:

2.6.2 Carboidratos solúveis: a quantificação foi realizada em 50 µL do extrato etanólico, 95 µL de água destilada, 50 µL de fenol (80 %, p/v), seguindo agitação intensa em vórtex; em seguida foram adicionados 2 mL de ácido sulfúrico, deixando-se em repouso por 10 minutos a 22 °C, sendo conduzida a leitura em espectrofotômetro (490 nm). A curva-padrão foi preparada utilizando-se glicose (Dubois *et al.*, 1956).

2.6.3 Fenóis totais: foram adicionados 2 mL do extrato, 5 mL do Reagente de Folin-Ciocalteu (10 %, v/v) e 10 mL de carbonato de sódio (7,5 %, p/v) em balão volumétrico e o volume foi completado para 100 mL com água destilada. Após 30 minutos em repouso, foram realizadas leituras de absorbância (760 nm), adotando-se o ácido tânico como padrão (Monteiro *et al.*, 2006).

2.6.4 Taninos totais: Em frasco âmbar foram adicionados 3 mL do extrato e 0,5 g de caseína em pó e o material mantido em agitação constante (3 h/ 160 rpm/ 25 °C). Em seguida as amostras foram filtradas, completando-se o volume para 25 mL em balão volumétrico e a quantificação foi feita pelo método de Folin-Ciocalteu. A diferença entre essa leitura e aquela obtida na quantificação de fenóis totais equivale à concentração de taninos (Monteiro *et al.*, 2006).

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

2.6.6 Atividade antioxidante: em um tubo de ensaio rosqueado adicionou-se 0,1 mL do extrato e 3,9 mL do radical DPPH (0,06 mM), homogeneizando-se em seguida em vortex. Para preparo do controle, 0,1 mL da solução controle (álcool metílico, acetona e água) foi adicionado em um tubo de ensaio e 3,9 mL do radical DPPH. O álcool metílico foi usado como branco e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro (515 nm), após repouso de 30 minutos (Rufino *et al.*, 2007).

2.7 Análise estatística

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

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve interação significativa entre os fatores estudados (FMA e P) para a matéria seca da parte aérea e colonização micorrízica. Por outro lado, houve efeito apenas do P para a atividade antioxidante total, concentração de carboidratos solúveis e clorofila total. Para os demais parâmetros não houve efeito dos fatores testados (Tabela 1).

Tabela 1. Níveis de significância (valores de *p*) para as variáveis estudadas, levando em consideração os efeitos dos fatores isolados (P e FMA) e a interação FMA X P

Variável	P	FMA	P X FMA
Matéria seca da parte aérea	**	ns	**
Colonização micorrízica	**	**	**
Concentração de fenóis totais	ns	ns	ns
Concentração de flavonóides totais	ns	ns	ns
Concentração de taninos totais	ns	ns	ns
Atividade antioxidante	**	ns	ns
Concentração de carboidratos solúveis	**	ns	ns
Clorofila total	*	ns	ns

*($p < 0,05$); **($p < 0,01$); ns (não significativo).

Em todos os níveis de P os tratamentos inoculados com FMA apresentaram maior colonização das raízes em relação ao tratamento controle, (Tabela 2). De modo geral, menor colonização foi registrada nas plantas cultivadas nos níveis intermediários de P (13

e 31 mg P dm⁻³) (Tabela 2). Cavalcante *et al.* (2002) registraram que os fungos inoculados foram mais efetivos em colonizar mudas de *Passiflora edulis* em solo não esterilizado e adubado com P, em relação aos FMA nativos.

Nas mudas não inoculadas, o benefício da adubação fosfatada no acúmulo de MSPA foi observado nos níveis mais altos de P (31 e 55 mg P dm⁻³) (Tabela 2). Por outro lado, a inoculação micorrízica favoreceu a produção de MSPA no solo sem fertilização (5,50 mg P dm⁻³), resultando em aumento de 10,6 % em relação ao controle (Tabela 2). Registros de benefícios da inoculação micorrízica em solos sem fertilização fosfatada têm sido documentados em *Menta arvensis* L. (Freitas *et al.*, 2004) e em *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan (Pedone-Bonfim *et al.*, 2013).

Tabela 2. Colonização micorrízica e matéria seca da parte aérea (MSPA) em mudas de pau-ferro cultivadas em telado experimental, em solo com quatro níveis de P e inoculadas ou não com fungos micorrízicos arbusculares, sete meses após a inoculação

Tratamentos de inoculação	Níveis de P (mg dm ⁻³ solo)			
	5,50	13	31	55
Colonização (%)				
Controle	56,21 aB	46,21 bB	35,18 cB	55,71 aB
FMA	66,28 aA	64,60 abA	54,48 cA	61,36 bA
MSPA (g)				
Controle	1,60 bB	1,71 bA	2,34 aA	2,37 aA
FMA	1,77 bA	1,85 bA	2,26 aA	1,99 bB

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

O potencial antioxidante das folhas de pau-ferro cultivadas com 31 mg dm⁻³ foi menor do que aquelas cultivadas nos menores níveis de P (Tabela 3), independentemente da inoculação micorrízica. Mesmo o fósforo sendo um macronutriente importante nas rotas anabólicas de compostos que conferem potencial antioxidante aos vegetais (Heldt, 2005), esse benefício não foi documentado nesse estudo. É provável que outros nutrientes estejam envolvidos na biossíntese de moléculas com potencial de captura de radicais livres. Nesse sentido, estudos adicionais devem ser delineados para comprovar tal hipótese.

Independentemente da inoculação com FMA, houve aumento de carboidratos solúveis nas folhas das mudas cultivadas em solo fertilizado nos níveis intermediários de P

(Tabela 3); achados similares foram documentados por Pedone-Bonfim *et al.* (2013) com a leguminosa *A. colubrina*.

Houve aumento na produção de clorofila em plantas adubadas com 31 mg dm^{-3} P_2O_5 em relação ao menor nível de P testado (Tabela 3), independentemente do tratamento de inoculação. Resultados similares foram obtidos por Oliveira *et al.* (2014) em mudas de *Passiflora alata* adubadas com vermicomposto. Como registrado por Baslam e Goicoechea (2012), a associação micorrízica pode aumentar a concentração de clorofilas totais, resultando em aumento das taxas fotossintéticas, beneficiando o crescimento da planta hospedeira, o desenvolvimento e a funcionalidade da simbiose e direcionando a biossíntese de carboidratos (Shing *et al.*, 2010), mas o mesmo não ocorreu no presente estudo (Tabela 1).

Tabela 3. Concentração de clorofila total (ICF-Índice de Clorofila Falker), carboidratos solúveis (mg g planta^{-1}) e atividade antioxidante (mg planta/mg DPPH) foliares em mudas de pau-ferro cultivadas em telado experimental, em solo com ou sem adição de P, independentemente dos fungos micorrízicos arbusculares, sete meses após a inoculação

Variáveis	Níveis de P (mg dm^{-3} solo)			
	5,50	13	31	55
Atividade antioxidante	0,38 a	0,23 a	0,19 b	0,30 ab
Carboidratos solúveis	0,17 b	0,22 a	0,22 a	0,16 b
Clorofila total	28,91 b	30,68 ab	33,71 a	32,78 ab

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

Também há relatos do benefício da micorrização no aumento da produção de compostos secundários vegetais, com o aumento relacionado a mecanismos nutricionais (Kapoor *et al.* 2002) e não nutricionais (Mandal *et al.* 2013). No entanto, não se registrou incremento na produção de fenóis, flavonoides e taninos totais nas mudas de pau-ferro micorrizadas (Tabela 4). Resultados contrários foram obtidos com a leguminosa *A. colubrina* micorrizada e cultivada em solo adubado com P (Pedone-Bonfim *et al.*, 2013). Isso confirma a necessidade de estudos para definir a eficiência de FMA na produção de compostos bioativos vegetais, devendo-se evitar generalizações sobre o comportamento das famílias vegetais em relação ao acúmulo desses compostos.

Tabela 4. Concentração fenóis totais, flavonoides totais e taninos foliares em mudas de pau-ferro inoculados com FMA cultivadas em telado experimental, em solo com ou sem adição de P, sete meses após a inoculação

Tratamento de inoculação	Níveis de P (mg dm ⁻³ solo)			
	5,50	13	31	55
Fenóis totais*				
Controle	4,70 aA	3,38 aA	3,23 aA	3,71 aA
FMA	3,62 aA	3,23 aA	2,83 aA	3,12 aA
Flavonoides totais*				
Controle	69,41 aA	68,02 aA	74,38 aA	75,66 aA
FMA	63,40 aA	75,81 aA	68,57 aA	72,79 aA
Taninos totais*				
Controle	4,60 aA	3,28 aA	3,14 aA	3,60 aA
FMA	3,52 aA	3,24 aA	2,70 aA	3,03 aA

* mg g planta⁻¹

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

Nas plantas não micorrizadas de *L. ferrea* houve ajuste quadrático para colonização ($y = 32,6 + 51,3x - 33,1x^2$; $R^2 = 0,99$ e $p < 0,01$), carboidratos ($y = 0,12 + 0,07x - 0,01x^2$; $R^2 = 0,95$ e $p < 0,05$) e atividade antioxidante ($y = 0,64 - 0,32x + 0,06x^2$; $R^2 = 0,87$ e $p < 0,01$). Por outro lado, nas plantas inoculadas registrou-se ajuste quadrático para colonização micorrízica ($y = 34,05 + 57,7x - 29,7x^2$; $R^2 = 0,99$ e $p < 0,01$) e MSPA ($y = 3,44 - 2,70x + 1,33x^2$; $R^2 = 0,99$ e $p < 0,01$); para os demais parâmetros os ajustes não foram significativos. Resultados similares de ajuste quadrático, para a colonização micorrízica e para o conteúdo de carboidratos solúveis foram documentados por Oliveira (2014) em *Passiflora alata*, cultivadas em diferentes níveis de vermicomposto.

A hipótese inicial do trabalho não foi confirmada, indicando que a aplicação conjunta de P e de FMA não incrementa a biossíntese de biomoléculas com potencial medicinal em folhas de pau-ferro. Estudos futuros devem incluir outros nutrientes, considerando que as abordagens nutricionais para incremento da produção de compostos bioativos em plantas micorrizadas focam apenas o P (Toussaint, 2007).

4. CONCLUSÕES

- O crescimento de mudas de pau-ferro é maximizado pela inoculação com FMA, dispensando a adição fosfatada.
- O uso combinado da inoculação com FMA e adição de P, nos níveis testados, não incrementa a produção de compostos secundários foliares em mudas de *L. ferrea*.

4. PRODUÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS FOLIARES EM MUDAS MICORRIZADAS DE PAU-FERRO [*Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz var. *ferrea*]²

² Trabalho submetido para publicação no Journal of Medicinal Plant Research

4. PRODUÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS FOLIARES EM MUDAS MICORRIZADAS DE PAU-FERRO [*Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz var. *ferrea*]

RESUMO

Libidibia ferrea é uma planta nativa da Caatinga utilizada na medicina tradicional devido à presença de compostos bioativos. Em algumas plantas, essas biomoléculas têm a produção maximizada pela inoculação com fungos micorrízicos arbusculares (FMA). Este estudo teve como objetivo determinar e selecionar FMA eficientes em otimizar o crescimento e a produção de compostos bioativos em *L. ferrea*. Plântulas com duas folhas definitivas foram inoculadas ou não com solo-inóculo fornecendo 200 glomerosporos de *Claroideoglomus etunicatum*, *Gigaspora albida* e *Acaulospora longula* e cultivadas em solo não esterilizado e adubado com 5 % de vermicomposto. O experimento foi mantido em telado por sete meses, sendo avaliados: altura, número de folhas, diâmetro do caule, matéria seca da parte aérea e das raízes, colonização micorrízica, clorofilas (total, *a* e *b*) e concentrações de carboidratos solúveis, proteínas, taninos, fenóis e flavonóides totais. A micorrização com *G. albida* favoreceu a produção de mudas com maior diâmetro do caule e com maior acúmulo foliar de clorofila *a*, proteínas totais e flavonoides totais. O sistema biotecnológico empregando *G. albida* pode ser alternativa para produção de mudas de *L. ferrea* com maiores teores de flavonoides totais.

