

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-  
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**Análise cromatográfica, morfológica e molecular da síntese do oleoresina em plantas jovens de *Copaifera multijuga* Hayne (FABACEAE – CAESALPINIOIDEAE)**

**ANA PAULA MENEZES RODRIGUES BASTOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multi-Institucional em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção de conclusão de Doutorado em Biotecnologia.

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Junior**

**CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho**

**MANAUS-AM  
2011**

## SUMÁRIO

1	RESUMO.....	6
2	OBJETIVOS.....	7
3	INTRODUÇÃO.....	8
	CAPÍTULO 1.....	14
	CAPÍTULO 2 .....	33
	CAPÍTULO 3.....	47
4	CONCLUSÕES GERAIS.....	61
5	REFERÊNCIAS BIBLIGRÁFICAS.....	64

**Lista de abreviaturas**

<b>MEV</b>	Microscopia Eletrônica de Varredura
<b>ESTs</b>	Expressed Sequence Tags
<b>cDNA</b>	DNA complementar
<b>mRNA</b>	RNA mensageiro
<b>DAP</b>	Diâmetro à Altura do Peito

Ficha Catalográfica  
realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

(Catalogação

Bastos, Ana Paula Menezes Rodrigues

Análise cromatográfica, morfológica e molecular da síntese do oleoresina em plantas jovens de *Copaifera multijuga* Hayne (Fabaceae – Caesalpinioideae) / Ana Paula Menezes Rodrigues Bastos. - Manaus: UFAM, 2013.

65 f.; il. color.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) — Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2013.

Orientador: Dr. Valdir Florêncio da Veiga Junior

Co-orientador: Dr. Spartaco Astolfi Filho

1. Plantas medicinais 2. Óleos essenciais 3. *Copaifera multijuga* Haney I. Veiga Junior, Valdir Florêncio da (Orient.) II. Astolfi Filho, Spartaco III. Universidade Federal do Amazonas IV. Título

CDU 616.314-084(=1-82)(043.3)

## **Agradecimentos**

*A Deus por esta vida e oportunidade;*

*A minha mãe (Alcione Menezes) que me inspirou nos estudos desde sempre;*

*Ao meu marido (Eduardo H. Da Silva Bastos) por estar sempre ao meu lado e me amar do jeito que sou;*

*A minha madrinha por ser também minha mãe na Terra a mais de 25 anos;*

*Ao meus sogros que sempre me apoiam dos estudos e na vida;*

*Aos meus irmãos-colegas de pesquisa (Danival e Carlos Gustavo) não deixaram de acreditar e me ajudaram durante esta jornada;*

*Ao mateiro (Cilo) que me ajudou a encontrar as plantas medicinais e também o caminho de volta da floresta;*

*Aos meus colegas-amigos da botânica, Alexandre e Ressiliane, agora um casal lindo que servi de cupido.*

*Ao grupo do QBioma que sempre com toda a paciência ensinando a bióloga aqui as extrações;*

*Ao CBA pelo apoio técnico das análises dos extratos;*

*A UFV pelo apoio na microscopia eletrônica da planta copaíba;*

*Aos meus orientadores que acreditaram neste trabalho e a paciência comigo.*

## 1. RESUMO

As plantas adultas do gênero *Copaifera* são conhecidas por possuírem um dos óleos resina mais utilizados na medicina popular, ao qual creditam-se diversas propriedades farmacológicas e cosméticas. Na planta, o óleo resina, produzido no xilema secundário, é utilizado para sua defesa contra diversos agentes internos e externos. Neste trabalho analisou-se o óleo essencial extraído em plantas jovens de *Copaifera multijuga* Hayne, a fim de confirmar a presença de seqüências codificadoras de enzimas responsáveis pela síntese do óleo e gerar uma biblioteca de cDNA. Para a extração do óleo foi usada a técnica de arraste a vapor em aparelho de clewenger modificado e a seguir a análise espectrofotométrica de massas para classificação dos compostos sesquiterpênicos (óleo essencial). Na análise cromatográfica permitiu a identificação de vários compostos presentes tanto na planta jovem quanto na planta adulta do gênero *Copaifera*, como:  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -copaeno, D germacreno,  $\alpha$ -humuleno,  $\delta$ -cadineno,  $\gamma$ -elemeno,  $\alpha$ -cubebeno e  $\alpha$ -bergamoteno entre outros minoritários estudados. Numa abordagem histoquímica utilizou-se métodos microscópicos para localizar canais secretores da planta, onde lâminas foram preparadas utilizando o micrótomo semi-automático, coradas em solução de azul de toluidina e em reagente de NADI. Após estas análises, comprovada a presença desses ductos secretores em folhas jovens, foi construída uma biblioteca de cDNA, utilizando-se como fonte de mRNA material biológico similar (folhas jovens de *C. multijuga*), sendo posteriormente seqüenciado seus nucleotídeos por meio de pirosequenciamento, o qual foi analisado por biologia computacional, utilizando-se programas que priorizaram a biossíntese dos terpenos e sesquiterpenos, onde suas seqüências codificadoras de enzimas foram encontradas, mostrando envolvimento do mRNA na construção do óleo essencial em plantas não adultas desta espécie. A utilização de técnicas cromatográficas para identificação de compostos fitoquímicos, aliadas a métodos histológicos e posteriormente ao seqüenciamento de genes expressos de folhas jovens e, portanto secretoras de óleo resina, permitiram a confirmação da biossíntese de diversas substâncias presentes nesse óleo, bem como suas rotas metabólicas. Esses dados são apresentados pela primeira vez conjuntamente, acreditando-se que possam contribuir para a abertura de novas fronteiras na pesquisa e no desenvolvimento de biotecnologias baseadas em seus resultados.

Palavras-chave: *Copaifera multijuga* Haney, sesquiterpenos, óleoresina.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Geral

- ✓ Proceder análise cromatográfica, morfológica e molecular da produção do oleoresina por plantas jovens de *Copaifera multijuga* Hayne (Fabaceae-Caesalpinioideae).

### 2.2 Específicos

- ✓ Averiguar a presença de substâncias sesquiterpênicas em plantas jovens de *C. multijuga*;
- ✓ Determinar a distribuição dos locais de armazenamento (canais secretores) do oleoresina em plantas jovens de *C. multijuga*;
- ✓ Identificar seqüências codificadoras de proteínas (enzimas) envolvidas nos processos metabólicos especiais dos terpenos nas folhas compostas de plantas jovens desta espécie;
- ✓ Comparar as seqüências encontradas com seqüências homólogas e/ou similares registradas em Bancos de Genes conhecidos em outras espécies de plantas.

### 3. INTRODUÇÃO

A família Fabaceae é constituída por cerca de 650 gêneros e 18.000 espécies e no Brasil, o gênero *Copaifera* destaca-se sob o ponto de vista econômico pela produção de óleo de copaíba extraído a partir do tronco de suas espécies (SOUZA, LORENZI, 2008). Essas plantas são popularmente conhecidas como copaibeiras, distribuídas na região Amazônica e centro-oeste brasileiro. Dentre as espécies produtoras do óleo de copaíba destacam-se *C. guianensis*, *C. reticulata*, *C. confertiflora*, *C. langsdorfii*, *C. coriacea*, *C. cearensis* e *C. multijuga* (VEIGA JUNIOR, PINTO, 2002; MARTINS-DASILVA *et al*, 2008).

A origem do nome copaíba se relaciona ao idioma indígena tupi “cupa-yba”, que significa árvore do depósito, em alusão ao óleo extraído do tronco de espécies do gênero, usado popularmente como anti-inflamatório, anti-séptico em feridas, eczemas, na psoríase e urticária; anti-inflamatório das vias urinárias, em afecções pulmonares; contra desinteria, cistite, leucorréia, úlceras e antitumoral (BIAVATTI *et al.*, 2006). Embora não sejam encontrados estudos clínicos em humanos, ensaios sobre a atividade biológica desse óleo em mamíferos têm sido realizados (LIMA *et al.*, 2003; PAIVA *et al.*, 2004; FALCÃO *et al.*, 2005). As copaibeiras representam um recurso medicinal de grande importância no tratamento e cura de várias doenças (VEIGA-JUNIOR, PINTO, 2002; VEIGA-JUNIOR *et al.*, 2001; LIMA *et al.*, 2003). O oleoresina produzido no xilema secundário no tronco é constituído de sesquiterpenos e diterpenos, porém suas concentrações diferenciadas entre as espécies do gênero (GERIS *et al*, 2008; BARRETO-JÚNIOR *et al*, 2005).

Análises químicas comprovaram a presença de ácidos resinosos e substâncias voláteis no óleo de copaíba do tronco de plantas adultas de *C. multijuga* na Amazônia



(BIAVATTI *et al.*, 2006). Terpenos como o óxido de cariofileno e o  $\delta$ -cadineno são comuns em plantas adultas de *C. multijuga*, sendo estas substâncias responsáveis pelo aroma adocicado do óleo essencial das copaibeiras (SANT'ANNA *et. al.*, 2007).

O óleo de copaíba pode ser extraído da planta adulta por um orifício feito no cerne e desse canal sai um líquido durante cerca de 24 horas, podendo ser extraído até 20 Litros. O óleo de copaíba nas últimas três décadas foi exportado do Brasil para, principalmente, França, Alemanha, Inglaterra e Estados Unidos, este último o principal importador, alcançando 20,8 toneladas no ano de 1973. Segundo os últimos dados do IBGE, a Alemanha foi o país que mais importou o óleo de copaíba, superando Estados Unidos e França (VEIGA-JUNIOR, PINTO, 2002). O óleo de copaíba é citado tendo potencial como combustível, sendo utilizado na mistura com óleo diesel (CALVIN, 1983).

Em *C. langsdorfii*, o aumento na produção do óleo-resina possui uma relação com o ataque de herbívoros, uma vez que os terpenóides sintetizados por estas plantas são utilizados para sua defesa contra agentes externos, como insetos, podendo inclusive ter sua síntese aumentada em resposta ao ataque de herbívoros (FIEBERT, LANGENHEIM, 1988). Pelo homem estes terpenos são utilizados em cosméticos e fármacos (CROCK, WILDUNG, CROTEAU, 1997; GREENHAGEN *et al*, 2006).

Apesar de jovem o conhecimento químico sobre alguns sesquiterpenos encontrados no gênero *Copaifera* (figura 1), estudos se fazem necessários para elucidar a estrutura e histoquímica dos canais secretores de plantas jovens de diversas espécies identificadas.

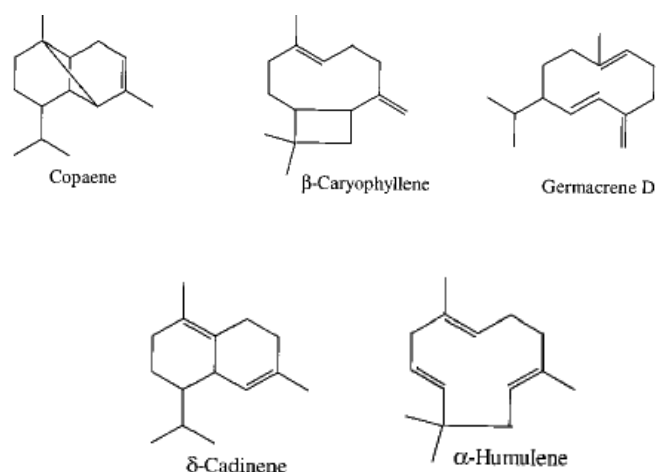


Figura 1: Alguns sesquiterpenos encontrados no gênero *Copaifera*:

A variação e concentração dos compostos voláteis sintetizados por estes vegetais podem ser determinadas pela interação inseto-planta, dependendo do tempo de contato com o inseto e da quantidade do mesmo, o que caracteriza o aroma do óleo. Essa capacidade adaptativa foi vista em plantas, como *Arabidopsis thaliana*, nas quais foi produzido um cis-jasmone pelo metabolismo secundário por uma análise de seu transcriptoma (BRUCE *et al*, 2008).

Considera-se que uma das principais funções do metabolismo secundário nas plantas seja a biossíntese de estruturas complexas como alcalóides, terpenóides e derivados de fenilpropanóides. Tais estruturas funcionariam como agentes defensivos na luta contra predadores, a exemplo de microrganismos patogênicos, insetos e outros animais herbívoros. Além disso, em outras diversas situações de estresses bióticos, além dos abióticos, novas rotas biossintéticas são iniciadas a partir de metabólitos primários, desencadeando a produção de uma grande variabilidade de substâncias químicas (REINHARD *et al*, 2004; GOBBO-NETO, LOPES, 2007).

Na via biossintética dos terpenos, essas moléculas podem ser formadas tanto no citosol quanto em plastídeos, a partir de moléculas precursoras do metabolismo

primário: acetil coenzima A, gliceraldeído-3-fostato e piruvato (PICHESKY, NOEL, DUDAREVA, 2007). Na presença de uma ameaça, as moléculas precursoras primárias podem fornecer uma fonte de isoprenóides importantes na produção dos terpenos. Estudos realizados com plantas adultas revelaram uma relação na produção de monoterpenos e a herbivoria, sugerindo que o rendimento está acompanhado da defesa química da planta no meio ambiente (GORALKA, LANGENHEIM, 1996).

De maneira geral, os componentes formadores do óleo em plantas utilizam uma grande diversidade de esqueletos de carbono, como C5 (hemiterpeno), C10 (monoterpeno), C15 (sesquiterpeno) e C20 (diterpeno) que são da família química dos terpenóides. As vias biossintéticas de terpenos são divididas em várias etapas e engloba a síntese do isopentenil difosfato condensado em duas unidades de C5 e subseqüentes adições para gerar farnesil difosfato (FDP) e geranylgeranyl difosfato (GGDP). Assim, estas transformações são catalisadas por sintases terpenóides e pode ser seguida por uma variedade de modificações redox nos esqueletos de carbono para produzir milhares de metabólitos terpenóides diferentes nos óleos-resina de origem vegetal (DUDAREVA *et al*, 2004).

Poucos são os conhecimentos sobre a genética que controla a variação natural quantitativamente e qualitativamente no metabolismo secundário (DE CARVALHO; DA SILVA, 2010).

