

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS - UEA
ESCOLA NORMAL SUPERIOR - ENS
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

ALCINEIA DOS SANTOS DANTAS

**GERMINAÇÃO DE SEMENTES E ESTABELECIMENTO *IN*
VITRO DE SEGMENTOS NODAIS DE *Libidibia ferrea*
(MART. ex TUL.) L.P. QUEIROZ**

**MANAUS – AM
2023**

ALCINEIA DOS SANTOS DANTAS

**GERMINAÇÃO DE SEMENTES E ESTABELECIMENTO *IN*
VITRO DE SEGMENTOS NODAIS DE *Libidibia ferrea*
(MART. ex TUL.) L.P. QUEIROZ**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à coordenação do curso
Ciências Biológicas da Universidade do
Estado do Amazonas para obtenção do título
de Licenciada em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof.^a Dra. Maria Astrid Rocha Liberato

Coorientador: Prof.^o Dr. Daniel da Silva

MANAUS – AM

2023

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.

D192gg Dantas, Alcineia dos Santos
Germinação de sementes e estabelecimento in vitro de
segmentos nodais de *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul)
L.P.Queiroz / Alcineia dos Santos Dantas. Manaus : [s.n],
2023.
52 f.: color.; 21 cm.

Graduação em Ciências Biológicas - Licenciatura -
Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2023.

Inclui bibliografia

Orientador: LIBERATO, M. A. R.

Coorientador: SILVA, D.

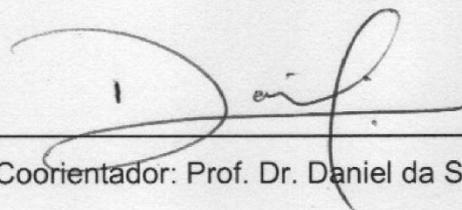
□ 1. Jucá. 2. Cultura de tecidos. 3. Plantas medicinal.
4. Micropropagação. I. LIBERATO, M. A. R. (Orient.).
II. SILVA, D. (Coorient.). III. Universidade do Estado do
Amazonas. IV. Germinação de sementes e estabelecimento
in vitro de segmentos nodais de *Libidibia ferrea* (Mart. ex
Tul) L.P.Queiroz

ALCINEIA DOS SANTOS DANTAS

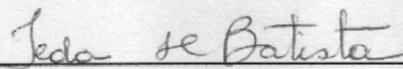
**GERMINAÇÃO DE SEMENTES E ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE
SEGMENTOS NODAIS DE *Libidibia ferrea* (MART. ex TUL.) L.P. QUEIROZ**

Aprovado em 2023

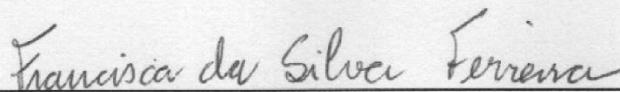
COMISSÃO DE AVALIAÇÃO



Coorientador: Prof. Dr. Daniel da Silva



Prof.^a Dra. Ieda Hortencio Batista



Prof.^a Dra. Francisca da Silva Ferreira

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela vida, por me iluminar e me guiar em mais uma etapa da minha vida.

Agradeço a minha família, principalmente meus pais Alcy José (*In memorian*) e Raimunda Fátima por todo amor, carinho, conselhos, paciência, e por sempre me apoiar em todas as minhas decisões. Ao meu esposo, Fladney Lima Dantas que me apoiou e se dedicou pra cuidar da nossa filha todos os dias, para assim possibilitar os meus estudos, minha querida filha Maria Eduarda, que desde do 2º mês de vida me acompanhou nesta jornada, pois cresceu entre meus livros e a correria do trabalho e minhas irmãs, Auxiliadora, Daniele, Alessandra, Alcilange e minha sobrinha Gabryelly, por toda ajuda, amizade, carinho e cumplicidade e a toda minha família pelo apoio.

Agradeço a minha orientadora, Dra. Maria Astrid Rocha Liberato pela oportunidade, orientação e por todos conselhos e conhecimentos transmitidos ao longo de todo o curso, e ao meu coorientador, Dr. Daniel Silva pela orientação e paciência, e por me apresentar vários ensinamentos sobre essa área tão fascinante que é a Cultura de Tecidos Vegetais.

Aos colegas de laboratório INPA-LASTED que me apoiaram durante a realização das pesquisas, Kamylla Rosas, Matheus, Rayssa Gomes e especialmente João Antônio por toda parceria e cumplicidade nesse período de experimentos.

As minhas amigas e amigos da CEST-UEA, Andressa da Silva, Lydiane, Viviane Uchôa e Janaina Martins, Davi Cardoso, Alan Gomes e Péricles pelas conversas infinitas e pela companhia que me fizeram quando estava longe de meus familiares.

Aos amigos da turma de Ciências Biológicas – UEA, principalmente a Tais Neves e Cila Silva pela cumplicidade e amizade, pelas parcerias nas aulas, as boas conversas na praça da ENS e pelo convívio harmonioso ao longo desses anos.

A todos os professores do curso de Biologia da UEA pelos conhecimentos e experiências compartilhadas que contribuíram na minha formação profissional.

A todos que de algum modo contribuíram para a realização dessa etapa da minha vida. Muito Obrigada!

“O Senhor protege todos os que o amam, mas destrói todos os ímpios. Que minha boca fale o louvor do Senhor e todo ser vivo bendiga o seu santo nome eternamente”

Salmos 144, 30-31

RESUMO

A espécie *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz, conhecida popularmente como pau-ferro ou jucá, pertence à família Fabaceae e apresenta grande valor medicinal devido ao potencial de seu princípio ativo, o “pau-ferrol”. Essa espécie apresenta dormência tegumentar com dificuldades na produção de mudas, o que prejudica sua propagação. Dessa forma, surge a necessidade de desenvolver protocolos eficientes para a propagação desta importante espécie medicinal. Este trabalho teve como objetivo estabelecer métodos de propagação *in vitro* testando diferentes substratos, diferentes produtos para assepsia dos explantes, bem como o estabelecimento de segmentos nodais de jucá *in vitro*. A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Silvicultura Tropical e Tecnologias Digitais (LASTED-INPA). As sementes de jucá foram fornecidas pelo Banco de Sementes do Laboratório de Microbiologia e Fertilidade do Solo do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA). Foi avaliado o uso de diferentes substratos na germinação de sementes de *L. ferrea*, a partir da análise do período do tempo de germinação e percentual de sementes germinadas utilizando dois tipos de substratos. Além disso, foi realizado o cultivo *in vitro* de *Libidibia ferrea*, a partir do uso de explantes retirados das plântulas germinadas testando diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (NaClO), álcool 70%, fungicidas Carbedazin® e Cabrio® Top. Observamos que houve 53% de sementes germinadas, testando os substratos solo orgânicos e solo composto de orgânico com areia na proporção 1:1, que favoreceram a formação e o desenvolvimento das plântulas uniformes de *L. ferrea* em condições *ex vitro*. Os resultados dos tratamentos de assepsia com diferentes agentes químicos não permitiram o estabelecimento de um protocolo.

Palavras chaves: jucá; cultura de tecidos; planta medicinal; micropropagação.

ABSTRACT

The species *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz, popularly known as pau-ferro or jucá, belongs to the Fabaceae family and has great medicinal value due to the potential of its active principle, "pau-ferrol". This species presents integumentary dormancy with difficulties in the production of seedlings, which impairs its propagation. Thus, the need arises to develop efficient protocols for the propagation of this important medicinal species. This work aimed to establish in vitro propagation methods by testing different substrates, different products for asepsis of explants, as well as the establishment of nodal segments of jucá in vitro. The research was carried out at the Laboratory of Tropical Silviculture and Digital Technologies (LASTED-INPA). Jucá seeds were provided by the Seed Bank of the Microbiology and Soil Fertility Laboratory of the National Institute for Research in the Amazon (INPA). The use of different substrates in the germination of *L. ferrea* seeds was evaluated, based on the analysis of the germination time period and the percentage of germinated seeds using two types of substrates. In addition, in vitro cultivation of *Libidibia ferrea* was carried out, using explants taken from germinated seedlings, testing different concentrations of sodium hypochlorite (NaClO), 70% alcohol, Carbedazin® and Cabrio® Top fungicides. We observed that there were 53% of germinated seeds, testing the substrates organic soil and soil composed of organic with sand in the proportion 1:1, which favored the formation and development of uniform seedlings of *L. ferrea* in ex vitro conditions. The results of the asepsis treatments with different chemical agents did not allow the establishment of a protocol.