Palavras chave: Glomeromycota, flavonoides, *Libidibia ferrea*, semi-árido.

1. INTRODUÇÃO

Árvore nativa da Caatinga, *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz var. *ferrea* (= *Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul.) (Fabaceae), também conhecida como pau-ferro ou jucá, tem diversas utilidades na restauração florestal de áreas degradadas e na recuperação de solos (Maia, 2004). É utilizada na medicina tradicional contra várias doenças pelas atividades antiulcerogênica, antiinflamatória, analgésica, hipoglicemiante, anticancerígeno e antimicrobiana (Bacchi *et al.*, 1995; Nakamura *et al.*, 2002; Gonzalez, 2005; Sampaio *et al.*, 2009). Tais propriedades terapêuticas estão relacionadas à presença de compostos secundários como flavonóides, fenóis, taninos, saponinas, cumarina, antraderivados e quinonas (Gonzalez, 2005; Almeida *et al.*, 2005), presentes nas folhas, frutos, casca e raiz da planta (Maia, 2004).

Os FMA formam simbiose mutualística com a maioria das plantas, havendo troca de nutrientes entre os parceiros. A micorrização é benéfica para a planta hospedeira, estimulando o crescimento de mudas (Cavalcante *et al.*, 2001), acúmulo de nutrientes na parte aérea, e proteção contra patógenos (Smith & Read, 2008). Estudos recentes têm comprovado que a simbiose micorrízica pode ser alternativa na maximização da produção de compostos químicos com potencial medicinal (Ratti *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2013), com a fitomassa produzida concentrando mais princípios ativos (Chaudhary *et al.*, 2008; Ceccarelli *et al.*, 2010; Zubek *et al.*, 2012).

Embora a produção de fitoquímicos por plantas de pau-ferro seja comprovada e existam registros da associação com FMA (Carneiro *et al.*, 1998; Gattai *et al.*, 2011), não se conhece o potencial de FMA em incrementar a produção dessas biomoléculas. Neste trabalho foi testada a hipótese de que os FMA aumentam a concentração de fitoquímicos foliares em *L. ferrea*, com os benefícios dependendo do isolado de FMA testado e do composto bioativo considerado. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a produção de compostos bioativos foliares em mudas de pau-ferro inoculadas com FMA.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Telado Experimental da Universidade de Pernambuco – *Campus* Petrolina, localizado no município de Petrolina – PE (Nordeste do Brasil), entre agosto de 2011 e março de 2012. De acordo com a classificação de Köppen o clima na região é BswH [Clima Semi-Árido, com altas temperaturas (> 22 °C) e escassas chuvas no inverno (< 250 mm)].

2.1 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos de inoculação e cinco repetições, utilizando solo não esterilizado: controle (presença de FMA nativos), inoculado com *Claroideoglossum etunicatum* (W.N. Becker & Gerd.) C. Walker & A. Schüßler (UFPE 06), inoculado com *Gigaspora albida* N. C. Schenck & G. S. Sm. (UFPE 01) e inoculado com *Acaulospora longula* Spain & N. C. Schenck (UFPE 21).

2.2 Material vegetal e solo

As sementes de pau-ferro (coletadas na Caatinga) foram escarificadas quimicamente com ácido sulfúrico (98 %) durante 20 minutos, para quebra da dormência (Biruel *et al.*, 2007), lavadas com água corrente e depois com água destilada e em seguida colocadas para germinar em recipientes (50 mL) contendo vermiculita granulação média.

Plântulas com duas folhas definitivas foram transferidas para potes com 1,2 kg de substrato composto por solo (não esterilizado) coletado em área de Caatinga nativa misturado com 5 % de vermicomposto, apresentando: matéria orgânica 3,21 g kg⁻¹; pH 5,2; C.E. 3,53 ds m⁻¹; P 12,68 mg dm⁻³; K 0,26 cmol_c dm⁻³; Ca 2,7 cmol_c dm⁻³; Mg 1,8 cmol_c dm⁻³; Na 0,49 cmol_c dm⁻³; Al 0,05 cmol_c dm⁻³. As plântulas foram inoculadas com solo-inóculo contendo 200 glomerosporos + hifas + raízes colonizadas de cada FMA testado. O experimento foi mantido em telado por 225 dias, em condições ambientais de temperatura (T_{mín}: 24,97 °C e T_{máx}: 38,57 °C) e umidade relativa do ar (UR_{mín}: 33,09 %; UR_{máx}: 84,50 %). As plantas foram irrigadas diariamente.

2.3 Parâmetros de crescimento e colonização micorrízica

Após sete meses, o experimento foi colhido e avaliados: altura, número de folhas, diâmetro do caule, matéria seca da parte aérea e das raízes e colonização micorrízica. Para determinação da matéria seca, o material vegetal foi mantido em estufa (45 °C) até atingir peso constante. O teor de clorofila foi estimado *in vivo* utilizando Medidor Eletrônico de Teor de Clorofila clorofiLOG - CFL1030 e expresso em ICF (Índice de Clorofila Falker[®]) (Falker Automação Agrícola Indústria Brasileira, made in Brazil). A colonização micorrízica foi avaliada pelo método de interseção dos quadrantes (Giovannetti & Mosse, 1980) após diafanização de raízes com KOH (10 %), H₂O₂ (10 %) e coloração com azul de Trypan (0,05 %) (Phillips & Hayman, 1970).

2.4 Reagentes

Os seguintes produtos químicos foram usados: ácido acético glacial, ácido sulfúrico, álcool etílico, álcool metílico, e carbonado de sódio de F Maia (Cotia, SP, Brasil); albumina bovina sérica e hidrato de rutina da Sigma-Aldrich (São Paulo, SP, Brasil); ácido tânico, caseína, cloreto de alumínio, Azul de Coomassie G-250, glicose,

ácido fosfórico, fenol, piridina da Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil) e reagente de Folin–Ciocalteu da Merck (Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

2.5 Preparação do extrato vegetal

Após secagem em estufa, 500 mg de folhas foram picotadas e transferidas para frascos âmbar (80 mL), sendo adicionados 20 mL de etanol (95 %) (F Maia[®] Cotia, SP, Brasil). Após maceração por 12 dias (25 °C) ao abrigo da luz, o extrato foi filtrado em gaze e re-filtrado em papel de filtro qualitativo e armazenado em frasco âmbar (- 4 °C) (Brito *et al.*, 2008). No extrato foram quantificados: proteínas totais, carboidratos solúveis, fenóis, flavonóides e taninos totais, como descrito abaixo:

2.5.1 Proteínas totais

As proteínas totais foram determinadas pelo método de Bradford (1976) (modificado). Em tubo de ensaio foram adicionados 50 µL do extrato etanólico e 2,5 mL do Reagente de Bradford, seguindo-se a agitação em vórtex. Após cinco minutos, as leituras foram feitas em espectrofotômetro (595 nm), utilizando o BSA (albumina bovina sérica) como padrão.

2.5.2 Carboidratos solúveis

A quantificação foi feita pelo método de Dubois *et al.* (1956) modificado. Em um tubo de ensaio rosqueável foram colocados 50 µL do extrato etanólico, 95 µL de água destilada, 50 µL de fenol (80 %, p/v), procedendo-se agitação intensa em vórtex. Posteriormente, foram adicionados 2 mL de ácido sulfúrico (98 %) e após incubação (10 minutos / 22 °C) foi conduzida a leitura em espectrofotômetro (490 nm). Utilizou-se glicose para preparo da curva-padrão.

2.5.3 Fenóis totais

Os fenóis totais foram determinados de acordo com a metodologia proposta por Monteiro *et al.* (2006). Em balão volumétrico (100 mL) foram adicionados 2 mL do extrato, 5 mL do Reagente de Folin-Ciocalteu (10 %, v/v), 10 mL de carbonato de sódio (7,5 %, p/v) e o volume foi completado para 100 mL com água destilada. Após 30 minutos em repouso, foram realizadas leituras de absorbância (760 nm). Adotou-se o ácido tânico como padrão.

2.5.4 Taninos totais

Para quantificar taninos totais foi utilizado o método da precipitação de caseína, descrito em Monteiro *et al.* (2006). Em um frasco âmbar foram adicionados 3 mL do extrato e 0,5 g de caseína em pó, com posterior agitação (160 rpm) por 3 h. As amostras foram filtradas, sendo o volume completado para 25 mL em balão volumétrico e a quantificação realizada pelo método de Folin-Ciocalteu. A concentração de taninos foi obtida pela diferença entre o valor encontrado nessa leitura e aquele obtido na quantificação de fenóis totais.

2.5.5 Flavonoides totais

Os teores de flavonoides foram estimados a partir da metodologia de Araújo *et al.* (2008), com algumas modificações. Em um balão volumétrico colocou-se 1 mL do extrato etanólico, 0,6 mL de ácido acético glacial, 10 mL de solução piridina:metanol (2:8 v/v) e 2,5 mL de solução metanólica de cloreto de alumínio (5 %, p/v), com o volume final de 25 mL completado com água destilada. Após 30 minutos em repouso, a absorbância foi medida (420 nm), utilizando-se rotina para preparo da curva-padrão.

2.6 Análise dos dados

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

3. RESULTADOS

Benefício da micorrização foi registrado para o diâmetro do caule e quando as mudas estavam associadas com *G. albida*. (Tabela 1). Por outro lado, o efeito da inoculação micorrízica foi mais evidente em outros parâmetros, como os teores de clorofila e o acúmulo de biomoléculas (Tabela 2).

A colonização das raízes de *L. ferrea* não diferiu estatisticamente entre os tratamentos inoculados, mas foi superior ao controle (Tabela 2).

Tabela 1. Altura, matéria seca da parte aérea, matéria seca da parte subterrânea, número de folhas e diâmetro do caule de mudas de pau-ferro, associadas ou não a fungos micorrízicos arbusculares (FMA), sete meses após a inoculação, em telado experimental

Variável	Tratamentos de inoculação			
	Controle	<i>Gigaspora albida</i>	<i>Claroideoglomus etunicatum</i>	<i>Acaulospora longula</i>
Altura (cm)	31,98 a	32,36 a	27,86 a	32,46 a
Matéria seca da parte aérea (g)	2,17 a	2,28 a	1,95 a	2,33 a
Matéria seca da parte subterrânea (g)	2,36 a	1,89 a	2,03 a	1,89 a
Número de folhas	10,00 a	10,80 a	8,80 a	10,80 a
Diâmetro do caule (mm)	3,42 b	3,81 a	3,39 b	3,57 ab

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

A inoculação aumentou a produção de clorofila *a* (11,4 %) nas folhas de *L. ferrea*, com aumento na concentração de proteínas totais (51,1 %) em mudas micorrizadas por *G. albida* em relação ao tratamento não inoculado (Tabela 2). Por outro lado, a concentração de carboidratos solúveis embora não tenha diferido estatisticamente entre os tratamentos, foi incrementada pela inoculação com *G. albida* (Tabela 2).