Muitos eventos relacionados à produção de metabólitos secundários em resposta a vários estímulos são resultantes da alteração na expressão gênica. A análise da função do gene necessita, conseqüentemente, da análise temporal e espacial dos padrões de sua expressão. A informação mais conclusiva sobre mudanças nos níveis da expressão gênica pode ser obtida através da análise de mudanças qualitativas e

quantitativas dos RNAs, proteínas e metabólitos. A determinação qualitativa e quantitativa dos níveis de transcritos de células vegetais permite que genes, diferencialmente expressos, possam ser identificados e, conseqüentemente, sua função metabólica possa ser investigada. Portanto, o conhecimento da localização celular dos genes transcritos é essencial, a fim de avaliar a função dos genes em um contexto integrado (AHARONI; VORST, 2001).

A distribuição e composição dos terpenos variam de acordo com cada espécie e o entendimento na composição volátil é o alvo para a síntese dos terpenóides (DUDAREVA *et al*, 2004). Dentre os métodos de estudo da síntese dos terpenos em plantas um deles é a identificação de seqüências codificadoras de enzimas das vias de síntese por meio de seqüenciamento de bibliotecas de cDNA (CLOONAN *et al*, 2008).

Dessa maneira constitui uma interessante abordagem, o uso de espécies do gênero *Copaifera* como modelo para a criação de uma biblioteca de cDNA para seqüências codificadoras de compostos do óleo essencial desse grupo de plantas.

As plantas medicinais têm sido usadas há muito tempo pelos povos indígenas e conseqüentemente, por outros grupos no tratamento de uma ampla gama de enfermidades, desempenhando um papel chave na saúde no mundo. Essas plantas oferecem várias vantagens culturais, baixo custo, e eficácia no tratamento de malefícios. Deve-se reforçar a preocupação em relação à utilização incorreta de medicamentos fitoterápicos pela população. É fundamental aumentar o apoio à pesquisa científica, envolvendo tais produtos, para incrementar os conhecimentos relacionados à sua eficácia e segurança, e assim, poder lançar mão dessa terapia na cura e prevenção de doenças.

A utilização de técnicas cromatográficas de isolamento fitoquímico aliadas a métodos espectrométricos e espectroscópicos de análise podem permitir a detecção e identificação de diversas substâncias nos óleos dos isolados de *C. multijuga*.

## CAPÍTULO 1

### ANÁLISE FITOQUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E HISTOLÓGICA DA FOLHA EM PLANTA JOVEM de *Copaifera multijuga* Haney (FABACEAE)

**Resumo:** A planta adulta do gênero *Copaifera* é conhecida por produzir um óleo-resina no xilema secundário com diversas propriedades farmacológicas e cosméticas. Neste trabalho foram determinados o perfil fitoquímico do eixo vegetativo e parâmetros morfo-anatômicos da folha de planta jovem de *Copaifera multijuga* Hayne, uma vez que não existem dados na literatura sobre a presença de óleo em tal fase dessas plantas. A extração do óleo foi pela técnica de arraste a vapor em aparelho de Clevenger modificado e a espectrometria de massas com o objetivo de confirmar a presença de sesquiterpenos. Métodos microscópicos também foram usados para localizar dos canais secretores em folhas, onde lâminas foram preparadas utilizando o micrótomo semi-automático, coradas em solução de azul de toluidina que obteve a maior diversidade de sesquiterpenos em relação às outras partes da planta. A análise por cromatografia em fase gasosa permitiu a identificação de vários compostos que estavam presentes tanto na planta adulta quanto na planta jovem, como:  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -copaeno, D germacreno,  $\alpha$ -humuleno,  $\delta$ -cadineno,  $\gamma$ -elemeno,  $\alpha$ -cubebeno e  $\alpha$ -bergamoteno entre outros minoritários existentes em todos os isolados estudados desta espécie. Os resultados demonstram que possivelmente os ductos secretores são os responsáveis pela produção de óleos essenciais. Foi visualizado por microscopias (óptica e eletrônica) da região foliar nas estruturas secretoras em forma de canal podendo-se visualizar inclusive a presença de estruturas contendo óleos essenciais.

Palavras-chave: *Copaifera multijuga* Haney, sesquiterpenos, óleo-resina.

## INTRODUÇÃO:

A *Copaifera multijuga* Haney pertence à família Fabaceae, sub-família Caesalpinioideae, vulgarmente conhecida como pau d'óleo, copaibeira, óleo-de-copaíba, sendo endêmica na região da Amazônia Central do Brasil (Veiga-Junior, Pinto, 2002). As copaibeiras representam um recurso medicinal popular de grande importância no tratamento e cura de várias doenças (Veiga-Junior, Pinto, 2002; Veiga-Junior *et al.*, 2001; Lima *et al.*, 2003).

A extração do óleo no gênero *Copaifera* é feita, a partir de um orifício de 1-2 cm de diâmetro, no tronco da árvore até o cerne da planta. O óleo é drenado pelo canal, durante cerca de 24 horas, onde seu rendimento, dependendo das condições da planta, aproximadamente 20 L. Desde 1980 já eram citados os potenciais do óleo de copaíba como combustível, sendo utilizado na mistura com óleo diesel (Calvin, 1980).

O óleoresina produzido no xilema secundário no tronco é constituído de sesquiterpenos e diterpenos, porém nas concentrações diferenciadas entre as espécies do gênero (Barreto Júnior *et al.*, 2005; Geris *et al.*, 2008), ocorrendo flutuações na quantidade produzida, condicionada, por exemplo, a porcentagem de herbivoria sob a qual a planta se encontra (Fiebert, Langenheim, 1988). Essa capacidade adaptativa já foi vista em plantas da espécie *Arabidopsis thaliana*, na qual, foi produzido um cis-jasmone pelo metabolismo especial por uma análise de seu transcriptoma (Bruce *et al.*, 2008).

Outros fatores bióticos aumentam o rendimento durante a extração do óleo em *Copaifera spp.* os quais são também dependentes do DAP maior que 41cm, pois as plantas adultas recuperam a produção de óleo mais rapidamente (Medeiros, Vieira, 2008).

As variações na concentração de sesquiterpenos podem ser observadas durante o ano em *C. reticulata*, *C. dukei* e *C. martii*, mas as diferenças nos percentuais dessas substâncias ocorreram independentes da sazonalidade (Oliveira *et al*, 2006).

Durante o ataque de predadores (estresses biótico) a planta aumenta a síntese de produtos derivados do metabolismo especial para sua defesa e homeostase, a exemplo de microorganismos patogênicos, insetos e animais herbívoros (Reinhard *et al.*, 2004). Além disso, em diversas situações de estresses (bióticos e abióticos), novas rotas biossintéticas podem ser iniciadas a partir de metabólitos primários, desencadeando a produção de substâncias químicas com grande variabilidade estrutural (Pichersk *et al*, 2007).

O objetivo deste trabalho foi verificar a presença e a composição dos óleos essenciais voláteis em plantas jovens de *C. multijuga*, uma vez que esses dados não são encontrados na literatura. Também foram realizadas técnicas microscópicas para análise morfológica da folha para localizar os canais secretores na planta jovem desta espécie.

## **Material e Métodos:**

### *Material Vegetal*

Plantas jovens de *Copaifera multijuga* Hayne foram obtidas no Viveiro de Plantas Medicinais da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), cujas sementes foram selecionadas para reflorestamento e suas matrizes usadas para classificação da espécie. Todo o material vegetal foi obtido de indivíduos que possuíam entre 1 e 1,5 m de altura medidos da raiz ao caule e tendo suas partes foliares, caule e raiz separados para as análises experimentais.



### *Extração dos óleos essenciais*

As amostras frescas foram coletadas e pesadas (folhas = 30g, caule = 25g e raiz = 20g) e submetidas à hidrodestilação por um período de 3 h, utilizando aparelho do tipo Clevenger modificado. Os óleos essenciais obtidos foram desidratados com sulfato de sódio anidro, acondicionados em pequenos frascos de vidro âmbar e mantidos sob refrigeração. O cálculo do rendimento foi realizado através da relação da massa do óleo obtido com a massa de material vegetal utilizada na extração.

### *Análise dos óleos essenciais*

Os óleos essenciais obtidos foram submetidos à análise por cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama (CG-DIC) para a análise quantitativa e determinação dos índices de retenção, e por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM), para a obtenção dos espectros de massas.

### *Análise em CG-DIC*

Os óleos foram diretamente analisados em cromatógrafo em fase gasosa modelo CG 2010 da Shimadzu<sup>®</sup> e a detecção feita por ionização de chama (DIC). As análises foram realizadas com coluna CP-Sil 5 CB (100 % dimetilpolisiloxano) da Varian<sup>®</sup>, com medidas de 15 m x 0,25 mm x 0,25 µm, sendo utilizado como gás de arraste hélio (He) em fluxo de 2,0 mL/min. A injeção em modo split 1:10 foi realizada com injetor a 250 °C. A temperatura do detector foi de 290 °C e o forno foi programado de 60°C a 180 °C a 3 °C/min. Foram co-injetados padrões de hidrocarbonetos lineares para a determinação dos índices de retenção.

### *Análise em CG-EM*

Após a análise por CG-DIC, os óleos foram analisados em cromatógrafo em fase gasosa modelo QP-2010 da Shimadzu© e a detecção feita por espectrometria de massas (CG-EM). As análises foram realizadas com coluna VF-1MS da Varian©, com medidas de 15 m x 0,25 mm x 0,25 µm. As condições da análise foram as mesmas utilizadas por CG-DIC. Para a detecção, foi aplicada a técnica de impacto eletrônico a 70eV.

### *Identificação dos constituintes dos óleos essenciais*

A determinação da composição química dos óleos essenciais foi realizada através dos dados de tempo de retenção, obtidos por CG-DIC, e dos espectros de massas, obtidos por CG-EM. Os índices de retenção foram calculados utilizando a equação de Van der Dool-Kratz, relacionando os tempos de retenção das substâncias presentes nos óleos essenciais com os tempos de retenção de uma série homóloga de hidrocarbonetos lineares (C9-C22) que foi co-injetada com a amostra. Os índices de retenção e os espectros de massas foram comparados com dados da literatura (Adams, 2007).

### *Microscopia de luz*

Amostras de folhas de plantas jovens de *C. multijuga* foram fixadas em FAA 50 (1 formaldeído: 1 ácido acético glacial: 18 etanol 50 %, v/v) (Johansen, 1940), preservadas em etanol 70 % (Jensen, 1962), desidratadas em série crescente do mesmo álcool, incluídas em historesina hidroxietilmetacrilato Leica® conforme instruções do fabricante, e seccionadas em micrótomo semi-automático Leica® RM 2145. Secções com 10 µm foram coradas em solução aquosa de azul de toluidina em

pH 4.7 (O' Brien *et al.*, 1964) e montadas com resina sintética Permunt<sup>®</sup>. Secções manuais de material fresco foram submetidas à reação com cloreto férrico a 10% para detecção de compostos fenólicos e Sudan IV para detecção de lipídios gerais (Johansen, 1940). Para confirmação da presença de óleos essenciais foi usado reagente de NADI (David, Carde, 1964).

As principais características anatômicas foram registradas com auxílio de fotomicroscópio ZEISS<sup>®</sup>. As escalas referentes às fotomicrografias foram obtidas com lâmina micrométrica nas mesmas condições ópticas do microscópio utilizado.

#### *Microscopia eletrônica de varredura (SEM)*

A estrutura axial dos canais de secretores foi confirmada por análise de superfície. Amostras foram fixadas em glutaraldeído 2,5 % em tampão fosfato pH 7.0, desidratadas em série crescente de soluções de etanol, secas em ponto crítico com CO<sub>2</sub> em secador de ponto crítico Bal-Tec CPD 030, e metalizadas com ouro a 30 mV em metalizador Balzers SCD 010. Stubs com as amostras foram examinados, sendo as principais características ultraestruturais registradas em microscópio eletrônico de varredura LEO 1430 VP. As escalas referentes às eletromicrografias foram obtidas nas mesmas condições ópticas do microscópio utilizado (Silveira, 1989).

### **Resultados e Discussão:**

A técnica de arraste de vapor para caracterização do óleo em partes de plantas adultas de vários gêneros é bem utilizada, como os tecidos foliares da planta pindaíba (*Xylopia brasiliensis*), sendo o óleo constituído principalmente de óxido de cariofileno. O óleo obtido foi submetido a uma análise espectrométrica, utilizando-se um aparelho de infravermelho e um espectrofotômetro de massa (Santos *et al.*, 2004).

O óleo essencial da planta jovem de *C. multijuga* foi extraído pela técnica de arraste a vapor com o rendimento médio de 1%, mostrando a eficiência desta técnica. As análises cromatográficas (CG e CG-EM) permitiram a identificação de diversos constituintes do óleo. Os óleos essenciais obtidos das várias partes da planta jovem mostraram pequenas variações na composição de sesquiterpenos, contendo  $\beta$ -cariofileno como constituinte majoritário em todas as partes estudadas.

Em Fabaceae-Cesalpinioideae, do gênero *L. hymemean* (jatobá), os componentes majoritários foram cariofileno e  $\alpha$ - e  $\beta$ -selineno e entre outros sesquiterpenos em menor quantidade que podem variar de acordo com a espécie e populações (Martdp, Langenheim, 1976). O rendimento dos componentes biossintéticos (sesquiterpenos) pode ser controlado sob condições ambientais ajustadas, mas não sua composição nos dois gêneros de leguminosas (*Hymenaea* e *Copaifera*) que varia de espécie para espécie (Feibert, Langenheim, 1988).

Componentes terpênicos são bem característicos de cada gênero, em planta jovem de *C. multijuga*, onde foram identificados compostos encontrados em planta adulta, importantes para sua defesa. Para manter a folha protegida contra ataque de herbívoros existe um significativo aumento da resina nesta região para sua defesa e, além disso, mostrou-se que a umidade não influencia na produção do oleoresina em *C. multijuga* (Feibert, Langenheim, 1988).

Durante monitoramento do estágio de desenvolvimento foliar (expansão e esclerificação) de diferentes copaíbas (*C. pubiflora*, *C. officinalis* e *C. venezuelana*) comparada com a folha adulta de *C. langsdorfii* foram observadas diferenças na composição dos seguintes sesquiterpenos: cariofileno e  $\alpha$ - e  $\beta$ -selineno (Langenheim *et al.*, 1986). Essas variações também foram observadas por diferentes fatores externos

que podem alterar as composições sesquiterpênicas, como a herbivoria, intensidade de luz, umidade, falta de água, nível de oxigênio e os tipos de solos (Macedo, Langenheim, 1989; Langenheim *et al.*, 1981; Nascimento, Langenheim, 1986; Gobbo-Neto, Lopes, 2007).