Keywords: jucá; tissue culture; medicinal plant; micropropagation.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 Aspectos gerais de <i>Libidibia ferrea</i>	17
Figura 2 Princípio geral da cultura de células e tecidos vegetais.....	21
Figura 3 Implantação do experimento de germinação de <i>Libidibia ferrea</i>	27
Figura 4 Procedimentos dos experimentos de desinfestação de segmentos nodais de <i>Libidibia ferrea</i>	28
Figura 5 Germinação de Sementes da espécie vegetal <i>Libidibia ferrea</i>	33
Figura 6 Explantes de <i>Libidibia ferrea</i> contaminados por microrganismo após serem tratados com hipoclorito de sódio em diferentes concentrações.....	36
Figura 7 Explantes de <i>Libidibia ferrea</i> contaminados por microrganismos após serem tratado com álcool 70%.....	38
Figura 8 Explantes de <i>Libidibia ferrea</i> , contaminados por microrganismo após serem tratados com fungicida CabrioTop®.....	40
Figura 9 Explantes de <i>Libidibia ferrea</i> contaminados com microrganismos após serem tratados com fungicida cabendazim®.....	42
Figura 10 Explantes de <i>Libidibia ferrea</i> sem contaminação em tratamentos com agentes químicos combinados.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Classificação Taxonômica de <i>Libidibia ferrea</i>	15
Tabela 2 Tratamentos de segmentos nodais de <i>Libidibia ferrea</i> em diferentes concentrações de produtos químicos	29
Tabela 3 Cálculos do tempo médio de Germinação para sementes no tratamento T1 (solo orgânico) - R1 e R2.....	31
Tabela 4 Cálculos do tempo médio de Germinação para sementes no tratamento T1 (solo orgânico) - R1 e R2.....	32
Tabela 5 Porcentagem de Germinação para sementes no tratamento do orgânico e composto (solo orgânico, areia)	33
Tabela 6 - Desinfestação de segmentos nodais de <i>Libidibia ferrea</i> em diferentes concentrações de NaClO.....	35
Tabela 7 Desinfestação de segmentos nodais de <i>Libidibia ferrea</i> com Álcool 70% em diferentes tempos.....	37
Tabela 8 Desinfestação de segmentos nodais de <i>Libidibia ferrea</i> em diferentes concentrações de fungicida sistêmico Cabrio® Top.....	38
Tabela 9 Desinfestação de segmentos nodais de <i>Libidibia ferrea</i> em diferentes concentrações de fungicida sistêmico Carbendazim ®.....	39
Tabela 10 Desinfestação de segmentos nodais de <i>Libidibia ferrea</i> em diferentes concentrações e tempo de fungicida Cabrio® Top.....	41
Tabela 11 Desinfestação de segmentos nodais de <i>Libidibia ferrea</i> com fungicida Carbendazim® em diferentes concentrações e tempo	41
Tabela 12 Desinfestação de segmentos nodais de <i>Libidibia ferrea</i> , com combinado de produtos químicos, Álcool 70%, hipoclorito de sódio 2%, e Carbendazim® 2%, tempo de minutos.....	5 43pdf

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	ASPECTOS GERAIS DA ESPÉCIE <i>L. ferrea</i> (Mart. EX TUL.) L.P.QUEIROZ	15
2.1.1	Classificação botânica	15
2.1.2	Características da espécie	15
2.2	GERMINAÇÃO DE SEMENTES	17
2.3	PRINCÍPIOS QUÍMICOS E ATIVIDADE BIOLÓGICA <i>L. ferrea</i>	18
2.4	CULTURA DE TECIDOS VEGETAL.....	19
2.5	FATORES DETERMINANTES A CULTURA DE TECIDOS.....	21
2.6	DESINFESTAÇÃO E ESTABELECIMENTO <i>IN VITRO</i> DOS EXPLANTES..	22
3	JUSTIFICATIVA	24
4	OBJETIVOS	25
4.1	GERAL	25
4.2	ESPECÍFICOS	25
5	MATERIAL E MÉTODOS	26
5.1	LOCAL DA PESQUISA	26
5.2	OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL.....	26
5.3	DESENHO EXPERIMENTAL	26
5.3.1	Influencia de diferentes substratos na germinação de <i>L.ferrea</i> (Experimento I).	26
5.3.2	Efeito de diferentes concentrações de agentes químicos para desinfestação de segmentos nodais, de <i>L. ferrea</i> (Experimento II)	28
5.3.2.1	Obtenção do material vegetal e condições de cultivo	28
5.3.2.2	Tratamentos	29
5.3.2.3	Condições do cultivo in vitro	29
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
6.1	EXPERIMENTO I	31
6.2	EXPERIMENTO II	34
7	CONCLUSÃO	45
	REFERÊNCIAS	46

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é conhecido por ser um dos países de maior biodiversidade, em destaque a floresta amazônica, com grande diversidade de espécies em potencial para serem utilizadas com fins ornamental, cosmético, perfumaria e farmacêutica (SALATI *et al.*, 1998; CUNHA e PASCOALOTO, 2006).

Esse imenso patrimônio genético, já escasso nos países desenvolvidos, tem na atualidade valor econômico-estratégico inestimável em várias atividades, mas é no campo do desenvolvimento de novos medicamentos onde reside sua maior potencialidade (CALIXTO, 2003).

Dentre as diversas espécies com potencial medicinal na Amazônia, destaca-se o "jucá" ou "pau ferro" (*Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz), cujo principal produto de interesse é o princípio ativo denominado "pau-ferrol", um trímico chalcona que inibe o crescimento das células cancerígenas por meio da indução de apoptose (NOZAKI *et al.*, 2007; OHIRA *et al.*, 2013).

A espécie *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz (Fabaceae) é nativa do Brasil e encontrada, principalmente, na região Norte e Nordeste. (LORENZI, 1992). Apresenta propriedades terapêuticas tais como: anti-inflamatória, analgésica, antifúngica e antibacteriana, imunoestimulante, cicatrizante e hipoglicemiante, que foram confirmadas através de estudos científicos, e por esse motivo, a farmacologia desperta grande interesse por seus compostos (XIMENES, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2010). Assim, devido ao seu potencial medicinal, e suas aplicações na saúde pública no Brasil, o jucá com sinônimos botânicos *Apuleia ferrea* e *Caesalpinia leiostachya* foi incluído na lista de 71 espécies da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde – RENISUS.

Nos últimos anos, estudos têm apontado excelentes oportunidades para o aproveitamento integral dessa arbórea pelas indústrias alimentícias, farmacêuticas e madeireiras (BRASIL, 2011; 2013; RIBEIRO *et al.*, 2014), bem como pode ser utilizado em programas de reflorestamento de áreas degradadas por ser uma espécie arbórea tolerante às áreas abertas (LORENZI, 2002).

Entretanto, esta espécie apresenta uma produção irregular de sementes que, aliada à dormência tegumentar e à predação, leva a limitação da recomposição das populações naturais das matas (MAIA, 2004). A dormência, embora confira resistência

às condições desfavoráveis, tornando mais eficiente a perpetuação da espécie, pode representar um problema considerável para a agricultura, acarretando atraso, desuniformidade ou falhas de emergência das plântulas no campo, além de contribuir para avaliação incorreta da qualidade fisiológica de sementes em laboratório, e causar prejuízos aos programas de melhoramento genético (MARCOS FILHO *et. al.*, 2005).

Segundo Berwley e Black (1994), as sementes têm importante papel na produção de mudas e na conservação da biodiversidade, pois constituem fonte de material genético para melhoramento de plantas, funcionando como reservatórios de genes. Por outro lado, o processo germinativo é o fenômeno biológico da retomada do crescimento e desenvolvimento das estruturas essenciais do embrião, sob a ação de condições favoráveis intrínsecas e extrínsecas, podendo cada fator atuar por si ou em interação com os demais, sendo necessário ocorrer um conjunto de condições favoráveis, para que o processo germinativo aconteça de forma satisfatória (KERBAUY, 2019).

A temperatura, o oxigênio, a luz, e a água são os fatores ambientais mais importantes que influenciam o processo germinativo de sementes. Enquanto, a maturidade do embrião, e a permeabilidade do tegumento das sementes são os aspectos intrínsecos que mais merecem atenção.

A água é um dos fatores que influenciam o processo germinativo, pois através da sua absorção ocorrerá a reidratação dos tecidos, e retomadas das atividades metabólicas fundamentais ao fornecimento de energia e nutrição para a retomada do crescimento do embrião. Entretanto, a velocidade do deslocamento de água para interior da semente pode ser influenciada pelas características da permeabilidade do tegumento, e das propriedades dos coloides que constituem a semente (NASSIF, 1998).