Tabela 2. Concentração de proteínas totais, carboidratos solúveis, fenóis totais, flavonoides totais, taninos totais, clorofila total, clorofilas *a* e *b* foliares em mudas de pau-ferro e colonização micorrízica, associadas ou não a fungos micorrízicos arbusculares (FMA), sete meses após a inoculação, em telado experimental

Variável	Tratamentos de inoculação			
	Controle	<i>Gigaspora albida</i>	<i>Claroideoglomus etunicatum</i>	<i>Acaulospora longula</i>
Proteínas totais*	66,39 b	100,33 a	66,04 b	86,24 ab
Carboidratos solúveis*	0,22 ab	0,32 a	0,21 b	0,23 ab
Fenóis totais*	2,74 a	3,41 a	2,74 a	2,98 a
Flavonóides totais*	0,92 b	1,27 a	0,99 b	1,11 ab
Taninos totais*	2,70 a	2,98 a	2,71 a	2,94 a
Clorofila total**	25,37 b	44,21 ab	39,27 ab	45,35 a
Clorofila a**	3,42 b	3,81 a	3,39 b	3,57 ab
Clorofila b**	9,93 ab	12,52 a	7,84 b	10,31 ab
Colonização micorrízica (%)	6,20 b	41,99 a	53,45 a	39,68 a

* (mg g planta⁻¹); ** (ICF – Índice de Clorofila Falker).

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

A concentração de fenóis foliares não variou com os tratamentos de inoculação, mas a inoculação com *G. albida* incrementou a produção de flavonóides foliares (38 %) em mudas de pau ferro (Tabela 2).

4. DISCUSSÃO

Benefícios da micorrização sobre o crescimento vegetal, como o registrado para o diâmetro do caule de mudas de *L. ferrea* inoculadas com *G. albida*, têm sido relatados em outras plantas (Cavalcante *et al.*, 2001; Copetta *et al.*, 2006). Caldeira *et al.* (1997), não encontraram benefícios da simbiose micorrízica em mudas da leguminosa arbórea *Copaifera martii* L. No entanto, a micorrização otimizou o crescimento de *Ocimum basilicum* L. (Rasouli-Sadaghiani *et al.*, 2010) e de *Gloriosa superba* L. (Yadav *et al.* 2013). Para definição da eficiência micorrízica é importante considerar diversos parâmetros, como o crescimento da planta e a concentração de compostos bioquímicos e fitoquímicos que traduzem a fisiologia do fotobionte (Huang *et al.*, 2011; Ratti *et al.*, 2010, Zubek *et al.*, 2010).

Maior colonização micorrízica nos tratamentos inoculados com FMA do que no controle indicam que os fungos utilizados foram hábeis em competir com os fungos nativos presentes no tratamento controle. Contrariamente, Zubek *et al.* (2010) verificaram que fungos nativos produziram mais colonização no córtex radicular de *Inula ensifolia* L. do que os tratamentos inoculados.

As mudas de *L. ferrea* inoculadas com *G. albida* tiveram aumento na concentração de pigmentos e de proteínas nas folhas. Similarmente, em *Catharanthus roseus* L.G. Don, *Glomus mosseae* favoreceu aumento na concentração de clorofila total e clorofila *a*, enquanto *G. fasciculatum* contribuiu para a concentração de clorofila *b*, em relação ao controle (Ratti *et al.*, 2010). Benefícios na taxa fotossintética podem ser devido à melhor nutrição propiciada pela micorrização (Giri *et al.*, 2003). A eficiência de FMA em aumentar a concentração de proteínas em mudas de *L. ferrea* também foi documentada em outras plantas medicinais, como em *C. roseus* (Ratti *et al.*, 2010), em *Echinacea purpurea* L. Moench (Araim *et al.*, 2009) e em *Camellia sinensis* L. O. Kuntze (Singh *et al.* 2010). A atividade dos arbúsculos pode otimizar as vias biossintéticas das mitocôndrias, especificamente o ciclo de Krebs (Lohse *et al.*, 2005), aumentando a taxa fotossintética (Wright *et al.*, 1998), o que favorece o anabolismo vegetal.

Embora a concentração de fenóis foliares e taninos em pau-ferro não tenha variado entre os tratamentos de inoculação, em outras situações esse benefício foi documentado (Cecarelli *et al.*, 2010; Toussaint *et al.*, 2007; Rajeshkumar *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2012).

Estudos mostram que em plantas medicinais a biossíntese de compostos fenólicos pode ser favorecida por fatores bióticos, entre os quais a micorrização (Khaosaad *et al.*, 2008; Toussaint *et al.*, 2007; Rosa-Mera *et al.*, 2011; Zimare *et al.*, 2013). Ensaio para determinação da eficiência micorrízica devem ser conduzidos antes da recomendação da tecnologia micorrízica para incremento na produção de compostos fenólicos, considerando que nem todas as espécies vegetais respondem positivamente à inoculação com FMA.

A inoculação com *G. albida* aumentou a produção de flavonoides foliares em mudas de pau-ferro, como também foi observado por Khaosaad *et al.* (2008) em *Trifolium pratense* L. micorrizado. O fato de em mudas de pau-ferro, os níveis de produção de flavonóides totais terem sido elevados, em comparação ao obtido em outros vegetais, como *Salvia officinalis* com 0,022 mg flavonóides g planta⁻¹ (Geneva *et al.*, 2009), indica que folhas de pau-ferro micorrizadas podem servir como fonte de flavonoides, compostos importantes na indústria farmacêutica (Zuaninazzi & Montanha, 2003). Os benefícios registrados na produção de flavonoides foliares em pau-ferro podem ser atribuídos ao estado nutricional das plantas, à resposta de defesa e às alterações no perfil hormonal (Larose *et al.*, 2002; Kapoor *et al.*, 2002a; Copetta *et al.*, 2006; Toussaint *et al.*, 2007). Também contribui no aumento de atividade das vias do ácido chiquímico e do acetato, rotas precursoras na biossíntese desses compostos (Zuaninazzi & Montanha, 2003). Ressalte-se que o aumento na produção de flavonoides foliares ocorreu apenas em mudas associadas com *G. albida*, confirmando que os efeitos da micorrização dependem do isolado de FMA.

Diante dos resultados, comprovou-se a hipótese inicial do trabalho com a micorrização interferindo na produção de compostos com potencial medicinal, e as respostas variando em função do isolado de FMA testado. Naturalmente os benefícios variam de acordo com o composto secundário considerado. Nesse contexto, o emprego da tecnologia micorrízica pode ser alternativa promissora para o cultivo de mudas de *L. ferrea* com maior incremento na produção de compostos bioativos com propriedades medicinais, com destaque para os flavonoides totais e as proteínas totais foliares. Cultivos dessa leguminosa podem ser instalados e servir como cultura alternativa para pequenos produtores locais, evitando o uso extrativista. Testes em campo e análises com HPLC devem ser conduzidos para validar a tecnologia e a caracterização de flavonoides específicos, produzidos por mudas de *L. ferrea* micorrizadas.

4. CONCLUSÕES

- A inoculação com FMA contribui para o crescimento e otimiza a fisiologia de mudas de *L. ferrea*, porém os benefícios dependem do isolado testado.
- O sistema biotecnológico empregando *G. albida* é alternativa para produção de mudas de *L. ferrea*, com teores de proteínas e clorofila *a* superiores aos obtidos em mudas não micorrizadas.
- A simbiose pau-ferro e *G. albida* pode ser utilizada para otimizar a produção de flavonoides foliares com propriedades medicinais em *L. ferrea*.

5. FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES AUMENTAM A PRODUÇÃO DE ÁCIDO GÁLICO EM FOLHAS DE *Libidibia ferrea* EM CAMPO³

³Trabalho a ser submetido para publicação na Industrial Crops and Products.

5. FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES AUMENTAM A PRODUÇÃO DE ÁCIDO GÁLICO EM FOLHAS DE *Libidibia ferrea* EM CAMPO

RESUMO

Fungos micorrízicos arbusculares (FMA) induzem aumento de fitoquímicos de interesse farmacêutico em algumas plantas nativas do semi-árido brasileiro. Neste trabalho, investigou-se se a inoculação micorrízica incrementava a produção de compostos bioativos, principalmente ácido gálico, em plantas de pau-ferro estabelecidas em campo. Mudanças foram inoculadas com *Claroideoglomus etunicatum*, *Acaulospora longula* *Gigapora albida* ou não inoculadas (controle) e, após sete meses do transplante, avaliadas quanto a parâmetros de crescimento das plantas, clorofila, fenóis, taninos, ácido gálico, colonização micorrízica e densidade de esporos de FMA. Plantas inoculadas com *C. etunicatum* tiveram concentrações de ácido gálico 21 % maiores que as do controle, enquanto plantas associadas a *G. albida* tiveram maiores concentrações de clorofila total. A tecnologia micorrízica empregando *C. etunicatum* pode constituir alternativa para incrementar a produção de ácido gálico em plantas de pau-ferro estabelecidas em campo.

Palavras-chave: Glomeromycota, compostos secundários, pau-ferro, caatinga, semi-árido.

1. INTRODUÇÃO

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA), microorganismos do filo Glomeromycota, associam-se de forma simbiótica à maioria das plantas. A associação beneficia a planta porque os FMA aumentam a captação de nutrientes em solos pobres, em especial o P (Yao *et al.*, 2008), e amenizam o estresse causado por fatores bióticos e abióticos (Smith e Read, 2008). Com isso, há estímulo no crescimento de mudas economicamente importantes (Tristão *et al.*, 2006), inclusive de plantas medicinais do semi-árido (Oliveira *et al.*, 2013), que podem apresentar maior concentração de metabólitos primários e secundários (Pedone-Bonfim *et al.*, 2013; Mandal *et al.*, 2013).

A biotecnologia micorrízica pode ser uma alternativa para otimizar a produção de compostos secundários em algumas espécies vegetais: óleos essenciais em *Anethum*

graveolens L., *Mentha arvensis* L., *Ocimum basilicum* L. e *Salvia officinalis* L. (Kapoor *et al.*, 2002a; Copetta *et al.*, 2006; Geneva *et al.*, 2010; Chaudhary *et al.*, 2008), ácido cafeíco em *O. basilicum* (Toussaint *et al.*, 2007); artemisinina em *Artemisia annua* L. (Chaudary *et al.*, 2008); e alcalóides em *Castanospermum australe* A. cunn. & C. Fraser e *Catharanthus roseus* L.G. Don (Abu-Zeyad *et al.*, 1999; Ratti *et al.*, 2010). Porém não há relatos para o ácido gálico, importante composto que pertence ao grupo dos fenólicos e possui propriedades antibacterianas e antioxidantes (Chanwitheesuk *et al.*, 2007; Broinizi *et al.*, 2007).