Nas partes foliares da planta jovem foi verificada maior diversidade de substâncias, sendo 36 identificadas, no total (92% da amostra). Alguns desses compostos foram comuns aos óleos essenciais das outras partes enquanto outras foram encontradas apenas nas folhas, como guaiol, espatulenol e  $\alpha$ -eudesmol (Tabela 1).

No gênero *Hymemea* possuem cariofileno e  $\alpha$  e  $\delta$ -selineno em seus compostos majoritários no seu óleo resina, e o  $\beta$ -copaeno, cubebeno, humuleno, muuroleno e o  $\delta$  e  $\lambda$ -cadineno em menor quantidade, demonstrando que os sesquiterpenos também podem ser encontrados em outros gêneros da família das Fabaceae (Martdp, Langenheim, 1976).

No caule e na raiz foram detectadas 16 substâncias, com composição qualitativa e quantitativa semelhantes, observando-se, como majoritárias:  $\alpha$ -copaeno, D germacreno,  $\alpha$ -humuleno,  $\delta$ -cadineno,  $\gamma$ -elemeno,  $\alpha$ -cubebeno e  $\alpha$ -bergamoteno (Figuras 2 e 3). Nas partes foliares da planta jovem foi verificada maior diversidade de substâncias, 36 no total identificados (92% da amostra). Algumas delas foram comuns aos óleos essenciais das outras partes enquanto outras foram encontradas apenas nas folhas, como guaiol, espatulenol e  $\alpha$ -eudesmol (tabela 1).

### *Histoquímica*

Nos estudos cromatográficos neste trabalho foi observada uma maior diversidade de sesquiterpenos na folha jovem de *C. multijuga* e por este motivo foi realizado um estudo da anatomia vegetal da folha composta desta planta.

Na planta adulta de *Copaifera spp.*, o óleo é formado por canais esquizógenos localizados em todas as partes da planta (Cascon, 2004). Esses canais longitudinais secretores podem ser vistos no parênquima terminal nas camadas lenhosas do gênero (Alencar, 1982).

A folha é hipoestomática. O limbo do folíolo possui epiderme uniestratificada com células retangulares com cutícula espessa. Os tricomas são tectores unicelulares. O mesofilo é dorsiventral com uma camada de parênquima paliçádico e 3-4 camadas de parênquima lacunoso, interrompido por cavidades secretoras. A nervura central apresenta feixe vascular do tipo colateral, parênquima de preenchimento e idioblastos contendo cristais prismáticos de oxalato de cálcio (Fig. 4 e 5).

Peciólulo e pecíolo apresentam epiderme unisseriada, com células achatadas e cutícula espessa. O córtex parenquimático apresenta canais secretores com uma camada de células epiteliais e feixe vascular colateral (Fig. 6 e 7). Na raque, a epiderme formada por células retangulares de paredes delgadas, recobertas por cutícula espessa e tricomas tectores. Os canais secretores são constituídos por uma camada de células epiteliais que estão localizados no córtex e nos feixes vasculares colaterais (Fig. 8 e 9). No pecíolo a epiderme é similar à da raque e do peciólulo. Canais secretores com uma camada de células epiteliais conspícua são observados no córtex e na medula do feixe vascular (Fig. 10 e 11).

**Conclusões:**

A utilização de técnicas cromatográficas de isolamento fitoquímico aliadas a métodos espectrométricos e espectroscópicos de análise permitiram a detecção e identificação de diversas substâncias nos óleos dos isolados de *C. multijuga*, estudados pela primeira vez. Foram identificados sesquiterpenos, majoritariamente,  $\beta$ -cariofileno, mas também  $\alpha$ -humuleno, característico da espécie. Os resultados obtidos pela microscopia mostraram a presença dos óleos essenciais em planta jovem também presentes no óleo exsudado da planta adulta, indicando que a produção e acúmulo do óleo de copaíba deve se iniciar desde jovem.

**Referências Bibliográficas:**

- Adams RP 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. 4th edition. *Allured Publishing Corporation*.
- Alencar J 1982. Estudos silviculturais de uma população natural de *C. multijuga* Hayne –Leguminosae, na Amazônia Central. *Acta Amazônica* 12(1):79-82.
- Barreto-Júnior AGI; Biscaia-Junior EC; Veiga-Junior VF; Pinto AC; Carvalhaes SF de; Maciel MAM 2005. Ion exchange chromatography applied to the fractionation of the copaíba oil (*Copaifera multijuga*) and sacaca (*Croton cajucara*) extracts. *Quim Nova* 28(4).
- Bruce TJA; Matthes MC; Chamberlain K; Woodcock CM; Mohib A; Webster B; Smart LE; Birkett MA; Pickett JA; Napier JA 2008. *cis*-Jasmone induces *Arabidopsis* genes that affect the chemical ecology of multitrophic interactions with aphids and their parasitoids. *PNAS* 105(12):4553-4558.

- Calvin M 1980. Hydrocarbons from Plants: Analytical Methods and Observations. *Naturwissenschaften* (67):525-533.
- Cascon V 2004. Copaíba – *Copaifera* spp. In: Carvalho, JCT. Fitotrópicos antiinflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. Ribeirão Preto: Tecmedd, 480.
- David R; Carde JP 1964. Coloration différentielle des inclusions lipidique et terpeniques des pseudophylles du pin maritime au moyen du reactif Nadi. *Comptes rendus de Academie des Sciences D* 258:1338-1340.
- Feibert EB; Langenheim JH 1988. Leaf resin variation in *Copaifera langsdorfii*: relation to irradiance and herbivory. *Phytochem* 27(8):2521-2532.
- Fougère-Danezan M; Maumont S; Bruneau A 2007. Relationships among resin-producing *Detarieae* s.l. (Leguminosae) as Inferred by Molecular Data. *Syst Bot* 32(4):748-761.
- Geris R; Silva IG da; Silva HHG da; Barison A; Rodrigues-Filho E; Ferreira AG 2008. Diterpenoids from *Copaifera reticulata* Ducke with larvicidal activity against *Aedes aegypti* (L.) (Diptera, Culicidae). *Rev Inst Med Trop* 50(1):26-28.
- Gobbo-Neto L; Lopes NP 2007. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quim Nova* 30(2):374-381.
- Jensen WA 1962. Botanical histochemistry: principle and practice. San Francisco: W.H. Freeman.
- Johansen DA 1940. Plant Microtechnique. New York: Mc Graw Hill. Book.
- Langenheim JH; Arrhenius SP; Nascimento JC 1981. Relationship of light intensity to leaf resin composition and yield in the tropical leguminous genera *Hymenaea* and *Copaifera*. *Biochem System and Ecol* 9(1):27-37.



Langenheim JH; Macedo CA; Ross MK; Stubblebine WH 1986. Leaf development in the tropical Leguminous tree *Copaifera* in relation to microlepidopteran herbivoty. *Biochem System and Ecol* 14(1):51-59.

Lima SEM; Veiga-Junior VF; Christo HB; Pinto AC; Fernandes PD 2003. In vivo and in vitro studies on the anticancer activity of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. *Phytother Res* 17:1048-1053.

Macedo CA; Langenheim JH 1989. Microlepidopteran Herbivory in Relation to Leaf Sesquiterpenes in *Copaifera langsdorfii* Adult Trees and their Seedling Progeny in a Brazilian Woodland. *Biochem System and Ecol* 17(3):217-224.

Martdp SS; Langenheim JH 1976. Biosynthesis of sesquiterpenes in *Hymenaea* inferred from their quantitative co-occurrence. *Phytochem* 15:113-119.

Nascimento JC; Langenheim JH 1986. Leaf sesquiterpenes and phenolics in *Copaifera multijuga* on contrasting soil types in a Central Amazonian rain forest. *Biochem System and Ecol* 14(6):615-624.

O' Brien TP, Feder N; McCully ME 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. *Protoplasma* 59:368-373.

Oliveira ECP; Lameira, OA; Zoghbi MGB 2006. Identificação da época de coleta do óleo-resina de copaiba (*Copaifera spp.*) no município de Moju, PA. *Rev. Bras. Pl. Med.* 8(3):14-23.

Pichersky E; Noel JP; Dudareva N 2007. Biosynthesis of Plant Volatiles: Nature's Diversity and Ingenuity. *Science* 311 (5762):808-811.

Reinhard J; Srivivasan MV; Zhang S 2004. Scent-triggered navigation in honeybees. *Nature* 427:411.

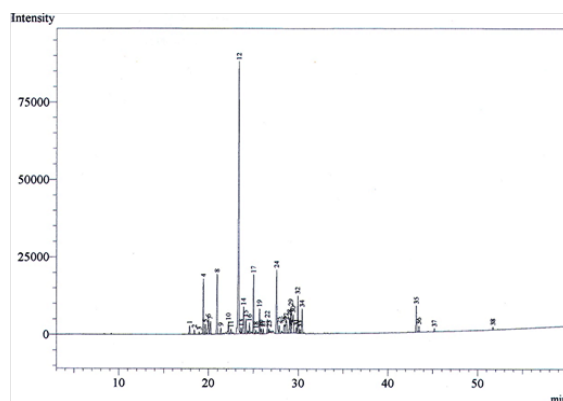
Santos BR; Paiva R; Castro EMde; Cardoso MdasG; Rezende RKS; Paiva PDdeO 2004. Aspects of the anatomy and essential oil in leaves of pindaíba (*Xylopia brasiliensis* Spreng.) *Ciênc agrotec* 28(2):345-349.

Silveira M O 1989. O preparo de amostras biológicas para microscopia de varredura. In Manual sobre técnicas básicas em microscopia eletrônica de varredura: técnicas básicas. (Souza, W., ed) Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica,71-79.

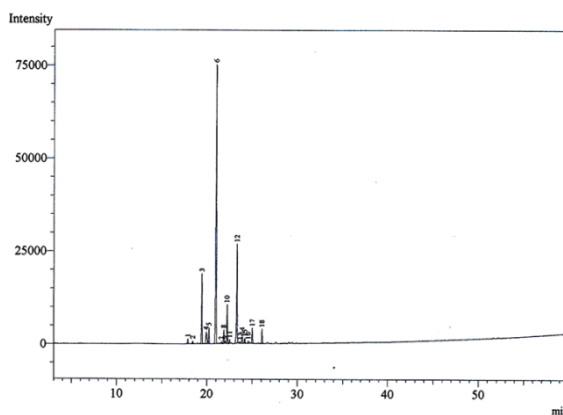
Veiga-Junior VF; Pinto A C 2002. O gênero *Copaifera* L. *Quim Nova* 25(2):273-286.

Veiga-Junior VF; Zunino L; Calixto JB; Patitucci ML; Pinto AC 2001. Phytochemical and antioedematogenic studies of commercial copaiba oils available in Brazil. *Phytotherapy Res* 15(6):476-480.

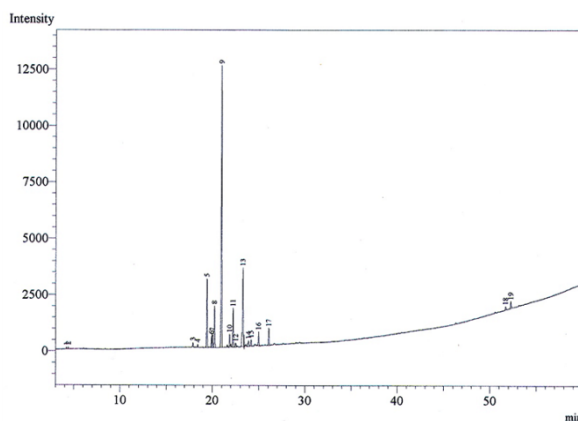
**Figura 1** Cromatograma de íons totais do óleo essencial das folhas de plantas jovens de *Copaifera multijuga* Hayne.



**Figura 2** Cromatograma de íons totais do óleo essencial do caule de plantas jovens de *Copaifera multijuga* Hayne.



**Figura 3** Cromatograma de íons totais do óleo essencial da raiz de plantas jovens de *Copaifera multijuga* Hayne.



**Tabela 1.** Principais constituintes do óleo essencial da folha em planta jovem de *C. multijuga* Hayne.

<b>Pico</b>	<b>Substância</b>	<b>Percentual</b>	<b>Índice de Retenção</b>
4	$\alpha$ -cubebeno	5,06	1.345
6	$\alpha$ -copaeno	1,79	1.386
7	$\alpha$ -elemeno	1,21	1.409
8	cis-cariotileno	5,74	1.486
10	$\alpha$ -humuleno	1,43	1.577
12	D-germacreno	31,46	1.672
15	$\alpha$ -muuroleno	1,64	1.744
17	$\delta$ -cadineno	5,71	1.828
22	espatulenol	1,47	2.028
24	guaiol	7,53	2.129
30	$\alpha$ -eudesmol	3,75	2.380
<b>Total Identificado</b>		<b>65,31</b>	

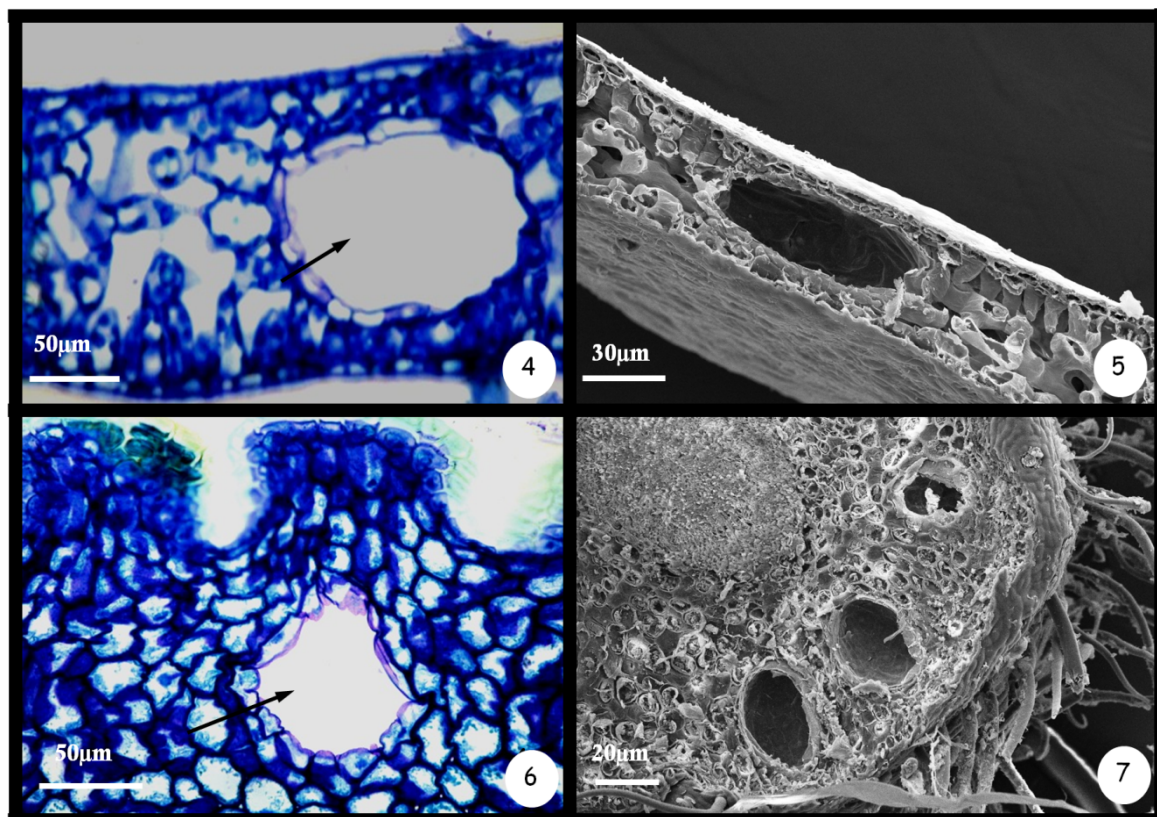
**Tabela 2.** Principais constituintes do óleo essencial do caule em planta jovem de *Copaifera multijuga* Hayne.