Entre as alternativas desenvolvidas para obtenção de mudas, independente do processo germinativo, destaca-se a técnica de micropropagação (cultura de tecidos). Essa técnica é aplicada na produção comercial de mudas, e traz como principal vantagem a multiplicação do material vegetal em curto tempo (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998; HARTMANN *et al* 2011).

Carvalho *et al* (2011), relatam que cultura de tecidos é um conjunto de técnicas utilizadas para cultivar *in vitro*, células e tecidos vegetais em meio nutritivo sintético,

de composição definida, sob condições adequadas de assepsia, nutrição e fatores ambientais visando produzir uma nova planta.

Para a rápida regeneração das plantas medicinais em estabelecimento *in vitro* podem ser utilizadas diversas partes da planta-matriz como segmentos nodais, para serem fontes de explantes (CAMPOS *et al.* 2007), porém o sucesso da micropropagação está ligado ao genótipo da planta-matriz sujeita aos efeitos na resposta aos estímulos *in vitro*, independentemente do explante utilizado, (STEIN *et al.*, 2009).

O uso de segmentos nodais de origem basal e apical sem prévia subdivisão, em estudos de multiplicação *in vitro*, pode provocar uma fonte de variação na resposta final para várias espécies vegetais (PEREIRA e FORTES, 1999). Para atingir um controle sanitário de explantes são necessários estudos e metodologias mais específicos para a cultura *in vitro* (PINHAL *et al.*, 2011).

No entanto, um dos maiores obstáculos no estabelecimento *in vitro* de espécies lenhosas, está na dificuldade de obter tecidos livres de contaminações provocadas por fungos e bactérias e ainda por oxidações provocada por compostos fenólicos (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

De acordo com o exposto, a espécie *Libidibia ferrea* apresenta um grande potencial farmacológico devido ao seu princípio ativo. Em contrapartida a espécie apresenta baixa e irregular produção de sementes, para produção em nível industrial.

Desta forma, considerando a importância medicinal e as dificuldades de propagação desta espécie, se faz necessário conhecer os fatores que influenciam a germinação, e os agentes químicos mais eficazes na desinfestação de explantes, para possibilitar a produção de mudas saudáveis. Assim o objetivo desse trabalho foi estabelecer protocolos de germinação de sementes e estabelecimento da cultura *in vitro* de *Libidibia ferrea*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ASPECTOS GERAIS DA ESPÉCIE *Libidibia ferrea* (Mart. EX TUL.) L.P. QUEIROZ

2.1.1 Classificação botânica

Libidibia ferrea (Martius ex Tul.) L.P. Queiroz, anteriormente classificada como *Caesalpinia ferrea*, é uma angiosperma de porte médio, nativa da flora brasileira, pertencente à família Fabaceae (Leguminosae), subfamília Caesalpinioideae, tribo Caesalpinieae (GRINN, 2015), conhecida como pau-ferro brasileiro, leopardo ou jucá. Apresenta usos múltiplos por seus atributos madeira, paisagem, medicinal e forrageira, também prescritos para a recuperação de áreas degradadas (SANTANA *et al.*, 2011). A classificação taxonômica dessa espécie encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1 - Classificação taxonômica da espécie *Libidibia ferrea* (Martius ex Tul.) Queiroz

Nome completo	<i>Libidibia ferrea</i> (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz var. <i>férrea</i>
Sinonímia	<i>Caesalpinia ferrea</i> (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz
Reino	Planta
Filo	Magnoliophyta (Angiospermae)
Classe	Magnoliopsida (Dicotyledonae)
Subclasse	Rosidae
Ordem	Fabales
Família	Fabaceae
Subfamília	Libidibiaceae (Caesalpinioideae, Leguminosae)
Espécie	<i>Libidibia ferrea</i> (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz var. <i>ferrea</i>

Fonte: QUEIROZ *et al.*, 2009.

2.1.2 Características da espécie

Libidibia ferrea apresenta quatro variedades, sendo que três destas ocorrem na Caatinga (*L. ferrea* (Mart. ex Tul.) var. *ferrea* L.P. Queiroz, *L. ferrea* var. *glabrescens* (Benth.) L.P. Queiroz, e *L. ferrea* var. *parvifolia* Benth, e a variedade *Libidibia ferrea* var. *leiostachya* Benth é mais característica da Mata Atlântica (Queiroz 2009)

A variedade *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) var. *ferrea* L.P. Queiroz é uma árvore bastante ornamental, principalmente por sua copa arredondada, baixa e rala, e pelo

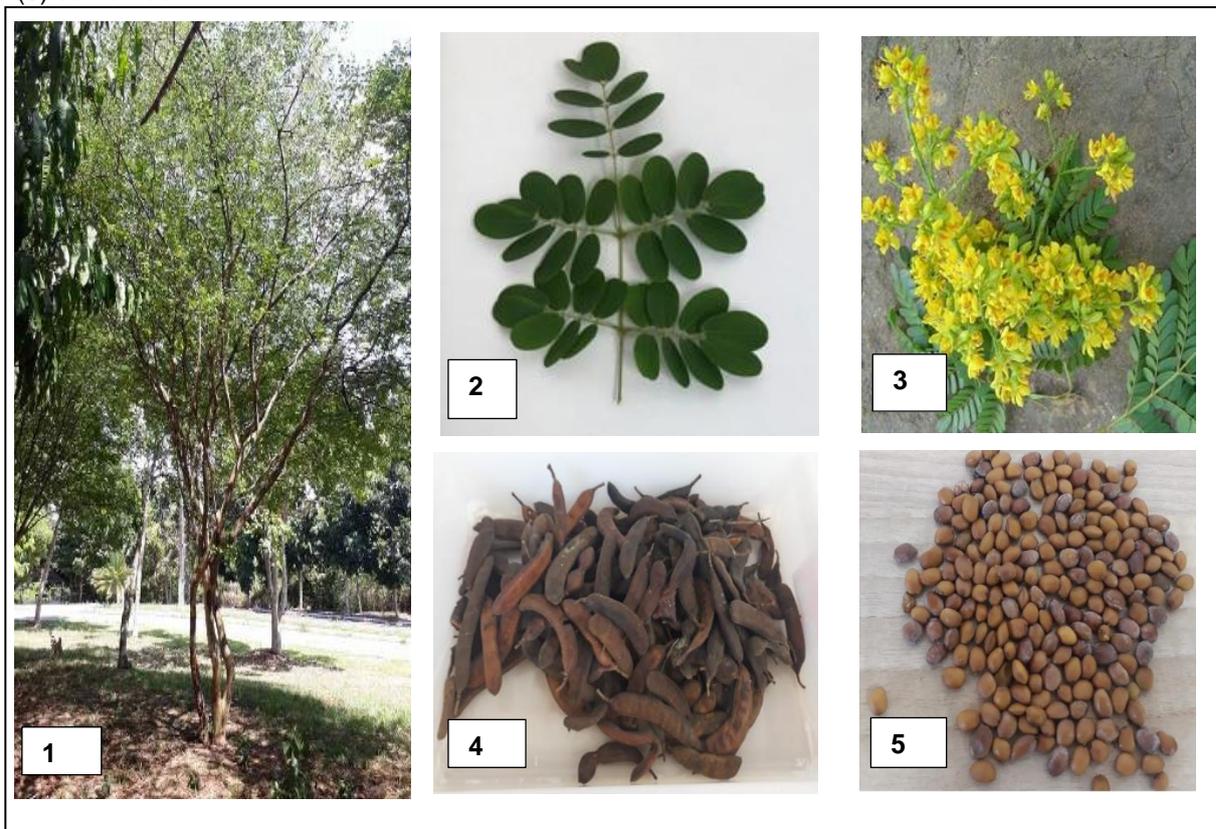
florescimento exuberante. Com tronco fenestrado e curto, com um diâmetro do tronco de 40 a 60 cm revestido por casca em placas finas e ramos pouco lenticelados, apresenta de 10 a 15 metros de altura (LORENZI, 2008; SILVA, 2015).

As folhas são alternas espiraladas, compostas e bipinadas. As flores são amarelas, dialipétalas, dispostas em panículas apicais e axiliares. O fruto é uma vagem indeiscente, muito dura, marrom, contendo poucas sementes por fruto. As sementes são de forma discoide ou ovoide, com uma base achatada e ápice arredondado e suas cores variam de verde claro a amarelado são separadas em cavidades individuais distintamente visíveis e apresentam disposição unisseriada e transversal (GALDINO *et al.* 2007) (Figura 1). Apresenta ampla dispersão, porém geralmente em baixa densidade populacional (LORENZI, 2008; SILVA, 2015).