No bioma Caatinga, típico do semi-árido brasileiro, diversas espécies de plantas medicinais, com propriedades terapêuticas, beneficiam a população (Agra *et al.*, 2007). Dentre essas, o pau-ferro [*Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz var. *ferrea*], espécie da família *Fabaceae*, comprovadamente micotrófica (Gattai *et al.*, 2011), possui propriedades terapêuticas, com atividades antiulcerogênica, antiinflamatória, analgésica, hipoglicemiante, anticancerígena, anti-histaminica, antimicrobiana, anticoagulante, larvicida contra o *Aedes aegypti* e cicatrizante (Bacchi *et al.*, 1995; Carvalho *et al.*, 1996; Gonzalez, 2005; Sampaio *et al.*, 2009; Cavalheiro *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2010). Tais propriedades estão relacionadas à presença de compostos secundários (Ueda *et al.*, 2001; Gonzalez *et al.*, 2005; Souza *et al.*, 2006; Nozaki *et al.*, 2007), com destaque para o ácido gálico (Nakamura *et al.*, 2002). Alternativas para incremento da produção de ácido gálico e de outros compostos em folhas de pau-ferro são, portanto, de interesse para a indústria fitoterápica.

Considerando que não há registro do plantio de espécies arbóreas medicinais micorrizadas em campo, com a finalidade de aumentar a produção de compostos secundários, sobretudo o ácido gálico, neste trabalho foi testada a hipótese de que a inoculação com FMA de mudas de *L. ferrea* estabelecidas em campo aumenta a produção de ácido gálico, porém as respostas variam com o FMA utilizado. O objetivo foi determinar se a inoculação micorrízica incrementa a produção de ácido gálico em plantas de pau-ferro micorrizadas e estabelecidas em campo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Um experimento foi estabelecido no Campo Experimental da Universidade de Pernambuco, no *Campus* de Petrolina. A região tem clima tipo Bswb, segundo classificação de Köppen. No período de realização do experimento (fevereiro a setembro

de 2013), as médias da temperatura máxima e mínima foram 33,2 °C e 21,7 °C, respectivamente, a média da umidade relativa do ar foi 55,2 % e o índice pluviométrico foi 9,5 mm. O experimento constou de quatro tratamentos, em blocos ao acaso, com seis repetições: inoculação de mudas de *L. ferrea* com os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) *Claroideoglomus etunicatum* (W.N. Becker & Gerd.) C. Walker & A. Schüßler (UFPE 06), *Gigaspora albida* N. C. Schenck & G. S. Sm. (UFPE 01) ou *Acaulospora longula* Spain & N. C. Schenck (UFPE 21) e não inoculadas (controle).

Sementes de pau-ferro coletadas em área de Caatinga foram tratadas com ácido sulfúrico concentrado durante 20 minutos para quebra da dormência (Biruel *et al.*, 2007), lavadas com água corrente e água destilada e colocadas para germinar em recipientes de 50 mL contendo vermiculita (granulação média). Quando as plântulas tinham quatro folhas definitivas foram transferidas para sacos de polietileno contendo 1,2 kg de substrato composto por solo (não esterilizado) + 5 % de vermicomposto e inoculadas ou não com solo-inóculo contendo 200 esporos de cada FMA.

O solo foi coletado em área de Caatinga nativa (densidade de 96 glomerosporos 100 g solo⁻¹), em Petrolina, Pernambuco. Foram identificadas no solo as espécies de FMA: *Scutellospora* sp1, *Glomus macrocarpum* Tul. & Tul., *Apendicispora ependicula* Spain, Sierved & N. C. Shenck, *Acaulospora* sp1, *Glomus* sp1 e *Acaulospora scrobiculata* Trappe (Lima, 2014). O solo misturado com o vermicomposto apresentou as seguintes características químicas: P, 12,68 mg dm⁻³; K, 0,26 cmol_cdm⁻³; Ca, 2,7 cmol_cdm⁻³; Mg, 1,8 cmol_cdm⁻³; Na, 0,49 cmol_cdm⁻³; Al, 0,05 cmol_cdm⁻³; matéria orgânica, 3,21 g kg⁻¹; e pH_{H2O} (1:2,5) 5,2.

Os inóculos de *Claroideoglomus etunicatum*, *Gigaspora albida* e *Acaulospora longula* foram obtidos da UFPE, multiplicados em solo + 10 % de vermicomposto, utilizando painço (*Panicum miliaceum* L.) como hospedeiro, e armazenados por 22 meses a 4 °C até o momento da utilização.

Após 225 dias em telado, as mudas foram transplantadas para o campo experimental. Nesta ocasião, elas apresentavam, em média, 72 cm de altura, 14 folhas, 5,1 mm de diâmetro do caule e concentração foliar média de clorofila total de 50,07 ICF (Índice de Clorofila Falker). No campo, as mudas foram colocadas em covas de 0,4 x 0,4 x 0,4 m³, com espaçamento de 5 m uma da seguinte, em fileiras com quatro plantas, distantes 5 m uma fileira de outra, e sendo quatro fileiras por parcela, resultando em densidade de 400 plantas ha⁻¹.

Antes do transplântio, 10 pontos foram marcados na área experimental, caminhando em zig-zag, e neles coletadas amostras de solo, nas camadas de 0 a 20 cm e de 20 a 40 cm, que foram misturadas formando duas amostras compostas, analisadas quanto às características químicas (Tabela 1). A densidade média de esporos de FMA nas amostras foi de 54 esporos 100 g solo^{-1} . A área foi arada, gradeada e coveada, sendo depositados em cada cova 5 litros de vermicomposto e 150 g de superfosfato simples. O vermicomposto utilizado apresentava: P, $4,8\text{ g kg}^{-1}$; C, 279 g kg^{-1} ; N, $32,3\text{ g kg}^{-1}$; K, $0,8\text{ g kg}^{-1}$; Ca, $34,2\text{ g kg}^{-1}$; pH ($\text{H}_2\text{O}-1:2,5$) 6,65; Mg, $4,14\text{ g kg}^{-1}$; Cu, 36 mg kg^{-1} ; e Mn, 823 mg kg^{-1} .

Tabela 1. Caracterização química do solo da área experimental nas profundidades de 0-20 e 20-40 cm

	P	K	Ca	Mg	Na	Al	M.O.	pH	C.E.
Solo	mg/dm^3			$\text{cmol}_c\text{ dm}^{-3}$			g/kg	$\text{H}_2\text{O (1:2,5)}$	mS/c m
0-20	10,38	0,24	1,4	0,5	0,03	0,00	0,41	6,2	0,21
20- 40	9,61	0,14	0,7	0,3	0,01	0,00	0,23	5,6	0,21

M.O.= matéria orgânica; C.E.= condutividade elétrica.

Depois do transplântio, a área foi irrigada por gotejamento semi-automático por 15 minutos em dias alternados ($8,4\text{ L planta}^{-1}\text{ h}^{-1}$). As plantas receberam cuidados diários de capina e catação manual de insetos herbívoros, até as avaliações feitas sete meses do transplântio. Foram avaliados: altura; diâmetro do caule; número de folhas; concentrações de clorofila, fenóis, taninos e ácido gálico nas folhas; número de glomerosporos no solo; e proporção de colonização micorrízica nas raízes. As medidas das plantas foram feitas nas duas plantas úteis centrais em cada parcela.

As concentrações de clorofila foram medidas com o medidor eletrônico clorofiLOG CFL1030. Os fenóis e taninos totais foram quantificados pelos métodos Folin-Ciocalteu e da precipitação de caseína, respectivamente (Monteiro *et al.*, 2006), utilizando-se extrato etanólico foliar obtido por maceração (Oliveira *et al.*, 2013).

A concentração de ácido gálico foi determinada em cromatógrafo (Ultimate 3000, Dionex) provido de detector de arranjo fotodiodos (comprimento de onda de 280 nm), utilizando-se pré-coluna de $3,9\text{ }\mu\text{m}$, coluna de 250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octadecilsilano ($5\text{ }\mu\text{m}$), mantida em temperatura ambiente ($24\text{ }^\circ\text{C}$) e fluxo da fase móvel de $0,8\text{ mL por minuto}$, utilizando-se $20\text{ }\mu\text{L}$ para injeção. A fase móvel foi composta por água acidificada com ácido trifluoracético, a 0,05 %, como solvente A e metanol (grau HPLC) acidificado com ácido trifluoracético, a 0,05 %, como solvente B, tendo ambas sido degaseificadas em

banho de ultrassom (Ultracleaner) e filtradas através de membrana com poro de 0,45 µm. A separação foi efetivada utilizando-se gradiente linear: 10 minutos 25 % B; 12 minutos 40 % B. A solução padrão utilizada foi o ácido gálico (Sigma Aldrich®) e os resultados foram expressos em g % de ácido gálico. A solução estoque das folhas foi preparada utilizando-se 0,5 g de folhas pulverizadas e transferidas para um balão de fundo redondo (100 mL), adicionando-se 15 mL de água destilada e deixando-se durante 30 minutos em banho-maria (85 a 90 °C), sob refluxo. Ao final, o balão foi resfriado e a solução foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL, após ser filtrada em algodão, completando-se o volume com água destilada. Aliquota de 5 mL da solução estoque foi diluída em balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com água destilada. As amostras foram passadas em filtros de PVDF (difluoreto de polivinilideno) de 25 mm de diâmetro e com 0,45 µm de abertura de poro e transferidas para *vials*.

O solo rizosférico foi coletado na camada de 0 a 20 cm de profundidade, em três pontos equidistantes do caule e os glomerosporos quantificados pelas metodologias de Gerdemann & Nicolson (1963) e Jenkins (1964). As raízes foram separadas do solo, diafanizadas com KOH (10 %, p/v) e H₂O₂ (10 %, v/v), coradas com azul de Trypan em lactoglicerol, a 0,05 %, p/v (Phillips & Hayman, 1970), e a colonização micorrízica foi determinada pelo método da interseção de quadrantes segundo, Giovannetti & Mosse (1980).

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

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As plantas de pau-ferro, tanto associadas a *C. etunicatum* quanto a *A. longula*, ficaram significativamente mais altas que as do controle não inoculado, mas as inoculadas com *G. albida* não diferiram das do controle (Tabela 2). Os diâmetros do caule, apesar de 13% maiores com a inoculação de *C. etunicatum* e 10% maiores com a de *A. longula*, não diferiram significativamente do diâmetro no controle, assim como não diferiram os números de folhas. Nem sempre são observados benefícios da inoculação com FMA em espécies arbóreas transplantadas a campo, já que a resposta varia com o parâmetro medido e a espécie considerada (Smith & Read, 2008). Vandresen *et al.* (2007), por exemplo, não observaram benefício da inoculação na biomassa total, na área foliar e no comprimento das raízes de cinco espécies arbóreas nativas transplantadas para campo no Paraná.

As plantas inoculadas com *G. albida* não cresceram mais que as do controle, a inoculação favoreceu o acúmulo de clorofila total (19 %) em relação ao controle (Tabela 3). Portanto, a simbiose foi eficaz em aumentar os teores de pigmentos fotossintetizantes, importantes para o anabolismo vegetal. Yadav *et al.* (2013) também observaram aumento no conteúdo de clorofilas *a* e *b* em folhas de plantas de *Gloriosa superba* L. associadas a *Acaulospora laevis*.

A densidade de glomerosporos na rizosfera e a colonização micorrízica nas plantas dos tratamentos inoculados não diferiram significativamente da densidade e da colonização no tratamento controle (Tabela 2). No entanto, Gupta *et al.* (2002) registraram maior taxa de colonização micorrízica em plantas de *Mentha arvensis* L. inoculadas e mantidas em campo que no tratamento controle. É provável que a duração do experimento não tenha sido suficiente para provocar alterações detectáveis na colonização micorrízica e na reprodução dos FMA, em Petrolina.