Pico	Substância	Percentual	Índice de Retenção
3	$\alpha$ -copaeno	10,90	1.345
4	$\alpha$ -cubebeno	3,13	1.380
5	$\beta$ -patchouleno	2,48	1.386
6	9-epi(E) cariofileno	46,92	1.467
8	$\alpha$ -bergamoteno	2,07	1.550
10	$\alpha$ -humuleno	6,30	1.578
12	D-germacreno	17,39	1.590
15	$\alpha$ -muuruleno	1,00	1.744
17	$\delta$ -cadineno	2,52	1.816
<b>Total Identificado</b>		92,72	

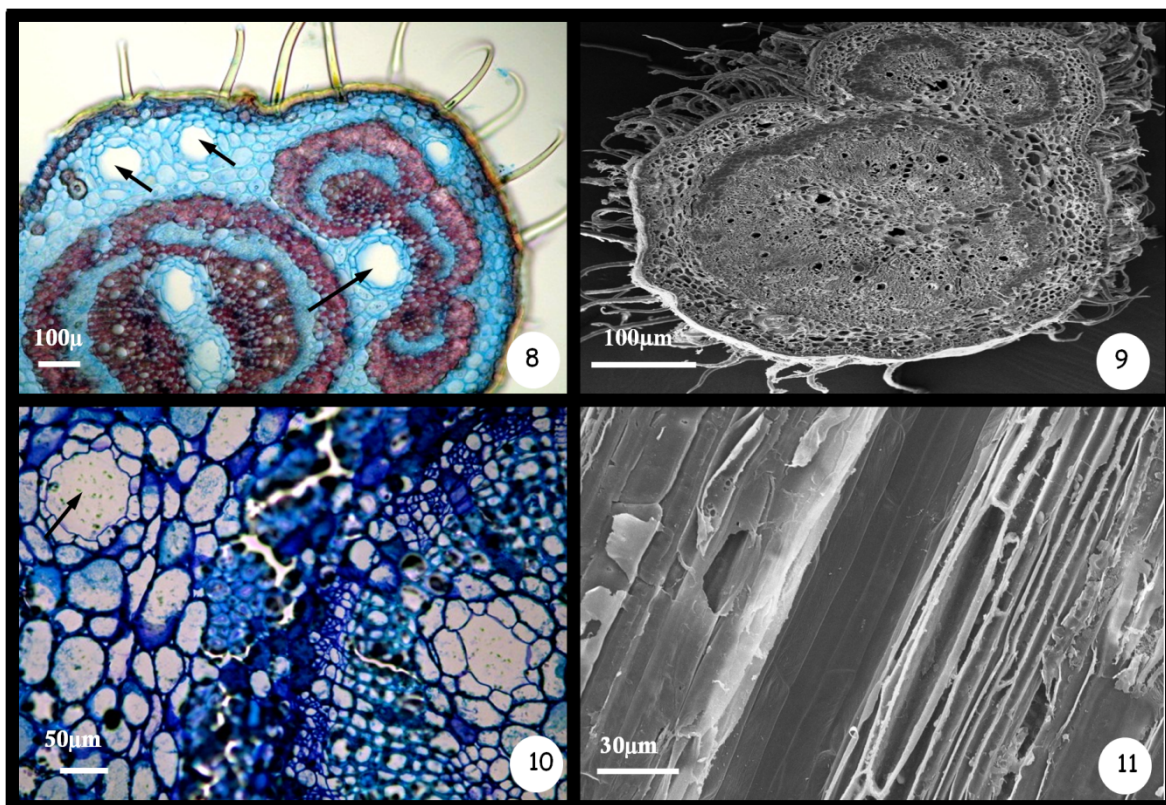
**Tabela 3.** Principais constituintes do óleo essencial da raiz em planta jovem de *C. multijuga* Hayne.

<b>Pico</b>	<b>Substância</b>	<b>Percentual</b>	<b>Índice de Retenção</b>
5	$\alpha$ -copaeno	10,36	1.344
6	$\alpha$ -cubebeno	1,47	1.379
7	$\beta$ -patchouleno	2,31	1.385
8	$\alpha$ -gurjemeno	6,59	1,409
9	9-epi(E) cariofileno	44,60	1,464
10	$\alpha$ -bergamoteno	2,02	1.524
11	$\alpha$ -humuleno	6,26	1.577
13	D-germacreno	14,97	1.660
16	d-cadineno	2,34	1.761
<b>Total Identificado</b>		<b>100,00</b>	

**Figura. 4 - 7.** Anatomia vegetal da folha (Foliólulo 4 e 5, Peciólulo 6 e 7) de plantas jovens de *Copaifera multijuga*.



**Figura. 8 -11.** Anatomia vegetal da folha (Raque 8 e 9, Pecíolo 10 e 11) de plantas jovens de *Copaifera multijuga*.





## Capítulo 2

DISTRIBUIÇÃO E HISTOQUÍMICA DOS DUCTOS DO CAULE EM PLANTA JOVEM  
DE *Copaifera multijuga* Hayne (FABACEAE)

**Key words:** *Copaifera multijuga*, ducts, essential oil, histochemistry, sesquiterpenes

### Abbreviations

BA = bark

CT = cortex

EP = epiderm

PC = pericycle

PE = periderm

PH = phloem

PI = pith

SX = secondary xylem

XI = xylem

**Resumo:** A distribuição e a histoquímica do caule de plantas jovens de *Copaifera multijuga* usando métodos usuais de anatomia vegetal e de microscopia eletrônica de varredura foram realizados para confirmar a presença de canais secretores. Os óleos essenciais foram extraídos por arraste a vapor de água, analisados por cromatografia em fase gasosa utilizando padrões e através de espectrometria de massa. Confirmou-se a presença de canais secretores, cujo óleo essencial é composto em sua maioria por sesquiterpenos como observado em plantas adultas de *C. multijuga*. Esses resultados validam a possibilidade de usar plantas jovens para investigações moleculares no intuito de selecionar enzimas que participariam na produção dos sesquiterpenos de *C. multijuga* para aplicações biotecnológicas futuras.

## Introdução

A família Fabaceae é constituída por cerca de 650 gêneros e 18.000 espécies distribuídas pelo mundo. No Brasil, o gênero *Copaifera* destaca-se sob o ponto de vista econômico pela produção de óleo do tronco de suas espécies (Souza, Lorenzi, 2008). São popularmente conhecidas como copaibeiras, distribuídas na região Amazônica e Centro-Oeste do Brasil. Dentre as espécies produtoras do óleo de copaíba destacam-se *C. guianensis*, *C. reticulata*, *C. confertiflora*, *C. langsdorffi*, *C. coriacea*, *C. cearensis* e *C. multijuga* (Veiga Junior, Pinto, 2002).

A origem do nome copaíba relaciona-se ao idioma indígena tupi “cupa-yba”, que significa árvore do depósito, em alusão ao óleo extraído do tronco de espécies do gênero, usado popularmente como antiinflamatório, anti-séptico em feridas, eczemas, na psoríase e urticária; antiinflamatório das vias urinárias, em afecções pulmonares; contra desintéria, incontinência urinária, cistite, leucorréia, úlceras e antitumoral (Biavatti *et al.*, 2006). Embora não sejam encontrados estudos clínicos em humanos, ensaios sobre a atividade biológica desse óleo em mamíferos têm sido realizados (Lima *et al.*, 2003; Paiva *et al.*, 2004; Falcão *et al.*, 2005).

No xilema secundário de espécies adultas do gênero *Copaifera*, verificou-se a presença, principalmente de sesquiterpenos e diterpenos em concentrações diferenciadas entre as espécies do gênero (Cascon and Gilbert, 2000). Análises químicas comprovaram a presença de ácidos resinosos e substâncias voláteis no óleo de copaíba do tronco de plantas adultas de *C. multijuga* na Amazônia (Biavatti *et al.*, 2006). Terpenos como o óxido de cariofileno e o  $\delta$ -cadineno são comuns em plantas

adultas de *C. multijuga*, sendo estas substâncias responsáveis pelo aroma adocicado do óleo essencial das copaibeiras (Sant'Anna *et al.*, 2007).

Em *C. langsdorffii*, o aumento na produção do óleo-resina possui uma relação com o ataque de herbívoros, uma vez que os terpenóides sintetizados por estas plantas são utilizados para sua defesa contra agentes externos, como insetos, podendo inclusive ter sua síntese aumentada em resposta ao ataque de herbívoros (FIEBERT, LANGENHEIM, 1988). Mesmo sem descrição do conteúdo secretado, para espécies do gênero *Copaifera* é reportado à ocorrência de canais secretores para o xilema secundário do tronco de *C. langsdorffii* (Marcati *et al.*, 2001). Entretanto, não há estudos estruturais e histoquímicos que comprovem a natureza química da secreção dos canais do caule de plantas jovens de espécies desse gênero.

## **Material e Métodos**

### *Histoquímica*

O material vegetal foi obtido de cinco plantas jovens de *Copaifera multijuga* com cerca de 1 e 1,5 m de altura, e com 0,5 cm e 3,0 cm de espessura de caule, coletadas no viveiro de Plantas Medicinais da UFAM.

### *Microscopia de luz*

Amostras da região central do caule de plantas jovens de *C. multijuga* foram coletadas e fixadas em FAA 50 (1 formaldeído: 1 ácido acético glacial: 18 etanol 50%, v/v) (Johansen, 1940), preservadas em etanol 70% (Jensen, 1962), desidratadas em série crescente do mesmo álcool, incluídas em historesina hidroxietilmetacrilato Leica<sup>®</sup> conforme instruções do fabricante, e seccionadas em micrótomo semi-automático Leica<sup>®</sup> RM 2145. Secções com 10 µm foram coradas em solução aquosa de azul de

tolidina em pH 4.7 (O' Brien *et al.*, 1964) e montadas com resina sintética Permout®. Secções manuais de material fresco foram submetidas à reação com cloreto férrico a 10% para detecção de compostos fenólicos e Sudan IV para detecção de lipídios gerais (Johansen, 1940). Para confirmação da presença de óleos essenciais foi usado reagente de NADI (David e Carde, 1964).

As principais características anatômicas foram registradas com auxílio de fotomicroscópio ZEISS®. As escalas referentes às fotomicrografias foram obtidas com lâmina micrométrica nas mesmas condições ópticas do microscópio utilizado.

#### *Microscopia eletrônica de varredura (SEM)*

A estrutura axial dos canais de secretores foi confirmada por análise de superfície. Amostras foram fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato pH 7.0 a 0,05 M, desidratadas em série crescente de soluções de etanol, secas em ponto crítico com CO<sub>2</sub> em secador de ponto crítico Bal-Tec CPD 030, e metalizadas com ouro a 30 mV em metalizador Balzers SCD 010. Stubs com as amostras foram examinados, sendo as principais características ultraestruturais registradas em microscópio eletrônico de varredura LEO 1430 VP. As escalas referentes às eletromicrografias foram obtidas nas mesmas condições ópticas do microscópio utilizado (Silveira, 1989).

#### *Extração do óleo essencial*

O material vegetal foi obtido de 15 (quinze) plantas jovens de *Copaifera multijuga* com cerca de 1 e 1,5 m de altura, e com 0,5 cm e 3,0 cm de espessura de caule, coletadas no viveiro de Plantas Medicinais da UFAM.

Amostras frescas foram coletadas, pesadas (caule = 25 g) e submetidas à hidrodestilação com arraste a vapor por 3 h. Os óleos essenciais extraídos foram secos com sulfato de sódio anidro, acondicionados em frascos de vidro âmbar, e refrigerados

antes da análise direta por cromatografia em fase gasosa (CG) com acoplamento à espectrometria de massas (CG-EM). O cálculo do rendimento foi realizado através da relação da massa do óleo obtido com a biomassa vegetal utilizada na extração.

## **Resultados e Discussão**

### *Distribuição e histoquímica dos canais secretores*

Os canais secretores são formados durante a instalação dos tecidos primários, sendo que a epiderme se mantém até a instalação do câmbio. Canais secretores com uma camada conspícua de células epiteliais apresentam distribuição difusa no córtex remanescente abaixo da periderme, e na medula. Além de canais secretores, o córtex é composto por células de parênquima com paredes primárias espessadas de diferentes formatos e tamanhos, e ainda idioblastos contendo cristais poliédricos de oxalato de cálcio. O periciclo é constituído de fibras gelatinosas e esclereides, e o floema é menos desenvolvido que o xilema (Fig. 1).