As variedades de *Libidibia ferrea* apresentam uma multiplicidade de usos, como: ornamental, plantios em áreas degradadas, vigas, esteios, estacas na construção civil, na carpintaria e utilizadas como lenha. Por ter madeira de cerne muito duro de fibras reversas, recebeu o nome popular de pau-ferro (LORENZI, 2008). Na medicina popular os frutos são frequentemente utilizados, por serem considerados antidiarreicos, anticatarrais e cicatrizantes (MAIA, 2004).

De acordo com MACHADO (2018), o jucá possui um potencial para enriquecer o solo por meio da deposição e decomposição de serapilheira devido à queda antecipada de suas folhas ao final do período de chuvas. Sendo forrageira, fornece ramos e vagens nos períodos de estiagem para os animais.

Figura 1 - Aspectos gerais da espécie *Libidibia ferrea*. (1) árvore; (2) folhas; (3) flores; (4) fruto maduro; (5) sementes.



Fonte: Dantas, 2021.

2.2 GERMINAÇÃO DE SEMENTES

A germinação é um fenômeno biológico que se caracteriza como a retomada do crescimento do eixo embrionário, com o conseqüente rompimento do tegumento pela radícula. Entretanto, para os tecnólogos de sementes, a germinação é reconhecida como tal, desde que as plântulas apresentem tamanho suficiente para que se possam avaliar a normalidade de suas partes e a sua possibilidade de sobrevivência (LABOURIAU, 1983).

De acordo com Fowler e Bianchetti (2000) as sementes necessitam de condições ambientais adequadas, como a disponibilidade de água, oxigênio e temperatura ideal para que ocorra a germinação e para algumas espécies a luz. Porém, em *Libidibia ferrea* a dureza e a impermeabilidade do tegumento, dificulta a absorção de água, fazendo com que sua germinação seja desuniforme, mesmo em condições adequadas podem não germinar (DANTAS,2015). Apresenta dormência

mecânica, que na natureza pode ser quebrada quando passa pelo trato intestinal de ruminantes (Walter *et al.* 2018).

A palavra semente (do latim *seminilla*, diminutivo de *sêmen*, esperma) é o órgão responsável pela dispersão e perpetuação das espermatófitas, as plantas que as produzem.

O termo semente é utilizado para designar um óvulo maduro, possuindo um eixo embrionário em algum estágio de desenvolvimento, material de reserva alimentar (raramente ausente) e um envoltório protetor, o tegumento (DAMIÃO FILHO e MÔRO, 2001).

O embrião da semente inicia sua formação a partir do momento da fertilização do óvulo e desenvolve-se durante a maturação, até que seu crescimento cessa e o grau de umidade diminui a um nível tão baixo que permite apenas reduzir atividade metabólica. Nestas condições, a semente encontra-se no estado de quiescência, pois a disponibilidade de água (teor de água da semente), via de regra, é insuficiente para desencadear o processo germinativo (BORGES & RENA, 1993).

A germinação, assim, pode ser considerada como o reinício de crescimento do eixo embrionário, paralisado nas fases finais da maturação. Em síntese, tendo-se uma semente viável em repouso, por quiescência ou dormência, quando são satisfeitas todas as condições externas (do ambiente) e internas (intrínseca do órgão), ocorrerá o crescimento do eixo embrionário, o qual conduzirá à germinação. Assim, do ponto de vista fisiológico, germinar é simplesmente sair do repouso e intensificar a atividade metabólica (BORGES & RENA, 1993).

2.3 PRINCÍPIOS QUÍMICOS E ATIVIDADE BIOLÓGICA *Libidibia ferrea*

A espécie possui grande valor medicinal, podendo ser utilizado como importante ferramenta no tratamento da leucemia HL60 humana devido ao potencial do princípio ativo denominado de “Pau ferrol A”, um derivado de chalcona isolado da casca do jucá, que atua contra a topoisomerase II humana, e inibe o crescimento das células tumorais por meio da indução de apoptose, (NOZAKI *et al.*, 2007; OHIRA *et al.*, 2013).

Compostos ativos isolados e identificados do jucá foram estudados com relação à função terapêutica devido à presença de compostos secundários como saponinas,

flavonoides, cumarina, antraderivados, fenóis, taninos, quinonas, triterpenos, alcalóides, lactonas-sesquiterpenicas (GONZALEZ, 2005). Cavalheiro *et al.* (2009), afirmam que o jucá é larvicida contra *Aedes aegypti*. Além de possuir atividade antifúngica e antibacteriana (XIMENES, 2004).

Araújo *et al.* (2014), afirmam que o ácido gálico e catequinas foram encontrados nos extratos aquosos da entrecasca de *Libidibia ferrea* (Mart.) *var. ferrea*. 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).

O jucá é bastante utilizado na medicina popular, sendo atribuídas à sua casca propriedades anti-inflamatórias e analgésicas, e à entrecasca o tratamento de feridas, contusões, asma e tosse crônica. As folhas possuem concentrações de minerais como ferro e manganês, superiores às encontradas em outras plantas medicinais como capim santo, cidreira, colônia e malvariço, por exemplo (SILVA *et al.*, 2010). Os seus frutos são utilizados como antidiarreicos, antinaturais e cicatrizantes, enquanto suas raízes são antitérmicas (MAIA, 2004). Além a casca e os frutos são usados como adstringente, antidiabético bem como no combate de diarreias e sangramentos. O extrato dos frutos tem ação anti-inflamatória, imune estimulante, hiperglicemiante além de agir na inibição de tumores (LORENZI; MATOS, 2008).

Menezes *et al.* (2007), demonstraram que o extrato aquoso da casca de *Libidibia ferrea* promoveu vasodilatação da artéria mesentérica de ratos. É também apresentou atividade cicatrizante em lesões cutâneas de caprinos (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Desse modo, a espécie é uma das 71 plantas da lista de plantas medicinais de interesse para o Sistema de Saúde Brasileiro (RENISUS) e foi incluída no Formulário Nacional de Ervas Medicinais (BRASIL, 2011).

2.4 CULTURA DE TECIDOS VEGETAL

A Cultura de Tecidos Vegetal é o conjunto de técnicas utilizadas para cultivar *in vitro* células e tecidos vegetais em meio nutritivo sintético, de composição definida, sob condições adequadas de assepsia, nutrição e fatores ambientais visando produzir uma nova planta (PASQUAL, 1997, CARVALHO *et al.*, 2011).

Nessas técnicas, pequenos fragmentos de plantas, denominados explantes, são isolados de um vegetal, desinfestados e cultivados assepticamente em meio de cultura apropriado. O componente genético associado com a regeneração, determina a manutenção da competência morfogenética, e não somente a sensibilidade do tecido a reguladores de crescimento incorporados ao meio de cultura (KOORNNEEF et al. 1993).

Essas técnicas são possíveis devido à totipotência, capacidade apresentada pelas células vegetais, de originar novos órgãos ou uma planta completa (TERMIGNONI, 2005).

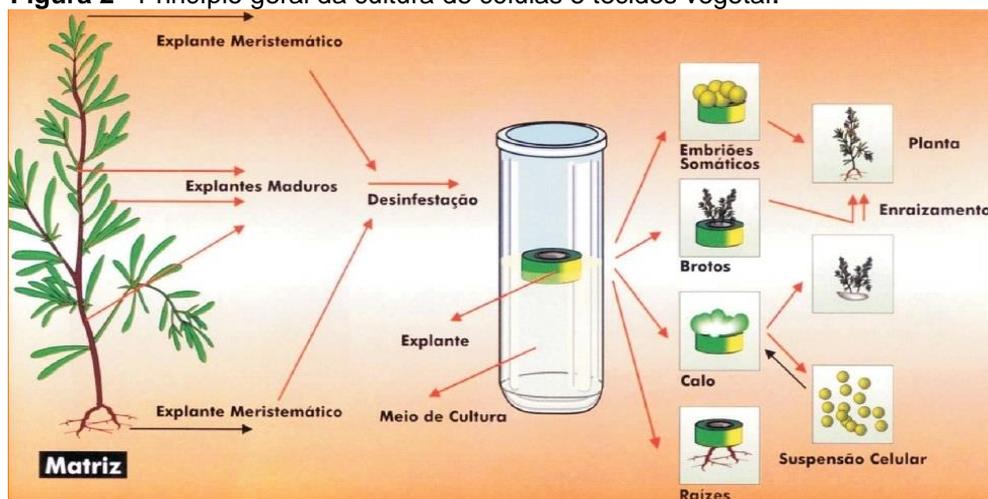
Pasqual *et al.* (1997), afirma que o sucesso da cultura de células, órgãos ou tecidos *in vitro* depende, em geral, da seleção do explante, das condições de temperatura e luminosidade em que a cultura é mantida, e do uso de meio de cultura apropriado para o estabelecimento da espécie vegetal.