Tabela 2. Altura, número de folhas, diâmetro do caule, colonização e densidade de esporos (DE) em plantas de pau-ferro, inoculadas ou não com fungos micorrízicos arbusculares (FMA), sete meses após transplantio ao campo, em Petrolina, PE

Variável	Tratamentos de inoculação			
	Controle	<i>Gigaspora albida</i>	<i>Claroideoglossum etunicatum</i>	<i>Acaulospora longula</i>
Altura (m)	1,49 b	1,52 b	1,74 a	1,65 a
Número de folhas	45,75 a	42,70 a	41,42 a	39,67 a
Diâmetro do caule (mm)	16,16 a	16,55 a	18,22 a	17,76 a
Colonização (%)	64,43 ab	53,58 b	73,97 a	65,28 ab
DE (100 g solo ⁻¹)	38,80 a	44,33 a	34,25 a	34,25 a

Médias (n= 6) na linha seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey (5 %).

Nas plantas inoculadas com FMA não houve aumento nas concentrações de fenóis e de taninos totais em relação ao controle (Tabela 3). Geneva *et al.* (2010) também não observaram aumento na concentração de fenóis totais em *Salvia officinalis* L. Por outro lado, em outras situações foram registrados aumentos nos conteúdos de fenóis totais em *Myracrodruon urundeuva* (Engl.) Fr. All. (Oliveira *et al.*, 2013), *Catharantus roseus* L.G. Don (Rosa-Mera *et al.*, 2011), *Cynara cardunculus* L. (Ceccarelli *et al.*, 2010), *Echinacea purpurea* L. (Araim *et al.*, 2009) e, também, nos conteúdos de taninos em *Wedilla Chinensis* (Osbeck) Merril. (Nisha & Rajeshkumar, 2010) e *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng (Rajeshkumar *et al.*, 2008). Maiores teores de pigmentos fotossintéticos são mecanismos propostos para explicar a influência do FMA no aumento da concentração de

compostos secundários em plantas medicinais (Dave & Tarafdar, 2011), mas tal mecanismo parece não ter influenciado a concentração de compostos secundários nas plantas de pau-ferro inoculadas com FMA, em Petrolina.

Tabela 3. Concentrações de clorofila, fenóis e taninos totais e ácido gálico em plantas de pau-ferro, inoculadas ou não com fungos micorrízicos arbusculares (FMA), sete meses após transplantio ao campo, em Petrolina, PE

Variável	Tratamentos de inoculação			
	Controle	<i>Gigaspora albida</i>	<i>Claroideoglossum etunicatum</i>	<i>Acaulospora longula</i>
Clorofila total**	65,34 b	77,54 a	66,73 b	67,78 b
Fenóis totais*	2,11 ab	2,16 a	2,13 ab	2,08 b
Taninos totais*	2,02 ab	2,09 a	2,08 a	1,99 b
Ácido gálico***	0,038 b	0,027 d	0,046 a	0,033 c

Médias (n=6) na linha seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey (5 %).

Apesar da concentração de fenóis totais não ter sido significativamente aumentada pela presença do FMA, a inoculação com *C. etunicatum* aumentou a produção de ácido gálico (21 %) em relação ao controle não inoculado, diferindo dos demais tratamentos de inoculação (Tabela 3). Nell *et al.* (2009) observaram que em *S. officinalis* a concentração de fenólicos totais e de ácido rosmarínico nas folhas não foi alterada em plantas micorrizadas quando comparadas às do controle.

Um mecanismo proposto para explicar a influência dos FMA no aumento de compostos secundários é a ativação de rotas metabólicas (Zimare *et al.*, 2013). Entre essas, uma das relevantes é a do ácido chiquímico, precursor de compostos fenólicos (Heldt, 2005), o que pode justificar o aumento na concentração de ácido gálico foliar nas plantas formando simbiose com *C. etunicatum*. Além disso, esse incremento foi dependente do FMA utilizado (Copetta *et al.*, 2006), confirmando a hipótese inicial do trabalho. Experimentos realizados em campo com outras espécies validam a aplicação micorrízica visando aumento da biossíntese de compostos secundários com propriedades terapêuticas, como observado por Ceccarelli *et al.* (2010) em plantas de *C. cardunculus*, com produção aumentada de fenóis totais, e por Gupta *et al.* (2002), em cultivares de *M. arvensis*, com maior concentração de óleos essenciais.

A tecnologia micorrízica empregando *C. etunicatum* pode agregar valor à fitomassa de pau-ferro comercializada para a indústria fitoterápica, considerando a produção de ácido gálico foliar obtida. Dessa forma, os agricultores do Vale do São Francisco poderão

cultivar o pau-ferro, tornando possível a venda das folhas para a indústria farmacêutica e contribuindo para a redução do extrativismo.

Estudos futuros devem analisar o efeito da inoculação micorrízica na produção de outros compostos foliares com importância farmacológica em pau-ferro, como o ácido elágico e o Pauferrol A.

4. CONCLUSÃO

A inoculação micorrízica pode favorecer o crescimento de *L. ferrea* estabelecida em campo e aumentar a produção de ácido gálico, com os benefícios variando em função do FMA inoculado. O plantio de *L. ferrea* inoculado é uma alternativa para fornecimento de matéria-prima com melhor qualidade à indústria de fitoterápicos.

7. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Libidibia ferrea é uma leguminosa arbórea medicinal nativa da Caatinga, cujo efeito terapêutico está relacionado à presença de compostos secundários nos tecidos. No extrato do pau-ferro foram caracterizadas algumas dessas moléculas, entre as quais o ácido gálico, que possui atividades antimicrobiana e antioxidante, além de possuir efeito preventivo contra o câncer. O poder terepêutico do pau-ferro é bastante conhecido pela população e o Ministério da Saúde inseriu a *L. ferrea* na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (Rennisus).

A obtenção de partes do pau-ferro é feita de forma extrativista, colocando em risco a espécie, devido à coleta abusiva. Isto pode ser em decorrência do alto custo dos medicamentos industrializados ou ainda, ao fornecimento de matéria prima para a indústria fitoterápica. Nesse sentido, plantios desta leguminosa são recomendados. A biotecnologia micorrízica, que é uma alternativa eficiente para produzir mudas, além de induzir o aumento de compostos secundários vegetais, pode ser utilizada para produção de mudas de pau-ferro.

No presente estudo, experimentos realizados com plantas de pau-ferro associadas a FMA, em telado experimental e em campo, confirmaram a hipótese de que os FMA induzem aumento na concentração de alguns compostos secundários. Folhas de mudas de pau-ferro inoculadas com mistura de FMA e cultivadas em solo sem adição de P_2O_5 tiveram maior acúmulo de matéria seca. Por outro lado, a ação conjunta do P e da micorriza não incrementou a produção dessas biomoléculas.

Mudas de pau-ferro inoculadas com *G. albida* e adubadas com vermicomposto tiveram aumento na concentração de flavonóides, importantes compostos secundários que apresentam várias propriedades terapêuticas.

Em campo, os resultados obtidos com plantas de pau-ferro micorrizadas ratificaram parcialmente dados obtidos em telado, considerando que o tratamento micorrízico que favoreceu a produção de fitoquímicos no experimento em telado não correspondeu ao FMA mais eficaz em condições de campo. Plantas inoculadas com *C. etunicatum* acumularam mais ácido gálico foliar em plantas de pau-ferro em campo. Isto confirma a necessidade de ensaios em campo para validação da tecnologia micorrízica.

A biotecnologia micorrízica poderá proporcionar aos pequenos agricultores a oportunidade de aumentar a renda familiar com o plantio do pau-ferro, fornecendo à indústria fitoterápica e farmacêutica maior volume de matéria prima, com concentração aumentada de ácido gálico.

Estudos futuros devem incluir análises em plantas com mais tempo de transplante, avaliando-se outras partes vegetais (casca do caule, flores, frutos e sementes) e outros compostos vegetais, como o ácido elágico e o pau-ferrol A (chalcona).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abu-Zeyad, R., Khan, A.G., Khoo, C. 1999. Ocurrance of arbuscular mycorrhiza in *Castanospermum australe* A. Cunn. & C. Fraser and effects on growth and production of castanospermine. *Mycorrhiza* 9: 111-117.
- Agra, M.F., Silva, K.N., Basílio, I.J.L.D., Freitas, P.F., Barbosa-Filho, J.M. 2008. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 18: 472-508.
- Agra, M.F., Freitas, P.F., Barbosa-Filho, J.M. 2007. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 17: 144-140.
- Albuquerque, U.P., Monteiro, J.M., Ramos, M.A., Amorim, E.L.C. 2007. Medicinal and magic plants from a public market in northeastern Brazil. *Journal of Ethno pharmacology* 110: 76-91.
- Almeida, C.F.B.R., Albuquerque, U.P. 2002. Uso e conservação de plantas e animais medicinais no estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil): um estudo de caso. *Interciencia* 27: 272-285.
- Almeida, C.F.B.R., Lima e Silva, T.C., Amorim, E.L.C., Maia, M.B.S., Albuquerque, U.P. 2005. Life strategy and chemical composition as predictors of the selection of medicinal plants from the caatinga (Northeast Brazil). *Journal of Arid Environments* 62: 127-142.
- Alves, R.R.N., Silva, A.A.G., Souto, W.M.S., Barboza, R.R.D. 2007. Utilização e comércio de plantas medicinais em Campina Grande, PB, Brasil. *Revista Eletrônica de Farmácia* 4: 175-198.
- Amaral, F.M.M., Coutinho, D.F., Ribeiro, M.N.S., Oliveira, M.A. 2003. Avaliação da qualidade de drogas vegetais comercializadas em São Luís/Maranhão. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 13: 27-30.
- Araim, G., Saleem, A., Arnason, J. T., Charest, C. 2009. Root colonization by an arbuscular mycorrhizal (AM) fungus increase growth and secondary metabolism of purple coneflower, *Echinacea purpurea* (L.) Moench. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 2255-2258.
- Araújo, T.A.S., Alencar, N.L., Amorim, E.L.C., Albuquerque, U.P., 2008. A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. *Journal Ethnopharmacology* 120, 72-80.
- Assis, F., 2011. Federal University of Campina Grande, Campina Grande, Paraíba, Brazil- <<http://www.assistat.com>>. Acesso em: 15 de outubro de 2013.
- Bacchi, E.M., Sertié, J. A.A., Villa, N., Katz, H. 1995. Antiulcer action and toxicity of *Styrax camporum* and *Caesalpinia ferrea*. *Planta medica* 61: 204-207.
- Balbach, A. 1992. *As plantas curam*. 1 ed. Itaquaquecetuba, SP. Editora Missionária.
- Baslam, M., Goicoechea. 2012. Water deficit improved the capacity of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) for inducing the accumulation of antioxidante compounds in lettuce leaves. *Mycorrhiza* 22: 347-359.
- Binet, M.-N., vanTuinen, D., Deprêtre, N., Koszela, N., Chambon, C., Gianinazzi, S. 2011. Arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Artemisia umbelliformis* Lam, an endangered aromatic species in Southern French Alps, influence plant P essential oil contents. *Mycorrhiza* 21: 523-535.
- Biruel, R. P., Aguiar, I.B., Paula, R.C. 2007. Germinação de sementes de pau-ferro submetidas a diferentes condições de armazenamento, escarificação química, temperatura e luz. *Revista Brasileira de Sementes* 29: 151-159.