O caule em estrutura secundária apresenta ainda tecidos de origem primária na constituição da casca. A periderme é pouco desenvolvida, não havendo formação de ritidoma. O córtex de origem primária persiste após a formação da casca. O floema secundário é formado por elementos de tubo crivado, raios e parênquima axial com algumas células apresentando cristais poliédricos de oxalato de cálcio. No xilema secundário, há predomínio de células parenquimáticas de paredes espessadas e fibras. Na casca, os canais secretores são observados no parênquima cortical, e no xilema secundário apresentam distribuição difusa (Fig. 2). A estrutura axial dos canais secretores foi confirmada através de microscopia eletrônica de varredura (Fig. 3).

Os testes histoquímicos confirmaram a presença de substâncias lipídicas no lume dos canais secretores da casca e do xilema secundário (Figs. 4-9). Para as células epiteliais dos canais secretores, não foi observado presença de substâncias lipídicas. Com o tratamento das secções da casca e do xilema secundário com reagente de NADI, confirmou-se a presença de óleos essenciais na fração lipídica somente no lume dos canais secretores, em sua maioria sob a forma de gotas.

#### *Composição do óleo essencial*

O óleo do caule de plantas jovens de *C. multijuga* foi composto em sua maioria por sesquiterpenos, como  $\alpha$ -copaeno, 9 - epi (E) cariofileno, D germacreno,  $\alpha$ -humuleno, sendo outros sesquiterpenos também observados em menor quantidade (Tabela 1). Pela técnica utilizada, os diterpenos não puderam ser identificados. Dentre os sesquiterpenos, destaca-se a presença de 9 - epi (E) cariofileno como principal constituinte do óleo do caule de plantas jovens de *C. multijuga* (Fig. 10). Em plantas adultas de *Copaifera* foi detectado uma diversidade maior de terpenóides e ácidos carboxílicos (Veiga Júnior and Pinto, 2002). Provavelmente, com a progressão do desenvolvimento dos órgãos, há uma síntese maior de diterpenos.

As análises cromatográficas (CG and CG-EM) permitiram confirmar sesquiterpenos nos canais secretores do caule de plantas jovens de *C. multijuga*, com mesma composição química de plantas adultas dessa espécie (Cascon and Gilbert, 2000, Veiga Junior and Pinto, 2002). Em espécies de *Copaifera* os sesquiterpenos são o principal constituinte do óleo essencial (Cascon and Gilbert, 2000; Lima *et al.*, 2003; Paiva *et al.*, 2004; Falcão *et al.*, 2005; Gramosa e Silveira, 2005).

Estudos com plantas jovens tornam mais adequados para uma escala laboratorial, na qual se mensura desde aspectos fisiológicos a moleculares. Esses dados podem ser

proporcionalmente extrapolados para plantas que tenham atingido sua maturidade fenológica. Em espécies lenhosas de grande porte, como indivíduos adultos do gênero *Copaifera*, a própria coleta de material pode se constituir num desafio, sendo desejáveis testes em plantas novas e, portanto, com tecidos menos lignificados. Estudos moleculares por sua vez, como, por exemplo, extração de ácidos nucléicos para abordagem de transcriptômica ou genômica estrutural, dependem de células funcionais de fácil processamento e em quantidades razoáveis. Como benefício ainda maior, o uso de plantas jovens permitiria testes com redução da presença de elementos interferentes nos óleos depositados dessa planta.

### **Conclusão**

Os resultados confirmaram a presença de canais secretores no caule de plantas jovens de *C. multijuga*, cuja secreção apresentou sesquiterpenos como principal componente dos óleos essenciais.

### **Agradecimentos**

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas (Fapeam), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro e a Universidade Federal de Viçosa (UFV) pela realização da Microscopia Eletrônica (MEV) para este trabalho.

### **Referências**

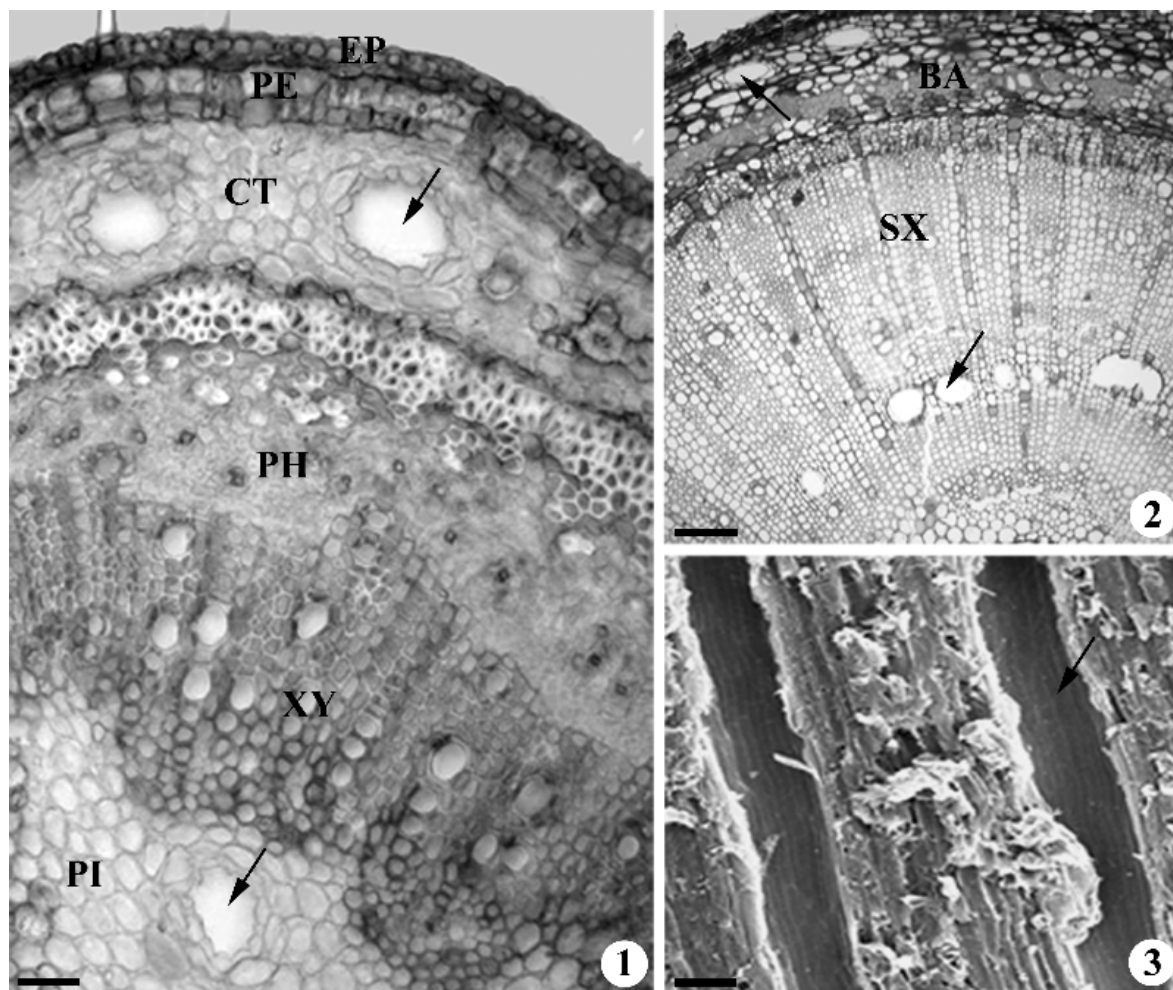
- Adams, R. P. (2001). Identification of essential oil components by gas chromatography quadrupole mass spectrometry. Carol Stream: Allured Publishing Corporation.
- Biavatti, M. W., Dossin, D., Deschamps, F. C., Lima, M. P. (2006). Análise de óleos-resinas de copaíba: contribuição para o seu controle de qualidade. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 16, 230-235.



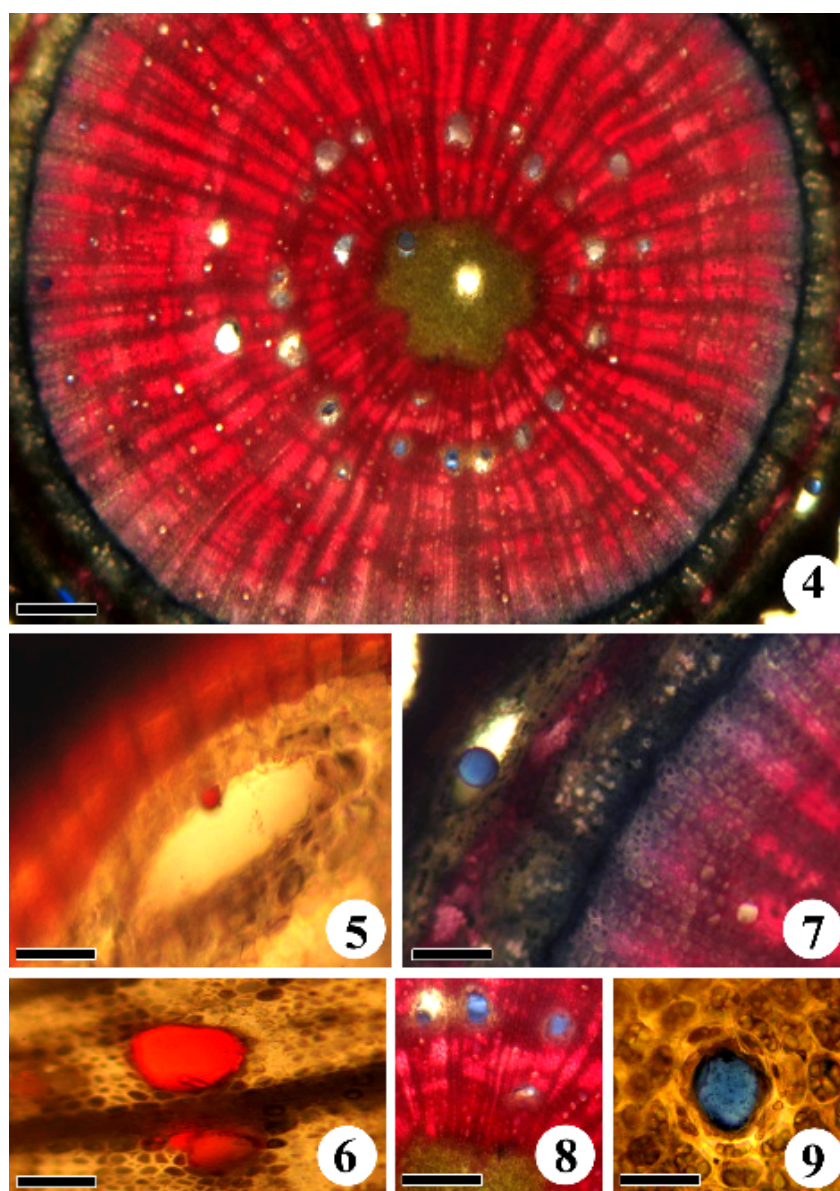
- Cascon, V. and Gilbert, B. (2000). Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne. *Phytochemistry* 55, 773-778.
- David, R. and Carde, J. P. (1964). Coloration différentielle des inclusions lipidique et terpeniques des pseudophylles du pin maritime au moyen du reactif Nadi. *Comptes rendus de Academie des Sciences D* 258, 1338-1340.
- Falcão, H. S., Lima, I. O., Santos, V. L., Dantas, H. F., Diniz, M. M., Barbosa-Filho, J. M., Batista L. M. (2005). Review of the plants with anti-inflammatory activity studied in Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 15, 381-391.
- Feibert, E. B. and Langenheim, J. H. (1988). Leaf resin variation in *Copaifera langsdorffii*: relation to irradiance and herbivory. *Phytochemistry* 7, 2527-2532.
- Gramosa, M. V., Silveira, E. R. (2005). Volatile constituents of *Copaifera langsdorffii* of the Brazilian northeast. *Journal of Essential Oil Research* 17, 130-132.
- Jensen, W. A. (1962). *Botanical histochemistry: principle and practice*. San Francisco: W.H. Freeman.
- Johansen, D. A. (1940). *Plant Microtechnique*. New York: Mc Graw Hill. Book.
- Lima, S. R. M., Veiga-Júnior, V. F., Christo, H. B., Pinto, A. C., Fernandes, P. D. (2003). In vivo and in vitro studies on the anticancer activity of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. *Phytotherapy Research* 17, 1048-1053.
- Marcati, C. R., Angyalossy-Alfonso, V. and Benetati, L. (2001). Anatomia comparada do lenho de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae-Caesalpinioideae) de floresta e cerrado. *Revista Brasileira de Botânica* 24, 311-320.
- O' Brien, T. P., Feder, N., McCully, M. E. (1964). Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. *Protoplasma* 59, 368-373.

- Paiva, L. F., Gurgel, L. A., Souza, E. T., Silveira, E. R., Silva, R. M., Santos, F. A., Rao, V. N. (2004). Protective effect of *Copaifera langsdorffi* oleo-resin against acetic acid-induced colitis in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 93, 51-56.
- Sant'Anna, B. M. P., Fontes, S. P., Pinto A.C. and Rezende, C. M. (2007) Characterization of woody odorant contributors in copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne). *Journal of Brazilian Chemistry Society* 18, 984-989.
- Silveira, M. O. (1989). O preparo de amostras biológicas para microscopia de varredura. In *Manual sobre técnicas básicas em microscopia eletrônica de varredura: técnicas básicas*. (Souza, W., ed) Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, pp.71-79.
- Souza, V. C. and Lorenzi, H. (2008). *Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira em APG II*. Nova Odessa: Instituto Plantarum.
- Veiga-Júnior, V. F. and Pinto, A. C. (2002). O gênero *Copaifera* L. *Química Nova* (25) 273-286.