A cultura de tecido tem como principal objetivo oportunizar uma alternativa de manipular plantas, inclusive em nível molecular destacando a recuperação de doenças; na propagação comercial de plantas; no melhoramento genético; no manejo, no intercâmbio e na conservação de germoplasma; e em outras aplicações com as pesquisas em fisiologia vegetal e produção industrial *in vitro* de compostos secundários (JUNGHANS & SOUZA, 2013).

Estima-se que seja uma alternativa econômica adequada em relação aos métodos clássicos de propagação de espécies florestais nativas, pois além de oferecer a possibilidade de propagação de árvores selecionadas, possibilita a limpeza clonal, obtendo-se plantas livres de vírus por meio de ápices caulinares e meristemas, superando problemas de contaminação patogênica (WENDLING *et al.*, 2006).

Além disso, possibilita fornecer mudas de qualidade genética e quantidade para suprir a necessidade do mercado em curto espaço de tempo (BHOJWANI e DANTU, 2013). Assim sendo, as principais técnicas de cultura de tecidos vegetal, são: a micropropagação, a embriogênese somática, a calogênese, a cultura de embriões e a suspensão celular visando à produção de metabólitos secundários (MORAIS *et al.*, 2012), como mostrado na Figura 2 Fonte: KEBAUY (1997).

Figura 2 - Princípio geral da cultura de células e tecidos vegetal.



Fonte: KEBAUY (1997).

2.5 FATORES DETERMINANTES A CULTURA DE TECIDOS

Vários fatores influenciam o sucesso da cultura de tecido, estado fisiológico da planta matriz, coleta de explantes, esterilização dos meios de cultura, condições de incubação, manipulação de subculturas e uso de reguladores de crescimento, e o meio de cultura (QUISEN *et al.*, 2008).

As medidas de controle e prevenção microbianas é um dos princípios básicos para o sucesso da cultura de tecidos. (PEREIRA *et al.*, 2011). As técnicas proporcionam um ambiente favorável para o crescimento de microrganismos, como bactérias, leveduras e fungos filamentosos (DANTAS *et al.*, 2002).

Dentro da cultura de tecidos, explante é qualquer tecido oriundo de uma planta capaz de iniciar uma cultura *in vitro*, podendo ser ele, um ápice caulinar ou radicular, uma gema axilar, um segmento nodal, um fragmento foliar, uma antera, um ovário ou embrião, e outros (CID, 2002). Sendo assim, qualquer parte do tecido vegetal pode ser utilizado como explante. Porém, na seleção deste, deve-se levar em consideração, aquele que possui maior proporção de tecido meristemático, ou que tenha maior capacidade de expressar a totipotência celular (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

O sucesso da micropropagação depende da sequência de fases ou etapas, em que o êxito de cada uma é necessário para o êxito da próxima etapa e a introdução do explante no meio de cultivo (estabelecimento), cujo sucesso depende de uma

eficiente assepsia dos explantes a serem estabelecidos (GEORGE, 1993; PEREIRA *et al.*, 2011).

As contaminações endógenas e exógenas por microrganismos e a oxidação fenólica são um dos maiores desafios à aplicação das técnicas de cultivo *in vitro*, principalmente em espécies arbóreas (SKIRVIN *et al.*, 1999; GEORGE e SHERRINGTON, 1984).

2.6 DESINFESTAÇÃO E ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DOS EXPLANTES

A descontaminação do explantes é uma das principais dificuldades dentro da cultura de tecidos. Desse modo, tratamentos assépticos aplicados nas plantas matrizes são determinantes para seu sucesso, principalmente, quando se trabalha com espécies possuidoras de microrganismos endógenos (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Assim, os tecidos de plantas excessivamente contaminados devem ser lavados em solução fraca de detergente e enxaguadas várias vezes em água destilada antes da esterilização. Os agentes desinfetadores mais utilizados em tratamentos de assepsia é o hipoclorito de sódio (NaOCl) em concentrações a partir de 0,25%, álcool 70%, fungicidas e bactericidas (LEBOWITZ, 1995).

A etapa do estabelecimento *in vitro* pode sufocar no que se refere ao tempo de exposição dos explantes aos agentes desinfetantes, até que seja completamente otimizado um protocolo de assepsia eficiente para determinada espécie. (PEREIRA *et al.*, 2009).

Sobre a desinfestação as substâncias com ação germicida, as mais utilizadas para a desinfestação superficial dos explantes são hipoclorito de sódio e o álcool 70% em diferentes concentrações e tempo de imersão. Geralmente, nos tratamentos de assepsia as concentrações variam de 0,5 a 2,0% e dura cerca de 40 minutos.

O meio de cultura é um meio nutritivo que deve suprir tecidos vegetais cultivados *in vitro*, com nutrientes para o desenvolvimento dos explantes utilizados. Assim, sua composição deve fornecer macro e micronutrientes, uma fonte de carboidrato que geralmente é a sacarose, e, certos componentes orgânicos como vitaminas, aminoácidos e reguladores de crescimento, que proporcionam um crescimento maior para as plântulas cultivadas *in vitro* (PASQUAL *et al.*, 1997).

O meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) é largamente empregado, com algumas alterações, obtendo resultados satisfatórios para várias espécies. Altas concentrações de sais no meio MS podem inibir o desenvolvimento da planta *in vitro*, mesmo na presença de auxinas. Contudo, o uso de meios menos concentrados tem permitido melhores resultados na germinação, enraizamento e multiplicação de espécies frutíferas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

As principais dificuldades no estabelecimento *in vitro*, é a oxidação caracterizada pelo escurecimento dos explantes relacionado a liberação de compostos fenólicos um dos mais frequentes no cultivo *in vitro* (CARVALHO, 2003). Estes compostos podem ser liberados por zonas do explante que sofreram cortes, o que dificulta a adaptação e o crescimento da planta.

Tal problema se agrava quando se trabalha com espécies lenhosas, que são ricas nesses compostos, muito pela produção de lignina (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Para controle da oxidação é comum a adição de compostos antioxidantes ao meio de cultivo, como o carvão ativado, a polivinilpirrolidona (PVP) e o ácido ascórbico (GALDIANO JUNIOR *et al*, 2012).

Na fase de estabelecimento do cultivo, a contaminação pode comprometer o trabalho de micropropagação. Quando é exógena, a possibilidade de controle dos principais agentes contaminantes (fungos e bactérias) é considerável; quando a contaminação é endógena, as consequências podem ser limitantes, podendo haver perda de tempo de recursos financeiros e de material genético (SOUZA *et al.*, 2006). Para minimizar a contaminação necessitar-se estudos, testes e protocolos adequados adaptados a cada espécie.

3 JUSTIFICATIVA

A espécie *Libidibia ferrea* apresenta um grande valor para indústria farmacêutica devido a ação do princípio ativo “Pau-ferrol A” com atividade inibidora contra células cancerígenas. Entretanto, essa espécie apresenta baixa e irregular produção de sementes, além de dormência tegumentar (DANTAS,2015). O que dificulta sua propagação.

Deste modo, conhecer os fatores que influenciam a germinação, e os agentes químicos mais eficazes na desinfestação de explantes, é uma alternativa eficaz para viabilizar a produção de mudas saudáveis com a qualidade genética indispensável para a produção de fitoterápicos e que produzam os metabólitos de interesse medicinais em ambientes monitorados em grande escala para indústrias farmacêuticas.

4 OBJETIVOS

4.1 GERAL

Estabelecer protocolos de germinação de sementes de *Libidibia ferrea*, e de desinfestação de explantes para estabelecimento *in vitro*.

4.2 ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito de diferentes substratos na germinação de sementes de *Libidibia ferrea*;

Avaliar diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (NaClO), na desinfestação dos explantes de segmentos nodais *Libidibia ferrea*;

Avaliar a ação do álcool 70% na desinfestação de *L. férrea* em diferentes períodos;

Avaliar a eficácia das diferentes concentrações dos fungicidas Hipoclorito de Sódio, Carbedazin® e Cabrio® Top na desinfestação de segmentos nodais de *Libidibia ferrea*.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 LOCAL DA PESQUISA

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Silvicultura e Tecnologias Digitais do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (LASTED-INPA).