- Bonfante, P., Balestrini, R., Genre, A., Lanfranco, L. 2009. Establishment and functioning of arbuscular mycorrhizas. In: Deising, H. B. (ed.). *The Mycota, V: Plant relationships*, 2nd edition. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp.259-274.
- Borges, A.J.S., Trindade, A.V., Matos, A.P., Peixoto, M.F.S. 2007. Redução do mal-do-panamá em bananeira-maçã por inoculação de fungo micorrízico arbuscular. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 42: 33-41.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Brito, H.O., Noronha, E.P., França, L.M., Brito, L.M.O., Prado, S.A., 2008. Análise da composição fitoquímica do extrato etanólico das folhas de *Annona squamosa* (ATA). *Revista Brasileira de Farmácia*. 89, 180-184.
- Broinizi, P.R.B., Andrade-Wartha, E.R.S, Silva, A.M.O., Novoa, A. J.V., Torres, R.P., Azeredo, H. M.C., Alves, R.E., Mancini-Filho, J. (2007). Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale* L.). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 27: 902-908.
- Caldeira, M.V.W., Silva, E.M.R.S., Franco, A.A., Zanon, M.L.B., 1997. Crescimento de leguminosas arbóreas em respostas à inoculação com fungos micorrízicos arbusculares. *Ciência Florestal* 7, 1-10.
- Carneiro, M. A. C., Siqueira, J. O., Moreira, F. M.S., Carvalho, D., Botelho, S. A., Junior, O. J. S. 1998. Micorriza arbuscular em espécies arbóreas e arbustivas nativas de ocorrência no sudeste do Brasil. *Cerne* 4: 1, 129-145.
- Carneiro, M.A.C., Siqueira, J.O., Davide, A.C. 2004. Fósforo e inoculação com fungos micorrízicos arbusculares no estabelecimento de mudas de embaúba (*Cecropia pachystachya* trec). *Pesquisa Agropecuária Tropical* 34: 119-125.
- Carvalho, J.C.T., Gosmann, G., Schenkel, E.P. 2003. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: Simões, C.M.O., Sebenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A., Petrovick, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5 ed. rev. Ampl. – Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRG/Editora da UFSC, pp. 519-535.
- Carvalho, J.C.T., Teixeira, J. R.M., Souza, P. J.C., Bastos, J. K., Santos Filho, D., Sarti, S.J. 1996. Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. *Journal of Ethnopharmacology* 53: 175-178.
- Cavalcante, U.M.T., Goto, B.T., Maia, L.C. 2009. Aspectos da simbiose micorrízica arbuscular. *Anais da Academia Pernambucana de Ciências Agronômica* 5: 180-208.
- Cavalcante, U.M.T., Maia, L.C., Costa, C.M.C., Cavalcante, A.T., Santos, V.F. 2002. Efeito de fungos micorrízicos, da adubação fosfatada e da esterilização do solo no crescimento de mudas de maracujazeiro amarelo. *Revista Brasileira de Ciências do Solo* 26: 1099-1106.
- Cavalcante, U.M.T., Maia, L.C., Nogueira, R.J.M.C. Santos, V. F. 2001. Respostas fisiológicas em mudas de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* sims. f. *flavicarpa* deg.) inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares e submetidas a estresse hídrico. *Acta Botânica Brasilica* 15:379-390.
- Cavalheiro, M. G., Farias, D.F., Fernandes, G.S., Nunes, E.P., Cavalcanti, F.S., Vaconcelos, I. M., Melo, V.M.M., Carvalho, A. F.U. 2009. Atividades biológicas e enzimáticas do extrato aquoso de sementes de *Caesalpinia ferrea* Mart. Leguminosae. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 19: 586-591.
- Ceccarelli, N., Curadi, M., Martelloni, L., Sbrana, C., Picciarelli, P., Giovannetti, M. 2010. Mycorrhizal colonization impacts on phenolic content and antioxidant properties of

- artichoke leaves and flower heads two years after field transplant. *Plant and Soil* 335: 311-323.
- Chanwitheesuk, A., Teerawutgulrag, A., Kilburn, J.D., Rakariyatham, N. 2007. Antimicrobial gallic acid from *Caesalpinia mimosoides* Lamk. *Food Chemistry* 100: 1044-1048.
- Chaudhary, V., Kapoor, R., Bhatnagar, A.K. 2008. Effectiveness of two arbuscular mycorrhizal fungi on concentrations of essential oil and artemisinin in three accessions of *Artemisia annua* L. *Applied Soil Ecology* 40: 174-181.
- Coelho, R.G. 2004. Estudo químico de *Zollernia ilicifolia* (Fabaceae), *Wilbrandia ebracteata* (cucurbitaceae) e *Caesalpinia ferrea* (Caesalpinaceae) 181p. Tese (Doutorado em Química) Instituto de Química, Universidade Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara.
- Copetta, A., Lingua, G., Bardi, L., Masoero, G., Berta, G. 2007. Influence of arbuscular mycorrhizal fungi on growth and essential oil composition in *Ocimum basilicum* var. Genovese. *Caryologia* 60: 106-110.
- Coppeta, A., Lingua, G., Berta, G. 2006. Effects of three AM fungi on growth, distribution of glandular hairs, and essential oil production in *Ocimum basilicum* L. var. *genovese*. *Mycorrhiza* 16: 485-494.
- Dave, S., Tarafdar J.C. 2011. Stimulatory synthesis of saponina by mycorrhizal fungi in safed musli (*Chlorophytum borivillianum*) tubers. *International Research Journal of Agricultural Science and Soil Science* 1: 137-141.
- Desmarchelier, C., Romão, R.L., Coussio, J., Ciccio, G. 1999. Antioxidante and free radical scavenging activities in extracts from medicinal trees used in the 'Caatinga' region in northeastern Brazil. *Journal of Ethnopharmacology* 67: 69-77.
- Drumond, M.A., KilL, L.H.P., Lima, P.C.F., Oliveira, M.C., Oliveira, V.R., Albuquerque, S.G. Nascimento, C.E.S.; Cavalcanti, J. 2000. Estratégias para o uso sustentável da biodiversidade da Caatinga (Documento para discussão no GT Estratégias para o uso sustentável). In: *Seminário para avaliação e identificação de ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição de benefícios da biodiversidade do bioma Caatinga*. Petrolina.
- Dubois, M., Guiles, A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Biochemistry* 28: 350-355.
- Elsen, A., Gervacio, D., Swennen, R., De Waele, D. 2008. AMF-induced biocontrol against plant parasitic nematodes in *Musa* sp.: a systemic effect. *Mycorrhiza* 18: 251-256.
- Fester, T., Hause, G. 2005. Accumulation of reactive oxygen species in arbuscular mycorrhizal roots. *Mycorrhiza* 15: 373-379.
- Fester, T., Schimidt, D., Lohse, S., Walter, M. H., Giuliano, G., Bramley, P.M., Fraser, P.D., Hause, B., Strack, D. 2002. Stimulation of carotenoid metabolism in arbuscular mycorrhizal roots. *Planta* 216: 148-154.
- Freitas, M.S.M., Martins, M.A., Viera, I.J.C. 2004. Produção e qualidade de óleos essenciais de *Mentha arvensis* em resposta à inoculação de fungos micorrízicos arbusculares. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 9: 887-894.
- Galdino, G., Mesquita, M. R., Ferraz, I. D. K. 2007. Descrição morfológica da plântula e diásporos de *Caesalpinia ferrea* Mart. *Revista Brasileira de Biociências* 5:747-749.
- García-Garrido, J.M., Lendzemo, V., Castellanos-Morales, V., Steinkellner, S., Vierheilig, H. 2009. Strigolactones, signals for parasitic plants and arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 19: 449-459.

- Gattai, G.S., Pereira, S.V., Costa, C.M.C., Lima, C.E.P., Maia, L.C. 2011. Microbial activity, arbuscular mycorrhizal fungi and inoculation of woody plants in lead contaminated soil. *Brazilian Journal of Microbiology* 42: 859-867.
- Geneva, M.P., Stancheva, I.V., Boychinova, M.M., Mincheva, N.H., Yonova, P. A. 2010. Effects of foliar fertilization and arbuscular mycorrhizal colonization on *Salvia officinalis* L. growth, antioxidant capacity, and essential oil composition. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90: 696-702.
- Gerdemann, J.W., Nicolson, T.H. 1963. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society* 46:235-244.
- Giovannetti, M., Avio, L., Barale, R., Ceccarelli, N., Cristofani, R., Iezzi, A., Mignolli, F., Picciarelli, P., Pinto, B., Reali, D., Sbrana, C., Scarpato, R. 2012. Nutraceutical value and safety of tomato fruits produced by mycorrhizal plants. *Bristh journal of nutrition* 107:241-251.
- Giovannetti, M., Mosse, B. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist* 84: 489-500.
- Giri, B., Kapoor, R.K., Mukerji, G., 2003. Influence of arbuscular mycorrhizal fungi and salinity on growth, biomass, and mineral nutrition of *Acacia auriculiformis*. *Biology and Fertility of Soils* 38: 170-175.
- Gobbo-Neto, L., Lopes, N. 2007. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova* 30: 374-381.
- Gonzalez, F. G. 2005. Estudo farmacognóstico e farmacológico de *Caesalpinia ferrea* Martius. *Tese de Doutorado*, Universidade de São Paulo. 137 p.
- Gupta, M.L., Prasad, A., Ram, M., Kumar, S. 2002. Effect of the vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) fungus *Glomus fasciculatum* on the essential oil yield related characters and nutrient acquisition in the crops of different cultivars of menthol mint (*Mentha arvensis*) under field conditions. *Bioresource Technology* 81: 77-79.
- Heldt, H-W. 2005. *Plant Biochemistry*. Elsevier Academic Press. Third Edition.
- Hijri, M., Sanders, I. 2005. Low gene copy number shows that arbuscular mycorrhizal fungi inherit genetically different nuclei. *Nature* 433: 160-163.
- Huang, Z., Zou, Z., He, C., He, Z., Zhang, Z., Li, J. 2011. Physiological and photosynthetic responses of melon (*Cucumis melo* L.) seedlings to three *Glomus* species under water deficit. *Plant and Soil* 339: 39-399.
- Jenkins, W.R.A. 1964. Rapid centrifugal flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Disease Reporter* 48:692.
- Jurkiewicz, A., Ryszka, P., Anielska, T., Waligórski, P., Bialonska, D., Góralaska, K., Tsimilli-Michael, M. 2010. Optimization of culture conditions of *Arnica montana* L.: effects of mycorrhizal fungi and competing plants. *Mycorrhiza* 20: 293-306.
- Kapoor, R., Chaudary, V., Bhatnagar, A.K. 2007. Effects of arbuscular mycorrhiza and phosphorus application on artemisinin concentration in *Artemisia annua* L. *Mycorrhiza* 17: 581-587.
- Kapoor, R., Giri, B., Mukerji, K.G. 2004. Improved growth and essential oil yield and quality in *Foeniculum vulgare* mill on mycorrhizal inoculation supplemented with P-fertilizer. *Bioresource Technology* 93: 307-311.
- Kapoor, R., Giri, B., Mukerji, K.G. 2002a. *Glomus macrocarpum*: a potential bioinoculant to improve essential oil quality and concentration in Dill (*Anethum graveolens* L.) and Carum (*Trachyspermum ammi* (Linn.) Sprague). *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 18: 459-463.