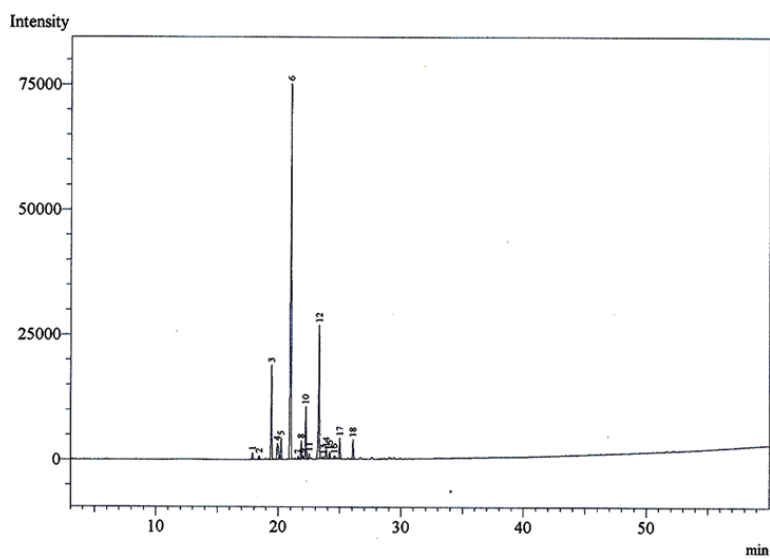
**Figs. 1-3** Canais secretores no caule de plantas jovens de *Copaifera multijuga* Hayne. (1-2) Secções transversais do caule. (1) Início da formação da periderme. (2) Estrutura secundária. (3) Eletromicrografia dos canais secretores em uma secção longitudinal tangencial do xilema secundário. As setas indicam os canais secretores. Barras = 100  $\mu\text{m}$  (1); 350  $\mu\text{m}$  (2); 200  $\mu\text{m}$  (3). 888  $\mu\text{m}$



**Figs. 4-9** Canais secretores do caule em estrutura secundária de plantas jovens de *Copaifera multijuga* Hayne. **(4, 7-9)** Secções transversais submetidas a reação com reagente de NADI. Os óleos essenciais aparecem em azul **(5-6)** Secções transversais submetidas à reação com Sudan IV. As substâncias lipídicas aparecem em alaranjado **(4)** Canais secretores na casca e no xilema secundário **(5, 7)** Canais secretores na casca **(6, 8)** Canais secretores no xilema secundário. **(9)** Canal secretor na medula. Barras = 350  $\mu\text{m}$  **(4)**; 50  $\mu\text{m}$  **(5-6, 7,9)**; 100  $\mu\text{m}$  **(8)**.



**Fig. 10** Cromatograma de íons totais do óleo essencial do caule de plantas jovens de *Copaifera multijuga* Hayne.



**Tabela 1** Sesquiterpenos identificados no caule de plantas jovens de *Copaifera multijuga* (índices determinados a partir do cromatograma - Fig. 10)

Componente Identificados	Sesquiterpenos de plantas jovens <i>C. multijuga</i>		
	Pico	Área	Índice de retenção
$\alpha$ - copaeno	<b>3</b>	<b>10,90</b>	<b>1.345</b>
$\alpha$ - cubeneno	<b>4</b>	<b>3,13</b>	<b>1.380</b>
$\beta$ - patchouleno	<b>5</b>	<b>2,48</b>	<b>1.386</b>
9 - epi (E) cariofileno	<b>6</b>	<b>46,92</b>	<b>1.467</b>
$\alpha$ - bergamoteno	<b>8</b>	<b>2,07</b>	<b>1.550</b>
$\alpha$ - humuleno	<b>10</b>	<b>6,30</b>	<b>1.578</b>
D - germacreno	<b>12</b>	<b>17,39</b>	<b>1.590</b>
$\alpha$ - muureleno	<b>15</b>	<b>1,00</b>	<b>1.744</b>
$\delta$ - cadineno	<b>17</b>	<b>2,52</b>	<b>1.816</b>

### Capítulo 3

Expressão de genes responsáveis pela síntese de componentes do óleo de copaíba nas folhas em planta jovem de *Copaifera multijuga* Hayne

#### INTRODUÇÃO:

A família Fabaceae é constituída por cerca de 650 gêneros e 18.000 espécies distribuídas pelo mundo. No Brasil, o gênero *Copaifera* destaca-se sob o ponto de vista econômico pela produção de óleo extraído a partir do tronco de suas espécies (SOUZA, LORENZI, 2008), popularmente conhecidas como copaibeiras, as quais são distribuídas no bioma amazônico atingindo o centro-oeste brasileiro. Dentre as espécies produtoras do óleo de copaíba destacam-se *C. guianensis*, *C. reticulata*, *C. confertiflora*, *C. langsdorfii*, *C. coriacea*, *C. cearensis* e *C. multijuga* (VEIGA JUNIOR, PINTO, 2002).

O óleo extraído do tronco de espécies do gênero *Copaifera* vem sendo usado popularmente como anti-inflamatório, anti-séptico em feridas, eczemas, na psoríase e urticária; anti-inflamatório das vias urinárias, em afecções pulmonares; contra desinteria, cistite, leucorréia, úlceras e antitumoral (BIAVATTI *et al.*, 2006). As copaibeiras representam um recurso de grande importância na medicina popular para o tratamento e cura de várias doenças (VEIGA-JUNIOR, PINTO, 2002; VEIGA-JUNIOR *et al.*, 2001; LIMA *et al.*, 2003). O oleoresina encontrado no xilema secundário no tronco é constituído de sesquiterpenos e diterpenos, porém suas concentrações diferenciadas entre as várias espécies do gênero (GERIS *et al.*, 2008; BARRETO-JÚNIOR *et al.*, 2005).

A produção de óleo de copaífera superou 500 toneladas em 2008, considerando somente três estados (Amazonas, Pará, Rondônia) da região Amazônica, sendo que o Estado do Amazonas foi responsável por mais de 90% desta produção (IBGE, 2008).

No Brasil, este óleo tem sido comercializado na forma de óleo cru, cápsulas, pomadas, sabonetes, dentre outros produtos. Além disso, estes produtos são freqüentemente exportados para Inglaterra, França, Alemanha e Estados Unidos (VEIGA JR and PINTO, 2002).

No capítulo 1 desta tese foi indicado que o óleo de *C. multijuga* é produzido já em folhas de plantas jovens e conduzido ao restante da planta por canais secretores. A análise comparativa por cromatografia do óleo extraído do cerne da planta adulta mostrou grande identidade com o extraído da planta jovem estudada, como: D germacreno ,  $\beta$ -cariofileno, ,  $\alpha$ -cubebeno,  $\alpha$ -copaeno,  $\alpha$ -humuleno,  $\alpha$ -muurulenos e  $\gamma$ -elemeno entre outras substâncias minoritárias encontradas em todas as partes dessa espécie.

Neste trabalho, visando identificar e caracterizar as mensagens genéticas codificadoras de enzimas das vias metabólicas (terpenóides) responsáveis pela síntese dos principais componentes do óleo de copaíba (sesquiterpenos) utilizou-se uma abordagem transcriptômica.

## **MATERIAL E MÉTODOS:**

### *Material Vegetal*

O material vegetal (folhas) foi obtido de 5 (cinco) plantas jovens saudáveis de *C. multijuga* com cerca de 1 e 1,5 m de altura, e com 0,5 cm e 3,0 cm de espessura de caule, coletadas no viveiro de Plantas Medicinais da UFAM.



### *Confecção da Biblioteca cDNA e sequenciamento*

O RNA total foi obtido de folhas jovens de *C. multijuga* maceradas em nitrogênio líquido. A extração seguiu o protocolo de Kiefer e colaboradores com modificação, suprimindo o uso da resina *Nucleon™ PhytoPure™ DNA extration resin*. O isolamento da fração mRNA poli(A)+ foi realizado com *Protocol for small-Scale mRNA isolation PolyA Tract systems III kit* – Promega (Part#TM021). Realizou-se a síntese do cDNA com o kit *Universal Riboclone® cDNA Synthesis System* – Promega (Part#TM038). A biblioteca de cDNA foi quantificada e analisada quanto a faixa de tamanho de seus fragmentos por meio de eletroforese em gel de agarose (1%) (Kiefer *et al*, 2000).

Para proceder o seqüenciamento (piroseqüenciamento), 5 µL de fragmentos da biblioteca de cDNA (400 ng/µL), na qual se obteve tamanhos entre 500 a 1200 pb, foram nebulizados a 30psi de nitrogênio por 45s por interação com *beads* magnetizadas (conforme instruções do fabricante – ROCHE) e seus tamanhos determinados pelo *Bioanalyzer* visando a obtenção de fragmentos pequenos (menores que 500 pb). Nessa etapa utilizou-se o procedimento de *cDNA Rapid Library Preparation Method Manual - GS FLX Titanium Series*, o qual foi realizado nas instalações do Laboratório de Seqüenciamento do LNCC (Laboratório Nacional de Computação Científica), Petrópolis, RJ, utilizando-se a plataforma 454 (ROCHE).

A montagem das seqüências geradas do sequenciamento foi proporcionada pelo programa CAP3 (Huang e Madam, 1999). Para a anotação dos *contigs* montou-se um sistema de análise dos mesmos por um *pipeline* computacional constituído de programas BLAST (Altschul *et al*, 1990) disponíveis no NCBI (<http://www.ncbi.nih.gov/Blast.cgi>) e *scripts* na linguagem de programação Perl.

Primeiramente, foi utilizado o programa BLASTx (pesquisa de banco de dados de proteínas usando uma consulta de nucleotídeos) dos *contigs* contra o banco de dados KOG (<http://www.ncbi.nih.gov/KOG>), no qual foi selecionada a categoria I (metabolismo de lipídios). Em seguida, os identificadores do KOG encontrados foram correlacionados com os dados do *Swissprot* (<ftp.ebi.ac.uk/pub/database/swissprot/realase>), tendo-se a preocupação de retirar o código de identificação de enzimas, EC (referência de enzima). Paralelamente foi utilizado o BLASTx (Altschut et al, 1997) para encontrar eventuais ECs omitidos nos passos anteriores. Em outro procedimento, utilizou-se os ECs de enzimas conhecidas das rotas metabólicas dos terpenos e sesquiterpenos, buscando correspondências (*matches*) nos respectivos *contigs* utilizando-se o programa tBLASTn contra as seqüências de aminoácidos dos ECs selecionados obtidas no banco BRENDA (<http://www.brenda-enzymes.org>).

Para a localização das enzimas na rota metabólica de terpenos e sesquiterpenos, os ECs detectados na análise dos *contigs* foram submetidos ao programa KEGG (<http://www.kegg.jp/kegg/mapper.html>), o qual gera o mapa metabólico da via de interesse. Todas as seqüências de enzimas foram devidamente armazenadas em um banco de dados institucional na UnB em formato FASTA.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO:**

Os perfis eletroforéticos dos RNAs (RNA total, RNA Poli A +) e cDNA de folha jovem de *C. multijuga* são mostrados na figura (1). Na raia 1, pode-se observar duas bandas que compõem os RNAs ribossomais 28S e 18S e praticamente nenhuma degradação. Na raia 2 observa-se um rastro de RNA Poli A+ (mRNA), como era de se

esperar para uma população de mRNA de um tecido complexo com alto grau de especialização. Ainda na figura 1 (raia 3) mostra o perfil eletroforético do cDNA dupla-fita com moléculas cujos tamanhos variam de menos de 250 pb até mais de 10.000, porém com a maioria de moléculas na faixa de 300 a 750 pb.

Na etapa de sequenciamento foram gerados 638.576 *reads* (seqüências), as quais foram agrupadas em 50.4273 *contigs* e 39.807 *singlets* usando o programa CAP3.

Utilizando o programa BLAST (tBLASTn) do NCBI foi possível identificar sequencias codificadoras de enzimas envolvidas no metabolismo de lipídios correspondentes a diferentes vias. Pode-se observar que a biossíntese dos metabólitos secundários é abundante quando comparada com as demais vias do metabolismo de lipídios (figura 3). Confirmou-se que desde jovem a planta *Copaifera multijuga* expressa os genes responsáveis pela produção de óleo, resina e hormônios.

No âmbito das vias geradas pelo programa KEGG, a biossíntese dos terpenos é a via que alimenta a rota de síntese de sesquiterpenos (óleos essenciais) e, portanto o foco deste estudo. Foram encontradas, praticamente, todas as seqüências codificadoras das enzimas que produzem as moléculas iniciais para formação do esqueleto de carbono e conseqüente geração de diferentes classes de terpenos.

Entre os reads mais abundantes provenientes do seqüenciamento, destacam-se os genes de enzimas ligadas a via do metileritritol-4-fosfato (MEP), a qual faz parte da via biossintética dos terpenos (sintetizadas por unidades isoprênicas nos plastídeos). A via do MEP é caracterizada por formar dimetilalil difosfato (DMAP), onde no citosol pode ser convertido em isopentenil difosfato (IPP). No entanto, no citosol pela via do mevalonato (MVA) o IPP é formado diretamente e assim usado para formação de

monoterpenos e sesquiterpenos. Neste contexto, foram encontradas as seqüências codificadoras de enzimas das duas vias (MEP e MVA), ressaltando que todas as seqüências codificadoras de enzimas da via MEP foram encontradas (dados na tabela 3).

A biossíntese dos sesquiterpenos encontrados é mostrada na figura 5, identificados pelos seus ECs (em vermelho) e respectivos produtos. Faz-se necessário, no entanto, destacar que o banco de dados utilizado (KEGG) trabalha com entradas identificadas a partir de diversos organismos. Entretanto, todos os sesquiterpenos encontrados (em vermelho) já foram descritos em algum gênero de *Copaifera* (PINTO e VEIGA JR, 2002), porém nem todos foram identificados em testes cromatográficos nesse estudo (ver capítulo 1). Tal achado pode ser discutido sob a luz de algumas considerações a seguir:

1) alguns produtos poderiam estar em menor concentração, fora do limite de detecção do cromatógrafo;

2) durante o procedimento de extração do óleo, compostos mais voláteis podem ter sido perdidos seletivamente;

3) embora a sequência de cDNA (mRNA) de uma determinada enzima tenha sido detectada, o mRNA pode não estar sendo traduzido durante o momento de sua extração;

4) ou a enzima específica para a síntese do sesquiterpeno poderia estar na forma inativa.

Quanto aos compostos já descritos para *Copaifera* na literatura e a cromatografia de folhas de plantas jovens deste trabalho, é relevante considerar que alguns sesquiterpenos não estão dispostos na base de dados do KEGG e, portanto não há

como identificá-los nessa ferramenta. Os seguintes sesquiterpenos não se encontram no KEGG:  $\alpha$ -cubebeno,  $\alpha$ -copaeno,  $\alpha$ -elemeno e  $\alpha$ -muuroleno.

Pela técnica de cromatografia em fase gasosa (GC-MS) foram identificados (ver capítulo 1) em planta jovem desta espécie os seguintes sesquiterpenos: D-germacreno,  $\beta$ -selineno,  $\delta$ -cadineno,  $\beta$ -cariofileno e  $\alpha$ -humuleno.