5.2 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

As sementes de *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz, foram fornecidas pelo Banco de Sementes do Laboratório de Microbiologia e Fertilidade do Solo do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), Manaus, Brasil. A espécie em questão foi identificada pelo Prof. Dr. Luiz Augusto Gomes de Souza, e a exsicata encontra-se registrada no herbário do INPA, sob o número 228.022.

5.3 DESENHO EXPERIMENTAL

5.3.1 Influência de diferentes substratos na germinação de *Libidibia ferrea* (Experimento I).

As sementes de *Libidibia ferrea* foram escarificadas em pedra de esmeril até produzir uma pequena abertura possibilitando a absorção de água, e em seguida, submetidas a assepsia em uma solução de hipoclorito de sódio a 1%, durante três minutos. Após isso, as sementes foram colocadas em uma solução de álcool 70% durante três minutos e lavadas em água destilada (duas vezes) para remoção de microorganismos, e colocadas para embebição durante 24 horas.

Em seguida foram utilizadas cem (100) sementes para compor dois tratamentos (T):

T1 - Solo orgânico - foram utilizadas 50 sementes escarificadas, dispostas em duas repetições de 25 sementes cada;

T2 - Solo Composto (orgânico e areia na proporção de 1:1) - foram utilizadas 50 sementes escarificadas, dispostas em duas repetições de 25 sementes cada.

Figura 3 - Experimento de germinação com sementes escarificadas de *Libidibia ferrea*.
 1 – semente secando; 2 – semeadura da semente; 3 – início da germinação;
 4 – abertura dos cotilédones



Fonte: Dantas, 2021

O experimento foi acompanhado durante trinta dias, e o critério para considerar as sementes germinadas foi a abertura dos cotilédones. Foram analisados o tempo médio (t) e o percentual de germinação (G) seguindo as fórmulas propostas por Labouriau & Valadares (1976). OS dados desse experimento foram submetidos a estatística descritiva.

Tempo médio (t): avalia a rapidez de ocupação de uma espécie em seu ambiente, $t = \sum ni \cdot ti / T$.

Para obtenção da porcentagem de germinação foi utilizada a seguinte equação:

Porcentagem de germinação : $G = n \times 100 / N$;

Onde: G : percentual de sementes germinadas;

n : número de sementes germinadas;

N : número total de sementes postas para germinar.

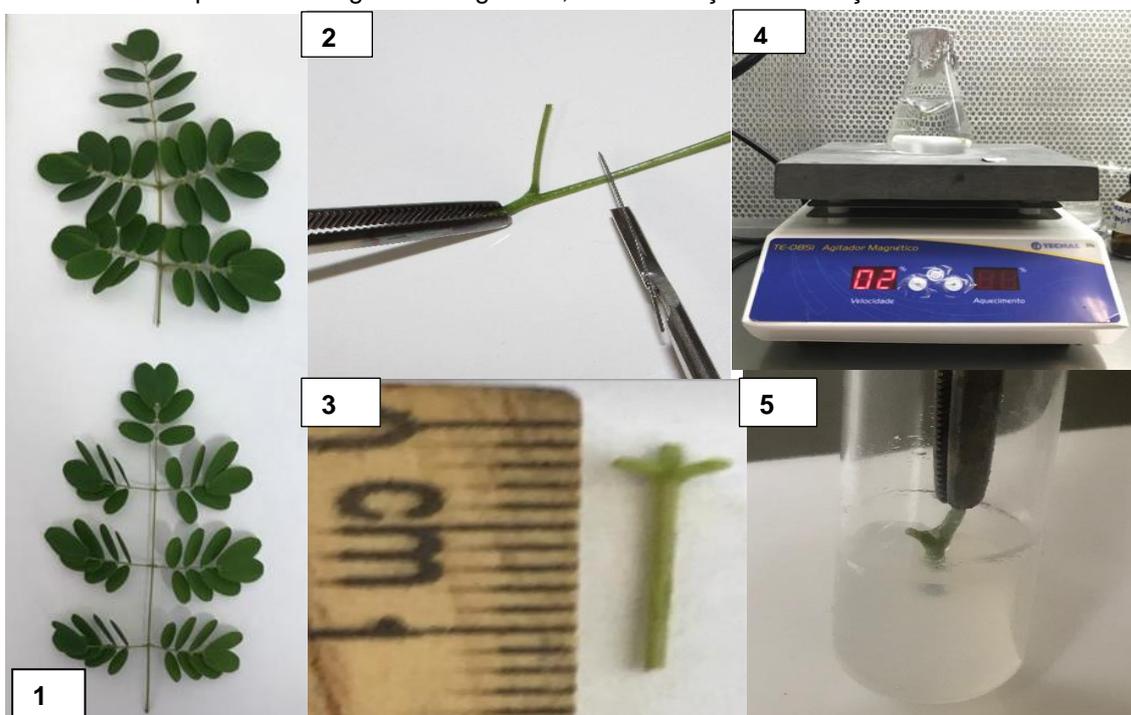
5.3.2 Efeito de diferentes concentrações de agentes químicos para desinfestação de segmentos nodais, de *Libidibia ferrea* (Experimento II).

5.3.2.1 Obtenção do material vegetal e condições de cultivo

O material vegetal utilizado foram explantes de segmentos nodais de *Libidibia ferrea* provenientes de plântulas obtidas do Experimento I deste trabalho.

Antes da poda foi aplicada assepsia durante 15 dias com fungicida sistêmico comercial Cabrio® Top 4%((Piraclostrobina). Em seguida, as folhas foram eliminadas e as hastes foram cortadas em segmentos e foram lavadas com detergente e enxaguadas com água corrente por 1 minuto. Em câmara de fluxo, as hastes foram cortadas em segmentos de 2 cm, e estes segmentos, denominados segmentos nodais, foram utilizados em um experimento composto por sete (07) tratamentos de desinfestação com agentes químicos (Figura 3).

Figura 4 - Procedimentos com segmentos nodais de *Libidibia ferrea*. 1 – Segmentos nodais obtidos de plântulas. 2 – Excisão dos explantes; 3 – Explante dos segmentos nodais; 4 – Assepsia dos explantes em agitador magnético; 5 – inoculação em solução desinfetante.



Fonte: DANTAS, 2021

5.3.2.2 Tratamentos

Nos tratamentos foram utilizados segmentos nodais retirados de plântulas do viveiro (LASTED-INPA), e foram submetidos ao processo de assepsia realizadas no agitador magnético com produtos químicos em concentrações conforme mostra a tabela 2, em seguida foram lavadas três vezes com água destilada.

Tabela 2 - Tratamentos de segmentos nodais de *Libidibia ferrea* em diferentes concentrações de produtos químicos

Tratamentos	Explantos (n=9)	Tempo Minutos	Hipoclorito (%)	Álcool (%)	Carbedazim® (%)	Cabrio®Top (%)
I	9	10	0,5			
	9	30	1	-	-	-
	9	60	2.0			
II	3	1.0		70		
	3	5.0	-	70	-	-
	3	10		70		
III	9	10			0,5	
	9	30	-	-	1	-
	9	60			2	
IV	9	10				0,5
	9	30	-	-	-	1
	9	60				2
	9	30,60,120				25
V	9	30,60,120	-	-	-	50
	9	30,60,120				75
	9	30,60,120				100
	9	30,60,120			25	
	9	30,60,120			50	
VI	9	30,60,120	-	-	75	-
	9	30,60,120			100	
	9	30,60,120				
IIV	9	5	2.0	70	2	-

Fontes: DANTAS,2021

5.3.2.3 Condições do cultivo in vitro

Para verificar a eficácia dos tratamentos de desinfestação, os explantes de *Libidibia ferrea* foram inoculados em câmara de fluxo, individualmente, em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 10 ml de meio de cultura MS. A incubação foi mantida com temperatura de 25 ± 2 °C em condição luminosa de $31 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas com acompanhamento diário. Após 30 dias de crescimento, os explantes

foram avaliados quanto a porcentagem de sobrevivência. Para os explantes contaminados foi verificado o percentual total das seguintes variáveis: vivo, morto, tipo de contaminação e oxidação. Os dados desse experimento foram submetidos a estatística descritiva no programa Minitab.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 EXPERIMENTO I

Nesse experimento houve germinação nos dois tratamentos. No tratamento Solo Orgânico (T1), o processo de germinação das sementes de *Libidibia ferrea*, teve início no decimo terceiro dia após a semeadura. Porém, no tratamento Solo Composto (T2), a germinação iniciou somente no décimo oitavo dia após a semeadura. O tempo médio de germinação (TMG) no tratamento T1 foi de 06 dias, e no tratamento T2 foi de 12 dias, conforme mostram as Tabelas 03 e 04.