- Kapoor, R., Giri, B., Mukerji, K.G. 2002b. Mycorrhization of coriander (*Coriandrum sativum* L.) to enhance the concentration and quality of essential oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82: 339-342.
- Karagiannidis, N., Thomidis, T., Lazari, D., Panou-Filotheou, E., Karagiannidou, C. 2011. Effect of three greek arbuscular mycorrhizal fungi in improving the growth, nutrient concentration, and production of essential oils of oregano and mint plants. *Scientia Horticulturae* 129: 329-334.
- Karagiannidis, N., Thomidis, T., Panou-Filotheou, E. 2012. Effects of *Glomus lamellosum* on growth, essential oil production and nutrients uptake on selected medicinal plants. *Journal of Agricultural Science* 4:137-144.
- Khaosaad, T., Krenn, L., Medjakovic, S., Ranner, A., Lössl, A., Nell, M., Jungbauer, A., Vierheilig, H. 2008. Effect of mycorrhization on the isoflavone content and the phytoestrogen activity of red clover. *Journal of Plant Physiology* 165: 1161-1167.
- Khaosaad, T., Vierheilig, H., Nell, M., Zitterl-Eglseer, K., Novak, J. 2006. Arbuscular mycorrhiza alter the concentration of essential oils in oregano (*Origanum* sp., Lamiaceae). *Mycorrhiza* 16: 433-446.
- Krisna H., Singh, S.K., Sharma, R.R., Khawale, R.N., Grover, M., Patel, V.B. 2005. Biochemical changes in micropropagated grape (*Vitis vinifera* L.) plantlets due to arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) inoculation during *ex vitro* acclimatization. *Scientia Horticulturae* 106: 554-567.
- Lambais, M.R., Rios-Ruiz, W.F., Andrade, R.M. 2003. Antioxidant responses in bean (*Phaseolus vulgaris*) roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 160: 421-428.
- Larose, G., Chênevert, R., Moutoglou, P., Gagné, S., Piché, Y., Vierheilig, H. 2002. Flavonoid levels in roots of *Medicago sativa* are modulated by the developmental stage of the symbiosis and the root colonizing arbuscular mycorrhizal fungus. *Journal of Plant Physiology* 159: 1329-1339.
- Lee, J., Scagel, C.F. 2009. Chicoric acid found in basil (*Ocimum basilicum* L.) leaves. *Food Chemistry* 115: 650-656.
- Lima, C.S. 2014. Tecnologia micorrízica para a maximização da produção de biomoléculas foliares em mudas de umburana-de-cambão e de ingazeira. *Dissertação de Mestrado*, Universidade de Pernambuco, Recife.
- Lima, J.D., Almeida, C.C., Silva, E. Silva, B.M., Moraes, W.S. 2006. Efeito da temperatura e do substrato na germinação de sementes de *Caesalpinia ferrea* Mart. Ex. Tul. (Leguminosae, Caesalpinoideae). *Revista Árvore* 30: 513-518.
- Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 21 Jan. 2014.
- Lohse, S., Schliemann, W., Ammer, C., Kopka, J., Strack, D., Fester, T. 2005. Organization and metabolism of plastids and mitochondria in arbuscular mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* 139: 329-340.
- Lorenzi, H. 2002. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil*. 2ª ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum.
- Maciel, M.A.M., Pinto, A.C., Veiga Jr., V.F. 2002. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova* 25: 429-438.
- Maia, G.N. 2004. *Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades*. 1ª ed. São Paulo: D & Z Computação Gráfica e Editora.
- Mandal, S., Evelin, H., Giri, B., Singh, V.P. 2013. Arbuscular mycorrhiza enhances the production of stevioside and rebaudioside-A in *Stevia rebaudiana* via nutritional and non-nutritional mechanisms. *Applied Soil Ecology* 72: 187-194.

- Marone-Fortunato, I., Avato, P. 2008. Plant development and sythesis of essential oils in micropropagated and mycorrhiza inoculated plants of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 93: 139-149.
- Marulanda, A., Azcon, R., Ruiz-Lozano, J. M. 2003. Contribution of six arbuscular mycorrhizal fungal isolates to water uptake by *Lactuca sativa* plants under drought stress. *Physiologia Plantarum* 119: 526–533.
- Ministério da Saúde <<http://portal.saude.gov.br>> acesso em 20 de janeiro de 2012.
- Ministério da Saúde. Secretaria de Ciências, Tecnologias e insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. 2006. *Política Nacional de plantas medicinais e fitoterápicos*. – Brasília: Ministério da Saúde. Departamento de Assistência Farmacêutica – (Série B. textos básicos de saúde).
- Monteiro, J.M., Albuquerque, U.P., Lins Neto, E.M.F., Araújo, E.L., Albuquerque, M.M., Amorim, E.L.C. 2006. The effects of seasonal climate changes in the Caatinga on tannin levels in *Myracrodruon urundeuva* (Engl.) Fr. All. and *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 16: 338-344.
- Moreira, F. M. S., Siqueira, J. O. Micorrizas. 2002. In: *Microbiologia e bioquímica do solo*. Lavras, UFLA, pp. 473-578.
- Mota-Fernández, S., Álvarez-Solis, J.D., Abud-Archila, M., Dendooven, L., Gutiérrez-Miceli. 2011. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi and phosphorus concentration on plant growth and phenols in micropropagated *Aloe vera* L. plantlets. *Journal of Medicinal Plants Research* 57: 6260-6266.
- Nakamura, E.S., Kurosaki, F., Arisawa, M., Mukainaka, T., Takayasu, J., Okuda, M., Tokuda, H., Nishino, H. 2002. Cancer chemopreventive effects of a Brazilian folk medicine, Juca, on in vivo two-stage skin carcinogenesis. *Journal of Ethnopharmacology* 81: 135-137.
- Nell, M., Vötsch, M., Vierheilig, H., Steinkellner S., Zitterl-Eglseer, K., Franz, C., Novaka, J. 2009. Effect of phosphorus uptake on growth and secondary metabolites of garden sage (*Salvia officinalis* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89: 1090–1096.
- Nell, M., Wawrosch, C., Steinkellner, S., Vierheilig, H., Kopp, B., Lössl, A., Franz, C., Novak, J., Zitterl-Eglseer, K. 2010. Root colonization by symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi increases sesquiterpenic acid concentration in *Valeriana officinalis* L. *Planta Medica* 76: 393-398.
- Nisha, M.C., Rajeshkumar, S. 2010. Influence of arbuscular mycorrhizal fungi on biochemical chang in *Wedilla chinensis* (Osbeck) Merril. *Ancient Science of Life* 29: 26-29.
- Ngwene, B., George, E., Claussen, W., Neumann, E. 2010. Phosphorus uptake by cowpea plants from sparingly available or soluble sources as affected by nitrogen form and arbuscular-mycorrhiza-fungal inoculation. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 173: 353–359.
- Nozaki, H., Hayashi, K., Kido, M., Kakumoto, K., Ikeda, S., Matsuura N., Tani, H., Takaoka, D., Iinuma, M., Akao, Yukihiro. 2007. Pauferro A, a novel chalcone trimer with a cyclobutane ring froam *Caesalpinia ferrea* Mart exhibiting DNA topoisomerase II inhibition and apoptosis-inducing activity. *Tetrahedron Letters* 48: 8290-8292.
- Oliveira, M.S. 2014. Aplicação de fungos micorrízicos arbusculares e vermicomposto para maximização da produção de biomoléculas foliares em mudas de *Passiflora alata* Curtis. *Dissertação de Mestrado*, Universidade de Pernambuco, Recife.
- Oliveira, M.S., Albuquerque, U.P., Campos, M.A.S., Silva, F.S.B. 2013. Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) affects biomolecules content in *Myracrodruon urundeuva* seedlings. *Industrial Crops and Products* 50: 244-247.

- Oliveira, A.F., Batista, J.S., Paiva, E.S., Silva, A.E., Farias, Y.J.M.D. Damasceno, C.A.R., Brito, P.D., Queiroz, S.A.C., Rodrigues, C.M.F., Freitas, C.I.A. 2010. Avaliação da atividade cicatrizante do jucá (*Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. var. *ferrea*) em lesões cutâneas de caprinos. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 12: 302-310.
- Oliveira, A. N., Oliveira, L. A. 2004. Associação micorrizica e teores de nutrientes nas folhas de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) e guaranazeiro (*Paullinia cupana*) de um sistema agroflorestal em Manaus, Amazonas. *Revista Brasileira de Ciências do Solo* 28: 1063-1068.
- Pedone-Bonfim, M.V.L., Lins, M. A., Coelho, I. R., Santana, A. S., Silva, F.S.B., Maia, L. C. 2013. Mycorrhizal technology and phosphorus in the production of primary and secondary metabolites in cebil (*Anadenanthera colubrine* (Vell.) Brenan) seedlings. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93: 1479-1484.
- Peipp, H. Maier, W., Schmidt, J., Wray, V. 1997. Arbuscular mycorrhizal fungus-induced changes in the accumulation of secondary compounds in barley roots. *Phytochemistry* 44: 581-587.
- Perner, H., Rohn, S., Driemel, G., Batt, N., Schwarz, D., Kroh, L. W., Eckhard George. 2008. Effect of Nitrogen Species Supply and Mycorrhizal Colonization on Organosulfur and Phenolic Compounds in Onions. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 56:3538-3545.
- Phillips, J.M., Hayman, D. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* 55: 158-161.
- Ponce, M. A., Bompadre, M.J., Scervino, J.M., Ocampo, J.A. 2009. Flavonoids, benzoic acids and cinnamic acids isolated from shoots and roots of Italian rye Grass (*Lolium multiflorum* Lam.) with and without endophyte association and arbuscular mycorrhizal fungus. *Biochemical Systematics and Ecology* 37: 245-253.
- Prasad, A., Kumar, S., Khaliq, A., Pandey A. 2011. Heavy metals and arbuscular mycorrhizal (AM) fungi can alter the yield and chemical composition of volatile oil of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *Biology and Fertility of Soils* 47: 853-861.
- Queiroz, L.G. 2009. *Leguminosas da caatinga*. Universidade Estadual de Feira de Santana. 467 p.
- Rajeshkumar, S., Nisha, M.C., Selvaraj, T. 2008. Variability in growth, nutrition and phytochemical constituents of *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng. as influenced by indigenous arbuscular mycorrhizal fungi. *Maejo International Journal of Science and Technology* 2: 431-439.
- Rasouli-Sadaghiani, M., Hassani, A., Barin, M., Danesh, Y. R., Sefidkon, F. 2010. Effects of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi on growth, essential oil production and nutrients uptake in basil. *Journal of Medicinal Plants Research* 4: 2222-2228.
- Ratti, N., Verma, H. N., Gautam, S. P. 2010. Effect of *Glomus* species on physiology and biochemistry of *Catharantus roseus*. *Indian Journal of Microbiology* 50: 355-360.
- Redecker, D., Morton, J.B., Bruns, T.D. 2000. Ancestral lineages of arbuscular mycorrhizal fungi. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 14: 276-284.
- Reis, M.S., Mariot, A., Steenbock, W. 2003. Diversidade e domesticação de plantas medicinais In: Simões, C.M.O., Sebenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A., Petrovick, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5 ed. rev. Ampl. – Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRG/Editora da UFSC, PP. 45-74.
- Rosa-Mera, C.J., Ferrera-Cerrato, R., Alarcón, A., Sánchez-Colin, M.J.; Muñoz-Muñiz, O.D. 2011. Arbuscular mycorrhizal fungi and potassium bicarbonate enhance the foliar