## **CONCLUSÃO:**

Foi possível identificar sequencias codificadoras (cDNAs) das enzimas das vias de síntese de terpenos e sesquiterpenos, indicando que as mesmas estão sendo sintetizadas em folhas de plantas jovens de *Copaifera multijuga*, compatível com a composição química do óleo de copaíba adulta.

## **1. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

AHARONI A.; VORST, O. **DNA microarrays for functional plant genomics**. Plant Molecular Biology, 48: 99–118, 2001.

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, W. **Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search program**. Nucleic Acids Res 25:3389-3402, 1997.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D. J. **Basic local alignment search toll**. J Mol Biol 215 (3): 403–410,1990.

BIAVATTI, M. W.; DOSSIN, D.; DESCHAMPS, F. C.; LIMA, M. P. **Análise de óleos-resinas de copaíba: contribuição para o seu controle de qualidade**. Revista Brasileira de Farmacognosia, 16: 230-235, 2006.

- GERIS, R.; SILVA, I. G.; SILVA, H. H. G.; BARISON, A.; RODRIGUES-FILHO, E.; FERREIRA, A. G. **Diterpenoids from *Copaifera reticulata* Ducke with larvicidal activity against *Aedes aegypti* (L. ) (Diptera, Culicidae).** Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo; 50(1): 26-28, 2008.
- LIMA, S. R. M.; VEIGA-JÚNIOR, V. F.; CHRISTO, H. B.; PINTO, A. C.; FERNANDES, P. D. **In vivo and in vitro studies on the anticancer activity of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions.** Phytotherapy Research, 17: 1048-1053, 2003.
- SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira em APG II.** Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.
- VEIGA-JÚNIOR, V. F. & PINTO, A. C. **O gênero *Copaifera* L.** Química Nova, 25: 273-286, 2002.
- VEIGA-JÚNIOR, V. F.; ZUNINO L.; CALIXTO J.B.; PATITUCCI M.L.; PINTO, A. C. **Phytochemical and antioedematogenic studies of commercial copaiba oils available in Brazil.** Phytotherapy Research, 15 (6): 476-480, 2001.
- HUANG, X and MADAN, A. **CAP3: A DNA Sequence Assembly Program.** Genome Research 9:868–877, 1999.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Vegetable extration and silviculture – 2008. Rio de Janeiro, <http://www.ibge.gov.br> 2009.

Tabela 1- Mostra as quantidades de ácidos nucleicos extraídos e/ou sintetizados no processo de obtenção do cDNA dupla-fita:

Processo	Massa do material utilizado	Massa de produto obtido
Extração de RNA total	1.400 mg de folhas maceradas	1,3 mg de RNA total
Purificação do RNA poli A+ (mRNA)	1,3 mg de RNA total	12 µg de RNA poli A+
Síntese de cDNA (duplex)	4 µg de RNA poli A+	8 µg de cDNA duplex

Figura 1 – Esta figura sintetiza as análises do RNA total na raia 1, da Fração poli A+ (mRNAs) na raia 2, do cDNA dupla-fita na raia 3 e raia 4 o marcador.

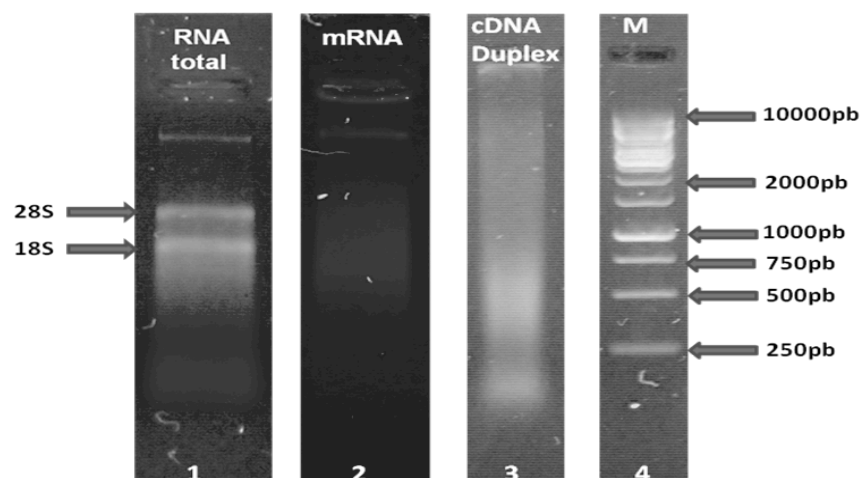


Figura 3 – Distribuição dos ECs (enzimas) baseado na categoria de metabolismo de lipídios do KEGG encontradas no transcriptoma de folha jovem de *Copaifera multijuga*.

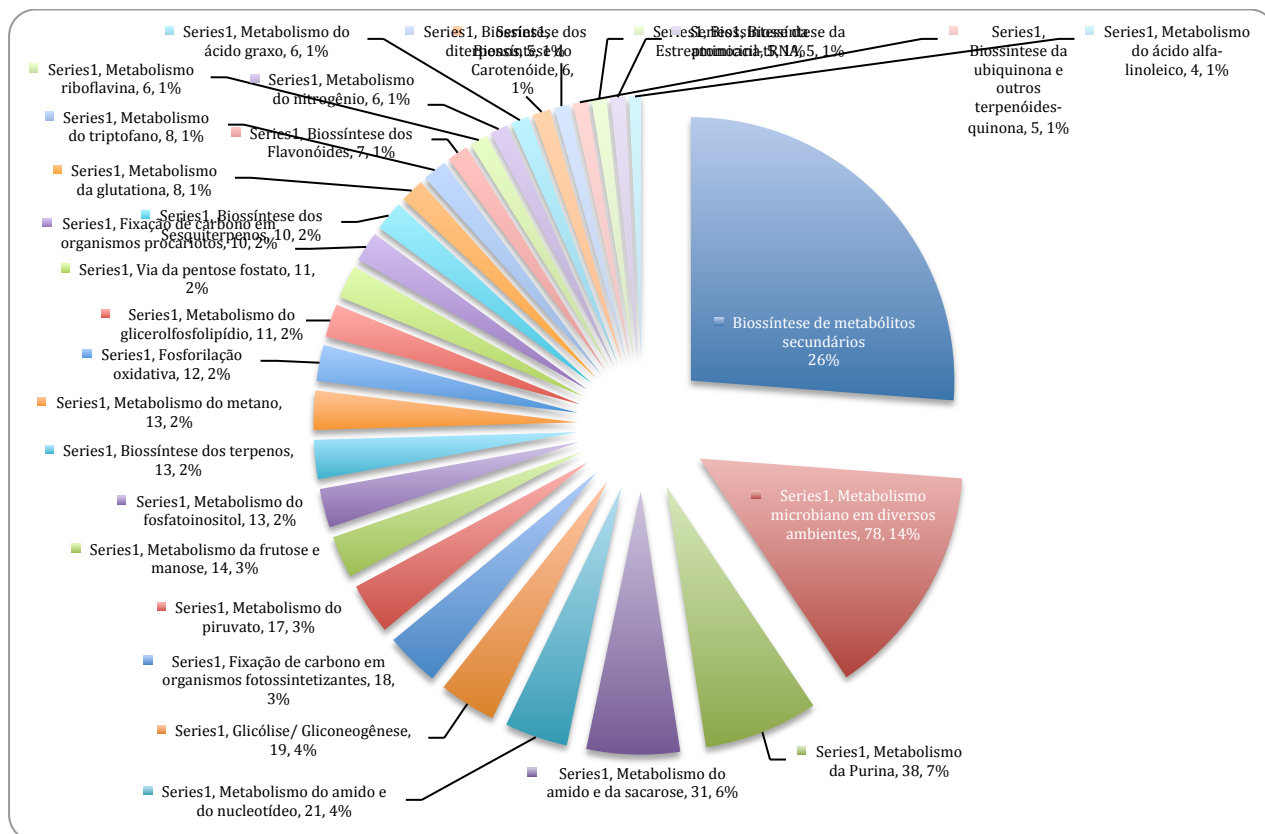




Figura 4- Vias para síntese de terpenos. Esquema gerado pelo KEGG, onde os EC numbers encontrados no seqüenciamento estão com letras vermelhas.

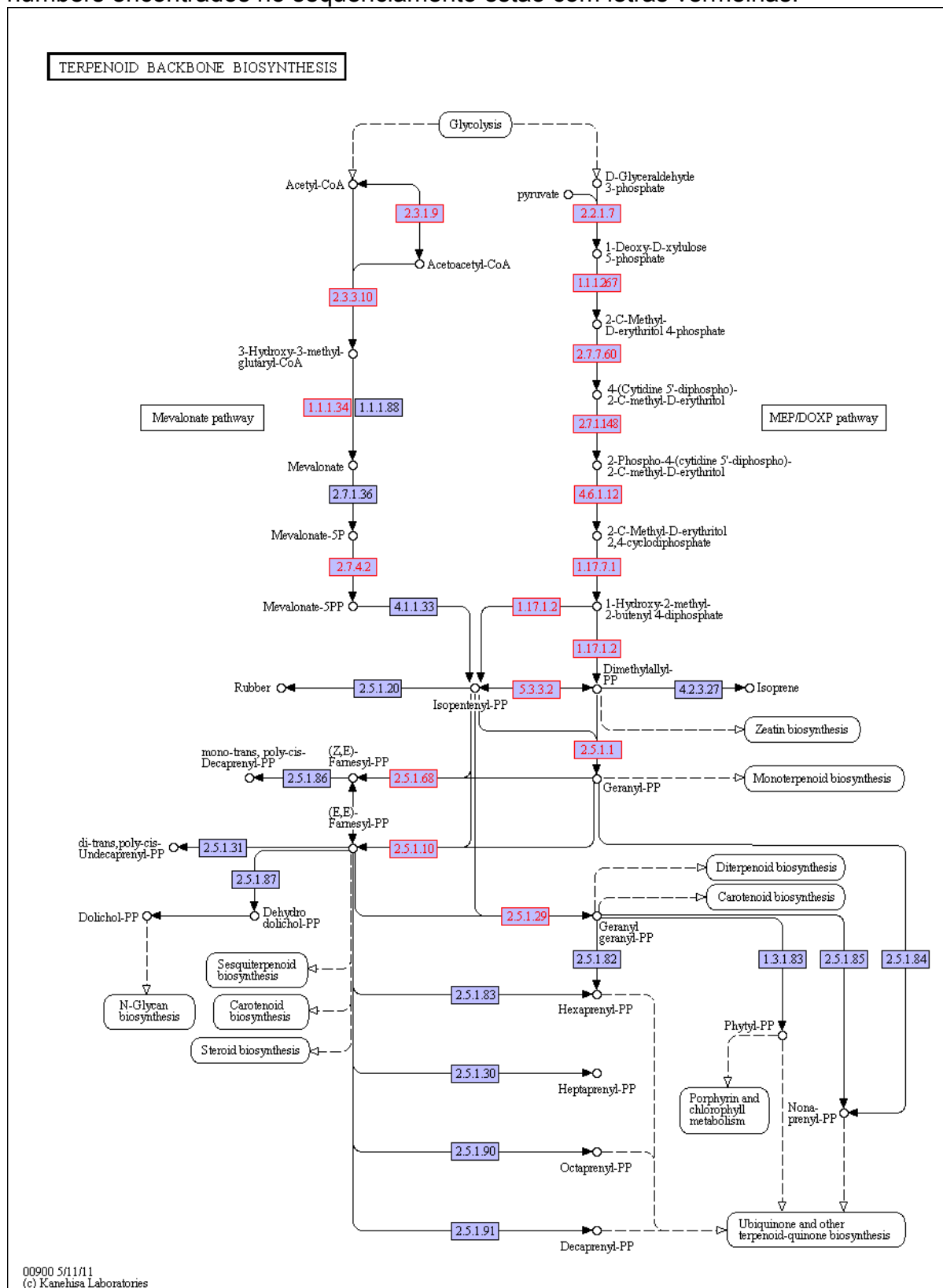


Figura 5 – Biossíntese dos sesquiterpenos. Esquema gerado pelo KEGG, onde os EC numbers encontrados no seqüenciamento estão com letras vermelhas.

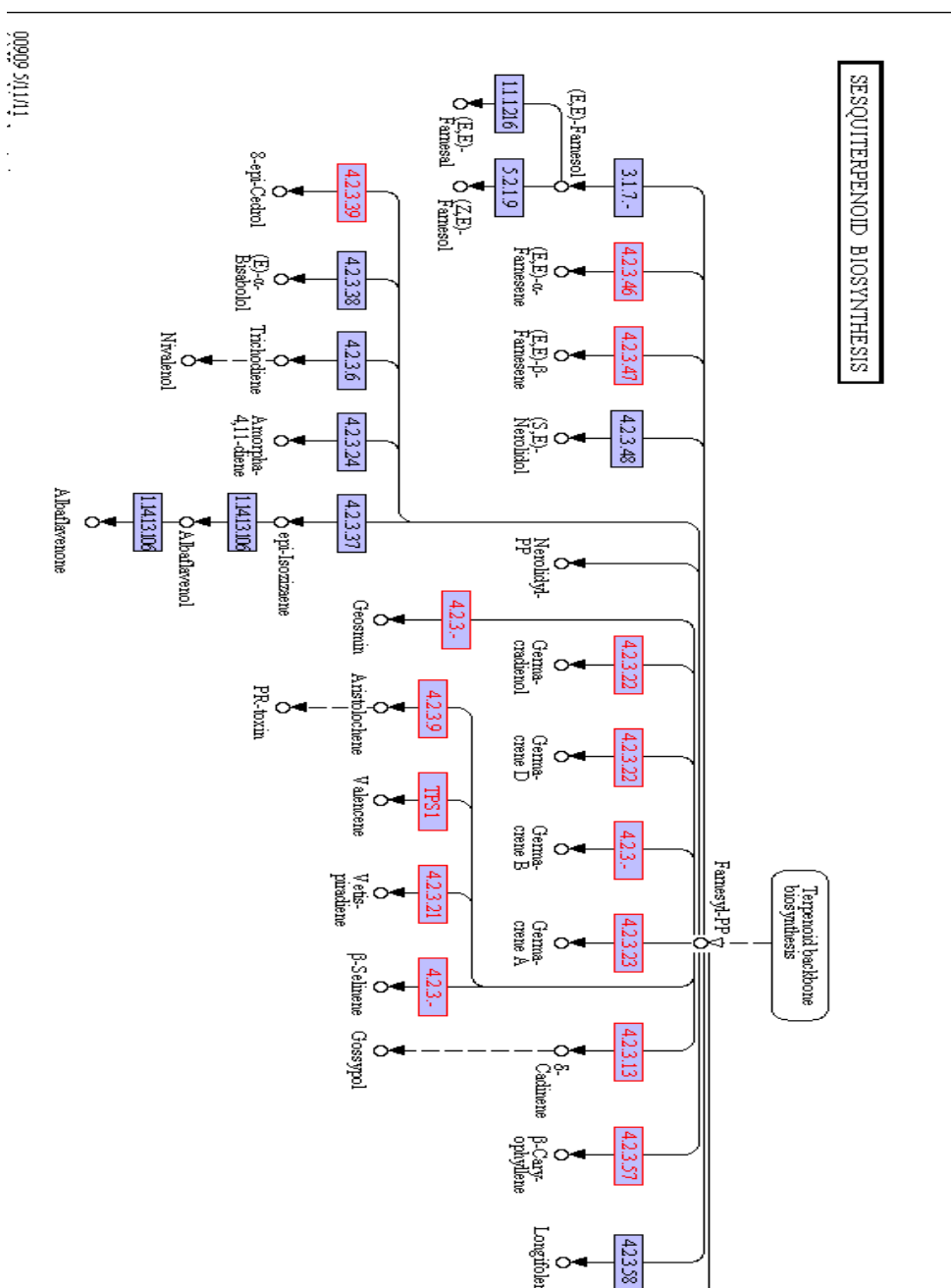


Tabela 2 – Resultados do seqüenciamento da biblioteca de cDNAs de folhas de *Copaifera multijuga* relacionando dados cromatográficos obtidos no Capítulo 1.