Tabela 03 - Cálculos do tempo médio de germinação para sementes no tratamento T1- (solo orgânico), nas duas repetições - R1 e R2.

R1			R2		
(ti)	Nº de Sementes Germinadas	NI * TI	(ti)	Nº de Sementes Germinadas	NI * TI
13	1	1*13= 13	13	1	1*13 = 13
14	1	2*14 = 28	14	0	0*14 = 0
15	1	1*15 = 15	15	1	1*15 = 15
16	0	0*16 = 0	16	3	3*16 = 48
17	0	0*17 = 0	17	2	2*17= 34
18	1	1*18 = 18	18	1	1*18 = 18
19	2	2*19 = 38	19	0	0*19 = 0
20	2	2*20 = 40	20	0	0*20 = 0
21	2	2*21 = 42	21	4	4*21 = 84
30	0	0*30 = 0	30	0	0*30 = 0
TOTAL		194	TOTAL		212
NI * TI / T		(194/30)=6,5	NI * TI / T		(212/30)=7

Fontes: DANTAS, 2021

Avaliando diferentes substratos a serem empregados em teste de germinação para sementes de *Acacia mangium* Willd., LIMA & GARCIA (1996) verificaram que o substrato areia não conferiu bons resultados quanto à velocidade de germinação.

Tabela 4 - Cálculos do tempo médio de germinação para sementes no tratamento T2- (solo composto), nas duas repetições - R1 e R2.

R1			R2		
(ti)	Nº de Sementes germinadas	NI * TI	(ti)	Nº de Sementes germinadas	NI * TI
18	1	1*18 = 18	18	2	2*18 = 36
19	1	1*19 = 19	19	1	1*19 = 19
20	2	2*20 = 40	20	2	2*20 = 40
21	1	1*21 = 21	21	0	0*21 = 0
22	2	2*22 = 44	22	1	1* 22 = 22
23	2	2*23 = 46	23	2	2*23 = 46
24	3	3*24 = 72	24	0	0*24 = 0
25	2	2*25 = 50	25	1	1* 25 = 25
26	1	1*26 = 26	26	2	2*26 = 52
27	3	3*27 = 81	27	2	2*27 = 54
TOTAL		417	TOTAL		294
NI * TI / T		13,9	NI * TI / T		9,8

Fonte: DANTAS, 2021.

A germinação das sementes, no tratamento solo composto começou no décimo oitavo dia após a semeadura, e de acordo com Carvalho; Nakagawa, (2000), o tempo da capacidade de germinação nos vegetais ocorrem devido as diferentes intensidades de dormência de suas sementes, quando uma semente pode estar pronta para a germinação, outras podem levar meses até anos para germinar.

Figura 5 – Germinação de sementes da espécie vegetal *Libidibia férrea* em substrato composto.



Fonte: DANTAS, 2021

A porcentagem de germinação das sementes neste experimento foi 44% no tratamento (T1) sendo, 22 sementes germinadas e 62% no tratamento (T2), com 31 sementes germinadas, como mostra a Tabela 5. Para Lucena *et al.* (2003) a fonte e a dosagem de matéria orgânica são fatores decisivos na germinação das sementes. A areia obteve o melhor substrato para germinação de sementes de ipê-amarelo *Tabebuia serratifolia* (Vahl.), (SOUZA *et al.*, 2003; e NETO 2011).

Tabela 5 – Porcentagem de germinação para sementes nos tratamentos solo orgânico e solo.

Germinação	Sementes Plantadas	Sementes Germinadas	Porcentagem de germinação (G) (%)	Média de Germinação (%)
R1/ solo orgânico	25	12	$12 \cdot 100 / 25 = 48$	
R2/ solo orgânico	25	10	$10 \cdot 100 / 25 = 40$	44
R1/solo composto	25	18	$18 \cdot 100 / 25 = 72$	
R2/solo composto	25	13	$13 \cdot 100 / 25 = 52$	62
Total de sementes Germinadas				53

Fonte: DANTAS, 2021

Neste estudo o substrato solo composto (solo orgânico e areia), apresentou maior potencial de germinação. Em seus estudos de germinação com araticum Cavalcante et al. (2008), não encontraram diferenças significativas entre tratamentos, quando utilizaram os substratos composto vegetal processado, casca de coco, vermiculita, turfa e substrato comercial Plantmax®.

Analisando o processo de germinação, em todos os tratamentos verificou-se que o processo de germinação de *Libidibia ferrea* é epígea e fanerocotiledonar. Segundo Floriano (2004, pg.2). “O hipocótilo alonga-se e curva-se para cima, levando os cotilédones para fora do solo que se expandem em órgãos fotossintéticos, o tegumento se desprende e a plântula forma o caule com as primeiras folhas”.

6.2 EXPERIMENTO II

No experimento II, foram realizados três tratamentos de assepsia testando diferentes concentrações de hipoclorito de sódio para a desinfestação dos segmentos nodais de *Libidibia férrea*, nas concentrações de 0,5%, 1,0% 2,0%. Esses resultados mostraram que nenhum tratamento proposto foi eficiente para eliminação dos microrganismos, visto que houve 100% de contaminação, nas diferentes proporções testadas (Tabela 6).

A assepsia do material vegetal é fundamental a para evitar a contaminação do meio de cultura por fungos e bactérias, na propagação in vitro, exigindo mais cuidados, da obtenção do material vegetal até o manuseio em laboratório da câmara de fluxo laminar (XAVIER et al., 2009).

Os explantes submetidos ao processo de assepsia com hipoclorito, possuem um alto índice de contaminação, sendo 100% contaminação fúngica em todos os tratamentos, e a bacteriana 73,7% dos tubos de ensaio.

Tabela 6 - Desinfestação de segmentos nodais de *Libidibia ferrea* em diferentes concentrações de NaClO. Percentual (%) de contaminação fúngica e bacteriana, e de oxidação.

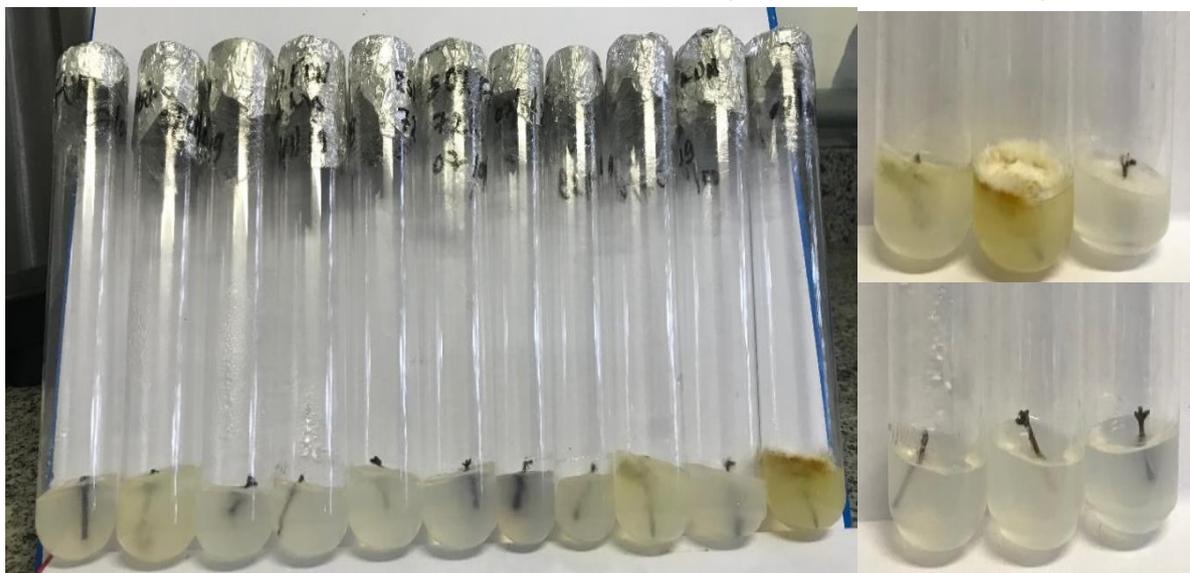
Tratamentos NaClO	Tempo Minutos	Explantos mortos (%)	Explantos vivos (%)	C fúngica (%)	C bacteriana (%)	Oxidação (%)
0,50%	10	100	0	100	100	0
0,50%	30	100	0	100	100	0
0,50%	60	100	0	100	66	0
1,0 %	10	100	0	100	100	0
1,0 %	30	100	0	100	100	0
1,0 %	60	100	0	100	66	0
2,0%	10	100	0	100	66	33
2,0 %	30	100	0	100	33	33
2,0 %	60	100	0	100	33	33
Total		100	0	100	73,7	14,6

Fonte: DANTAS, 2021.