- content of the vinblastine alkaloid in *Catharanthus roseus*. *Plant and Soil* 349: 367-376.
- Rufino, M.S.M; Alves, R.E.; Brito, E.S.; Morais, S.M.; Sampaio, C.G.; Perez-Jimenez, J.; Saura-Calixto, F.D. 2007. Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. *Comunicado Técnico Embrapa* 127: 1-4.
- Ruiz-Terán, F., Medrano-Martinez, A., Navarro-Ocaña. 2008. Antioxidant and free radical scavenging activities of plant extracts used in traditional medicine in Mexico. *African Journal of Biotechnology* 7: 1886-1893.
- Sampaio, F.C., Pereira, M.S.V., Dias, C. S., Costa, V. C.O., Conded, N. C.O., Buzalafe, M.A.R. 2009. In vitro antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. *Journal of Ethnopharmacology* 124: 289-294.
- Sampaio, E., Rodal, M.J. 2000. Fitofisionomias da Caatinga. (Documento para discussão no GT Botânica). In: *Avaliação e identificação de ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição de benefícios da biodiversidade do bioma Caatinga*. Petrolina.
- Santana, A. S. 2010. Eficiência micorrízica em espécies de plantas medicinais da Caatinga em diferentes substratos. *Dissertação de Mestrado, UFPE*.
- Santos, R.I. 2003. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: Simões, C.M.O., Sebenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A., Petrovick, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5 ed. rev. Ampl. – Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRG/Editora da UFSC. P 403-434.
- Santos, S.C., Mello, J.C.P. 2003. Taninos. In: Simões, C.M.O., Sebenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A., Petrovick, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5 ed. rev. Ampl. – Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRG/Editora da UFSC. Pp. 615-655.
- Schüßler, A., Schwarzott, D., Walker, C. 2001. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Micological Research* 105: 1413-1421.
- Sheng, M., Tang, M., Chen, H., Yang, B., Zhang, F., Huang, Y. 2008. Influence of arbuscular mycorrhizae on photosynthesis and water status of maize plants under salt stress. *Mycorrhiza* 18:287-296.
- Sieverding, E. 1991. *Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems*. Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ) Eschborn, Germany.
- Silva, L.C., Silva Júnior, C.A., Souza, R.M., Macedo, A.J., Silva, M.V., Correia, M.T.S. 2011. Comparative analysis of the antioxidant and DNA protection capacities of *Anadenanthera colubrine*, and *Pityrocarpa moniliformis* fruits. *Food and Chemical Toxicology* 49: 2222-2228.
- Silva, M.F., Pescador, R., Rebelo, R.A., Stürmer, S. L. 2008. The effect of arbuscular mycorrhizal isolates on the development and oleoresin production of micropropagated *Zingiber officinale*. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 20: 119-130.
- Silva, A.C.O., Albuquerque, U.P. 2005. Woody medicinal plants of the caatinga in the state of Pernambuco (Northeast Brazil). *Acta Botanica Brasilica* 19: 17-26.
- Silva, M.A., Cavalcante, U.M.T., Silva, F.S.B., Soares, S.A.G., Maia, L.C. 2004. Crescimento de mudas de maracujazeiro-doce (*Passiflora alata* Curtis) associadas a fungos micorrízicos arbusculares (Glomeromycota). *Acta botânica brasileira* 18: 981-985.
- Silveira, A.P.D., Silva, L.R., Azevedo, I.C., Oliveira, E., Meletti, L.M.M. 2003. Desempenho de fungos micorrízicos arbusculares na produção de mudas de maracujazeiro-amarelo, em diferentes substratos. *Bragantia*, Campinas, 62:89-99.

- Singh, N.V., Singh, S.K., Singh, A.K., Meshram, D.T., Suroshe, S.S., Mishra, D.C. 2012. Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) induced harding of micropropagated pomegranate (*Punica grantum* L.) plantlets. *Scientia Horticulturae* 136: 122-127.
- Singh, S., Pandey, A., Kumar, B., Man, L., Palni. 2010. Enhancement in growth and quality parameters of tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntzel through inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi in an acid soil. *Biology and Fertility of Soils* 46: 427-433.
- Smith, S.E., Read D.J. 2008. *Mycorrhizal symbiosis*. 3rd edition. Academic Press.
- Soares, C. R. F. S., Siqueira, J.O. 2008. Mycorrhiza and phosphate protection of tropical grass species against heavy metal toxicity in multi-contaminated soil. *Biology and Fertility of Soils* 44: 833-841.
- Souza, A.B., Souza, L.M.S., Carvalho, J. C. T., Maistro, E.L. 2006. No clastogenic activity of *Caesalpinia ferrea* Mart. (Leguminosae) extract on bone marrow cells of Wistar rats Andrea. *Genetics and Molecular Biology* 29: 380-383.
- Souza, F.A., Stürmer, S.L., Carrenho, R., Trufem, S.F.B. 2010. Estrutura, ultraestrutura e germinação de glomerosporos. In: Siqueira, J. O., Souza, F. A., Cardoso, E. J. B. N., Tsai, S. M. (eds.) *Micorrizas: 30 anos de pesquisa no Brasil*. Lavras, UFLA, pp. 15-73.
- Souza, R. G., Maia, L. C., Sales, M.F., Trufem, S.F.B. 2003. Diversidade e potencial de infectividade de fungos micorrízicos arbusculares em área de caatinga, na Região de Xingó, Estado de Alagoas, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 26: 49-60.
- Taiz, L., Zeiger, E. 2004. *Fisiologia vegetal*. 4^a ed. Porto Alegre: Artmed.
- Toussaint, J. P. 2007. Investigating physiological changes in the aerial parts of AM plants: what do we know and where should we be heading? *Mycorrhiza* 17: 349-353.
- Toussaint, J. P., Smith, F.A., Smith, S.E. 2007. Arbuscular mycorrhizal fungi can induce the production of phytochemicals in sweet irrespective of phosphorus nutrition. *Mycorrhiza* 17: 291-297.
- Toussaint, J.-P., Kraml, M., Nell, S. E., Smith, F. A., Steinkellner, S., Schmiderer, C., Vierheilig, H., Novak, J. 2008. Effect of *Glomus mosseae* on concentration of rosmarinic and caffeic acids and essential oil compounds in basil inoculated with *Fusarium oxysporum* f. sp. *Basilica*. *Plant Pathology* 57: 1109-1116.
- Trindade, A.V., Lins, G.M.L., Maia, I.C.S. 2003. Substratos e fungo micorrízico arbuscular em mudas micropropagadas de bananeira na fase de aclimação. *Revista Brasileira de Fruticultura* 25: 137-142.
- Tristão, F.S.M., Andrade, S.A.L., Silveira, A.P.D. 2006. Fungos micorrízicos arbusculares na formação de mudas de cafeeiro, em substratos orgânicos comerciais. *Bragantia* 65: 649-658.
- Ueda, H., Tachibana, Y., Moriayasu, M., Kawanishi, K.M., Alves, S.M. 2001. Aldose reductase inhibitors from the fruits of *Caesalpinia ferrea* mart. *Phytomedicine* 8: 377-381.
- Vandresen, J., Nishidate, F.R., Torezan, J.M.D., Zangaro, W. 2007. Inoculação de fungos micorrízicos arbusculares e adubação na formação e pós-transplante de mudas de cinco espécies arbóreas nativas do sul do Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 21: 753-765.
- Venkateswaslu, B., Pirat, M., Kishore, N., Rasul, A. 2008. Mycorrhizal inoculation in neem (*Azadirachta indica*) enhances azadirachtin content in seed kernels. *World Journal Microbiology Biotechnology* 24: 1243-1247.
- Vermerris, W.; Nicholson, R. 2006. *Phenolic compound biochemistry*. Springer.
- Vierheilig, H., Gagnon Hubert, Strack, D., Maier, W. 2000. Accumulation of cyclohexenone derivatives in barley, wheats and maize roots in response to inoculation with different arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 9: 291-293.
- Walter, M.H., Fester, T., ArStrack, D. 2000. Arbuscular mycorrhizal fungi induce the no-mevalonate methylerythritol phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis correlated

- with accumulation of the 'yellow pigment' and other apocarotenoids. *The Plant Journal* 21:571-578.
- Weber, O.B.; Souza, C.C.M., Dondin D.M.F., Oliveira, F.N.S., Crisostomo, L.A., Caproni, A.L.; Saggin Júnior, O. 2004. Inoculação de fungos micorrizicos arbusculares e adubação fosfatada em mudas de cajueiro-anão-precose. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 39: 477-483.
- Wright, D.P., Scholes, J.D., Read, D.J. 1998. Effects of VA mycorrhizal colonization on photosynthesis and biomass production of *Trifolium repens* L. *Plant, Cell and Environment* 21: 209-216.
- Wu, J.-H., Tung, Y.-T., Wang, S.-Y., Shyur, L.-F., Kuo, Y.-H., Chang, S.-T. 2005. Phenolic antioxidants from the heartwood of *Acacia confusa*. *Journal of Food Chemistry* 53: 5917-5921.
- Yadav, K., Aggarwal, A., Singh, N. 2013. Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) induced acclimatization, growth enhancement and colchicines of micropropagated *Gloriosa superba* L. plantlets. *Industrial Crops and Products* 45: 88-93.
- Yano-Melo, A. M., Saggin Jr, O. J., Maia, L. C. 2003. Tolerance of mycorrhized banana (*Musa* sp. Cv. Pacovan) plantlets to saline stress. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 95: 343-348.
- Yao, M.k., Désilets, H., Charles, M.T., Boulanger, R., Tweddell, R.J. 2003. Effect of mycorrhization on the accumulation of rishitin and solavetivone in potato plantlets challenged with *Rhizoctonia solani*. *Mycorrhiza* 13: 333-336.
- Yao, Q., Zhu, H.H., Hu, Y.L., Li, L.Q. 2008. Differential influence of native and introduced arbuscular mycorrhizal fungi on growth of dominant and subordinate plants. *Plant Ecology* 196: 261-268.
- Zhang, Q-R., Zhu, H-H., Zhao, H-Q., Yao, Q. 2013. Arbuscular mycorrhizal fungal inoculation increases phenolics synthesis in clover roots via hydrogen peroxide, salicylic acid and nitric oxide signaling pathways. *Jornal of Plant Physiology* 170: 74-79.
- Zimare, S.B., Borde, M.Y., Jite, P.K., Malpathak, N.P. 2013. Effect of AM Fungi (*Gf*, *Gm*) on biomass and gymnemic acid content of *Gimnema silvestre* (Retz.) R. Br. ex Sm. *Proceedings of the National Academy of science* 83: 439-445.
- Zuannazzi, J.A.S., Montanha, J.A. 2003. Flavonóides. In: Simões, C.M.O., Sebenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P.; Mentz, L.A., Petrovick, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5 ed. rev. Ampl. – Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRG/Editora da UFSC. Pp. 577-614.
- Zubek, S., Mielcarek, S., Turnau, K. 2012. Hipericin and pseudohypericin concentrations of a valuable medicinal plant *Hypericum perforatum* L. are enhanced by arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 22:149-156.
- Zubek, S., Stojakowska, A., Anielska, T., Turnau, K. 2010. Arbuscular mycorrhizal fungi alter thymol derivative contents of *Innula esnsifolia* L. *Mycorrhiza* 20: 497-504.