<b>EC</b>	<b>Sesquiterpenos</b>	<b>Reads</b>	<b>Cromatografia de Planta Jovem</b>
4.2.3.46	(E,E)- $\alpha$ -farneseno	76 / 15%	Não detectado
4.2.3.47	(E,E)- $\beta$ -farneseno	11 / 2%	Não detectado
4.2.3.22	D Germacreno	83 / 16,4%	31,46%
4.2.3.23	A Germacreno	64 / 12,6%	Não detectado
4.2.3.13	$\delta$ -Cadineno	22 / 4%	5,71%
4.2.3.57	$\beta$ -Cariofileno	68 / 13,4%	5,74%
4.2.3.56	$\gamma$ -Humuleno	115 / 22,7%	Não detectado
TPS21	$\alpha$ -Humuleno	68 / 13,4%	1,43%

#### 4. CONCLUSÕES GERAIS

A utilização de técnicas cromatográficas para identificação de compostos fitoquímicos, aliadas a métodos histológicos e posteriormente ao seqüenciamento de genes expressos de folhas jovens e, portanto, secretoras de óleo resina, permitiram a confirmação da biossíntese de diversas substâncias, bem como suas rotas metabólicas.

Esses dados são apresentados pela primeira vez conjuntamente, contribuindo para a o entendimento da dinâmica de secreção do óleo de copaíba. Neste contexto, ficou evidenciada a presença de canais secretores nos órgãos vegetativos da planta jovem, confirmando os sítios de produção de óleo essencial em *C. multijuga* nesse estágio inicial de maturação e a detecção de 16 substâncias sesquiterpênicas, com composição qualitativa e quantitativa semelhantes, observando-se, como majoritárias: a-copaeno, D germacreno, a-humuleno,  $\delta$ -cadineno,  $\gamma$ -elemeno, a-cubebeno e a-bergamoteno; sendo que nas folhas compostas (plantas jovens) foi verificada maior diversidade de substâncias (36 no total). Algumas dessas substâncias são comuns em óleos essenciais de outras partes da planta enquanto outras são exclusivas da folha, como guaiol e a-eudesmol. Além disso, os óleos essenciais descritos na literatura para plantas adultas foram os mesmos encontrados na planta jovem, indicando que a produção e acúmulo do óleo de copaíba deve se iniciar desde os primeiros estágios de desenvolvimento, dado esse inédito, demonstrado neste trabalho por técnicas histoquímicas. Quanto ao seqüenciamento, a biblioteca de cDNA gerada de folhas de plantas jovens, revelou ESTs de genes codificadores das enzimas das vias de síntese das principais moléculas do óleo de copaíba, a via dos sesquiterpenos, compatível com os resultados cromatográficos desse trabalho.

Os resultados aqui obtidos inauguram novas frentes de atuação na pesquisa de óleos essenciais de plantas amazônicas, e acima de tudo trata-se da comprovação de que plantas jovens de espécies lenhosas produtoras de óleo resina podem ser um excelente material para experimentos, o que redundará numa abreviação no tempo de procedimentos analíticos, os quais podem ser efetuados com material oriundo de cultura de tecidos vegetais por exemplo. Abre-se, portanto, possibilidades de desenvolvimento de novas biotecnologias com a espécie *Copaifera multijuga*.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography quadrupole mass spectrometry**. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 2001, 381-391, 2005.
- AHARONI A.; VORST, O. **DNA microarrays for functional plant genomics**. *Plant Molecular Biology*, 48: 99–118, 2001.
- ALBA, R., FEI Z.; PAYTON, P.; LIU, Y.; MOORE, S. L.; DEBBIE, P.; COHN, J.; D'ASCENZO, M.; GORDON, J. S.; ROSE, J. K. C.; MARTIN, G.; TANKSLEY, S. D.; BOUZAYEN, M; JAHN, M. M. AND GIOVANNONI, J. **ESTs, cDNA microarrays, and gene expression profiling: tools for dissecting plant physiology and development**. *The Plant Journal* 39: 697–714, 2004.
- AZIZ, N., PAIVA, N. L.; MAY, G. D.; DIXON, R. A. **Transcriptome analysis of alfalfa glandular trichomes**. *Planta* 221: 28–38, 2005.
- BARRETO-JÚNIOR, A. G.; BISCAIA-JUNIOR, E. C.; VEIGA-JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; CARVALHAES, S. F.; MACIEL, M. A. M. **Ion exchange chromatography applied to the fractionation of the copaíba oil (*Copaifera multijuga*) and sacaca (*Croton cajucara*) extracts**. *Quim. Nova*, 28 (4): 719-722, 2005.
- BIAVATTI, M. W.; DOSSIN, D.; DESCHAMPS, F. C.; LIMA, M. P. **Análise de óleos-resinas de copaíba: contribuição para o seu controle de qualidade**. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16: 230-235, 2006.

- BRUCE, T. J. A. ; MATTHES M. C. ; CHAMBERLAIN, K. ; WOODCOCK C. M. ; MOHIB, A. ; WEBSTER, B. ; SMART, L. E. ; BIRKETT, M. A. ; PICKETT, J. A. ; NAPIER, J. A. ***cis*-Jasmone induces *Arabidopsis* genes that affect the chemical ecology of multitrophic interactions with aphids and their parasitoids.** PNAS, 105 (12) : 4553-4558, 2008.
- BUSO, G. S.C; CIAMPI, A. Y.; MORETZSONH, M. C.; AMARAL, Z. P. S.; BRONDANI, R. V. P. **Marcadores de microssatélites em espécies vegetais.** Revista de Biotecnologia e desenvolvimento, 30: 46-50, 2003.
- CALVIN, M.; **New Sources for Fuel and Materials.** Science, 219(4580):24 – 26, 1983.
- CASCON, V.; GILBERT, B.; ADAMS, R. P. **Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne.** Phytochemistry, 55(7): 773-778, 2000.
- CLEMENTS, M. J.; CAMPBELL, K. W.; MARAGOS, C. M.; PILCHER, C.; HEADRICK, J. M.; PATAKY, J. K.; WHITE, D. G. **Influence of Cry1Ab protein and hybrid genotype on fumonisin contamination and fusarium ear rot of corn.** Crop Science, 43: 1283-1293, 2003.
- CLOONAN, N.; FORREST, A. R. R.; KOLLE, G.; GARDINER, B. B. A.; FAULKNER, G. J.; BROWN, M. K.; TAYLOR, D. F.; STEPTOE, A. L, WANI, S.; BETHEL, G., *et al.* **Stem cell transcriptome profiling via massive-scale mRNA sequencing.** Nature Methods, 5: 613-619, 2008.
- COVELLO, P.S. ; TEOHA, K. H. ; POLICHUKA, D. R. ; REEDA, D. W. ; NOWAKA, G. **Functional genomics and the biosynthesis of artemisinin.** Phytochemistry, 68(14) : 1864-1871, 2007.

- CROCK, J.; WILDUNG, M.; CROTEAU, R. **Isolation and bacterial expression of a sesquiterpene synthase cDNA clone from peppermint (*Mentha x piperita*, L.) that produces the aphid alarm pheromone (E)-b-farnesene (insect pheromone-plant-insect chemical communication-synomone)**. *Biochemistry. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 12833–12838, 1997.
- DAVID, R. ; CARDE, J. P. **Coloration différentielle des inclusions lipidique et terpeniques des pseudophylles du pin maritime au moyen du reactif Nadi**. *Comptes rendus de Academie des Sciences D*, 258 : 1338-1340, 1964.
- DE CARVALHO, M. C. C. .G ; DA SILVA, D. C. G. **Next generation DNA sequencing and its applications in plant genomics**. *Ciência Rural*, 40(3) : 735-744, 2010.
- DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. **Biochemistry of Plant Volatiles**. *Plant Physiology*, 135: 1893-1902, 2004.
- FALCÃO, H. S; LIMA, I. O.; SANTOS, V. L.; DANTAS, H. F., DINIZ, M. M.; BARBOSA-FILHO; J. M, BATISTA L. M. **Review of the plants with anti-inflammatory activity studied in Brazil**. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 15 (4): 381-385, 2005.
- FEIBERT, E. B.; LANGENHEIM, J. H. **Leaf resin variation in *Copaifera langsdorfii*: relation to irradiance and herbivory**. *Phytochemistry*, 27(8): 2527-2532, 1988.
- FUMAGALI, E.; GONÇALVES, R. A.; MACHADO, M. de F. P. S.; VIDOTI, G. J.; OLIVEIRA, A. J. B. **Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma***. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 18(4): 627-641, 2008.
- GERIS, R.; SILVA, I. G.; SILVA, H. H. G.; BARISON, A.; RODRIGUES-FILHO, E.; FERREIRA, A. G. **Diterpenoids from *Copaifera reticulata* Ducke with larvicidal**



- activity against *Aedes aegypti* (L. ) (Diptera, Culicidae).** Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo; 50(1): 26-28, 2008.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. **Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários.** Quim. Nova, 30(2): 374-381, 2007.
- GORALKA, R. J. L. & LANGENHEIM, J. H. **Implications of Foliar Monoterpenoid Variation among Ontogenetic Stages of the California BayTree (*Umbellularia californica*) for Deer Herbivory.** Biochemical Systematics and Ecology, 24(1): 13-23, 1996.
- GREENHAGEN, B. T.; O'MAILLE, P. E.; NOEL, J. P.; CHAPPELL, J. **Identifying and manipulating structural determinates linking catalytic specificities in terpene synthases.** PNAS, 103 (26): 9826-9831, 2006.
- IBGE. **Comércio Exterior do Brasil, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.** Rio de Janeiro, 1962-1996.
- JENSEN, W. A. **Botanical histochemistry: principle and practice.** San Francisco: W.H. Freeman, 1962.
- JOHANSEN, D. A. **Plant Microtechnique.** New York: Mc Graw Hill. Book, 1940.
- LIMA, S. R. M.; VEIGA-JÚNIOR, V. F.; CHRISTO, H. B.; PINTO, A. C.; FERNANDES, P. D. ***In vivo* and *in vitro* studies on the anticancer activity of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions.** Phytotherapy Research, 17: 1048-1053, 2003.
- MARCATI, C. R., ANGYALOSSY-ALFONSO, V.; BENETATI, L. **Anatomia comparada do lenho de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae-Caesalpinoideae) de floresta e cerrado.** Revista Brasileira de Botânica, 24: 311-320, 2001.

- MARTINS-DA-SILVA, R. C. V.; PEREIRA, J. F.; LIMA, H. C. **O gênero *Copaifera* (leguminosae – caesalpinioideae) na amazônia brasileira.** Rodriguésia, 59 (3): 455-476, 2008.
- O' BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. **Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue.** Protoplasma, 59: 368-373, 1964.
- PICHERSKY, E.; NOEL, J. P.; DUDAREVA, N. **Biosynthesis of Plant Volatiles: Nature's Diversity and Ingenuity.** Science, 311 (5762): 808-811, 2007.
- PAIVA, L. F.; GURGEL, L. A.; SOUZA, E. T.; SILVEIRA, E. R.; SILVA, R. M.; SANTOS, F. A.; RAO, V. N. **Protective effect of *Copaifera langsdorfii* oleo-resin against acetic acid-induced colitis in rats.** Journal of Ethnopharmacology, 93: 51-56, 2004.
- REINHARD, J.; SRIVIVASAN, M. V.; ZHANG, S. **Scent-triggered navigation in honeybees.** Nature, 427: 411, 2004.
- SANT'ANNA, B. M. P.; FONTES, S. P.; PINTO A.C.; REZENDE, C. M. **Characterization of woody odorant contributors in copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne).** Journal of Brazilian Chemistry Society, 18: 984-989, 2007.
- SILVEIRA, M. O. **O preparo de amostras biológicas para microscopia de varredura. In Manual sobre técnicas básicas em microscopia eletrônica de varredura: técnicas básicas.** Editora Souza, W. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, 1989.
- SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira em APG II.** Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

SUMNER, L. W.; MENDES, P.; DIXON, R. A. **Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era.** *Phytochemistry*, 62 (6): 817- 836, 2003.

RAHARJO, S. H. T.; LITZ, R. E. **Micrografting and *ex vitro* grafting for somatic embryo rescue and plant recovery in avocado (*Persea americana*).** *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 82: 1-9, 2005.

VEIGA-JÚNIOR, V. F. & PINTO, A. C. **O gênero *Copaifera* L.** *Química Nova*, 25: 273-286, 2002.

VEIGA-JÚNIOR, V. F.; ZUNINO L.; CALIXTO J.B.; PATITUCCI M.L.; PINTO, A. C. **Phytochemical and antioedematogenic studies of commercial copaiba oils available in Brazil.** *Phytotherapy Research*, 15 (6): 476-480, 2001.