Após 7 dias de inoculação dos explantes houve o surgimento de fungos e bactérias em todas as concentrações de NaClO, e em todos os tempos de exposição testadas. Os explantes tratados com 2% de NaClO apresentaram 33% de oxidação, o que corresponde a 14,6% dos ensaios.

Esse trabalho corrobora com Silva *et al.*, (2019) que mostra em tratamentos com NaClO 0,75%,1%,1,25% de cultivo *in vitro* de *Rosa* spp., popularmente chamadas de mini-rosas ou rosa-meninas, avaliou-se 100% de contaminação, sobrevivência e necrose dos explantes. De acordo com os dados neste trabalho obtidos, verificou-se alta taxa de contaminação em todos os tratamentos como mostra a Tabela 6 e a Figura 6. Portanto, ambos tratamentos foram ineficientes na assepsia dos segmentos nodais em mini-rosa e no jucá.

Figura 6 – Explantes de *Libidibia ferrea* inoculadas em meio MS, contaminado por microrganismos após serem tratadas com hipoclorito de sódio em diferentes concentrações. 1 – Tubos de ensaio com explantes submetidos ao tratamento; 2 – Contaminação microbiana; 3 – Oxidação.



Fonte: Dantas, 2021

Resultados distintos com hipoclorito de sódio foram encontrados no trabalho de Freitas (2014) em processo de desinfestação de *Annona squamosa* (L.), no tempo de 10 minutos de exposição apresentaram índices de contaminação fúngica de 85%. Com o aumento do tempo de exposição dos explantes para 20 minutos houve uma redução da contaminação fúngica para 12,5%. Nietzsche *et al.* (2006) afirmam que podem ocorrer desidratação dos explantes dependendo do tempo de imersão em hipoclorito de sódio e que este é mais tóxico do que o hipoclorito de cálcio.

Com relação à oxidação, verificou-se que o tratamento com 2% de hipoclorito de sódio apresentou a maior frequência, com 33% em cada experimento do tratamento, verificando assim que esta concentração permitiu acelerar o processo de oxidação. Os resultados concordam com Vianna *et al.* (2003) que utilizaram hipoclorito de sódio com concentração de 1%, para desinfestar os explantes de mamoeiro, onde constatou contaminação total de explantes, principalmente por bactérias.

No tratamento II, foi avaliado a eficiência do álcool na concentração 70% na desinfestação dos explantes de *Libidibia ferrea*. Contudo, 7 dias após a inoculação houve o aparecimento de fungos e bactérias nos diferentes tempos testados como observamos na tabela 7.

Tabela 7 – Tratamentos de segmentos nodais de *Libidibia ferrea* a de Álcool 70% em diferentes tempos. Percentual (%) de contaminação fúngica e bacteriana, e de oxidação.

Tratamentos	Tempo Minutos	Explantos mortos (%)	Explantos vivos (%)	C Fúngica (%)	C Bacteriana (%)	Oxidação (%)
Álcool 70%	1	100	0	100	100	0
Álcool 70%	5	100	0	100	33	33
Álcool 70%	10	100	0	0	66	100
TOTAL		100	0	66,6	66,6	44,3

Fonte: Dantas, 2021.

Os tratamentos no álcool 70%, obteve 66,6 % de contaminação fúngica e bacteriana, e o nível de oxidação total 44.3%.

No tempo de 01 minuto, três (03) explantes foram contaminados por fungos e bactérias porém não oxidaram, provavelmente, devido ao tempo do tratamento pré-estabelecido.

No tempo de 5 minutos, 02 explantes foram contaminados por fungos, e 01 por fungos, bactéria além de sofrerem oxidação.

No tratamento de 10 minutos ocorreu oxidação total de explantes, não ocorrendo contaminação por fungos, e somente 01 explante foi contaminado por bactéria, conforme mostra a Tabela 7.

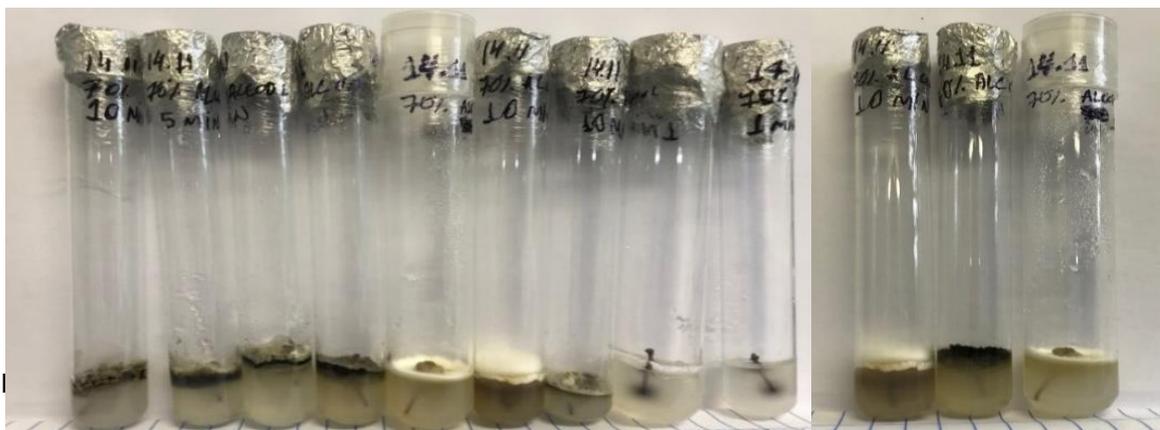
Conforme Naue *et al.* (2007), nos seus experimentos com a espécie vegetal *Nicotiana tabacum*, para controlar os microrganismos contaminantes, foi adotado o uso de álcool 70% e hipoclorito de sódio, sendo que estes desinfetantes não foram eficientes no combate microbiano.

O álcool é um dos produtos mais utilizados na desinfestação contra microrganismos, pois desnatura proteína e incrementa a permeabilidade da membrana. Sobre a atividade antimicrobiana dos álcoois, Pelczar *et al.* (1996), comenta que se deve à sua capacidade de desnaturar proteínas. Além disso, parte de sua eficiência como desinfetante, está relacionada à ação detergente na remoção mecânica de microrganismos.

Outra característica constatada é a relação ao tempo de exposição do material vegetal em álcool 70%, pois quanto mais tempo, maior chance de ocasionar a oxidação dos explantes. Nesse caso, principalmente em espécie nativas tropicais que apresentam altas concentrações de compostos a oxidação acontece em função da

liberação de compostos fenólicos *in vitro*, precursores da lignina, por injúrias nos tecidos ou senescência das espécies (GEORGE; SHERRINGTON, 1984).

Figura 7 – Explantes de *Libidibia ferrea* inoculadas em meio MS, contaminado por microrganismos após serem tratadas com álcool 70%. – Tubos de ensaio com explantes submetidos ao tratamento e com contaminação microbiana.



Fonte: DANTAS, 2021.

Ao analisar o uso do fungicida Cabrio®Top no tratamento III em diferentes concentrações (0,5%,10%,2,0%) e nos diferentes tempos de exposição (10,30,60 minutos) constatou-se a presença de contaminação microbiana após dez dias da inoculação do material vegetal no meio de cultura (Tabela 8 e Figura 8).

Tabela 8 - Desinfestação de segmentos nodais de *Libidibia ferrea* em diferentes concentrações de fungicida sistêmico Cabrio® Top. Contaminação (C) fúngica e bacteriana.

Tratamentos Cabrio®Top	Tempo minutos	Explantes Mortos (%)	Explantes vivos (%)	C fúngica (%)	C bacteriana (%)	Oxidação (%)
0,50%	10	100	0	100	100	100
0,50%	30	100	0	100	100	100
0,50%	60	100	0	100	66	100
1,00%	10	100	0	66	100	100
1,00%	30	100	0	66	100	66
1,00%	60	100	0	66	100	100
2,00%	10	100	0	0	66	66
2,00%	30	100	0	33	66	100
2,00%	60	100	0	0	66	100
TOTAL		100	0	59	84,8	92,44

Fonte: DANTAS, 2021.

Os tratamentos com fungicida Cabrio® Top, teve uma contaminação de fúngica 59% total de tratamento deste experimento, sendo menor que a contaminação bacteriana que foi de 84,8% e o nível de oxidação de 92,44% (Tabela 8).

O aumento das concentrações de fungicida e tempo de exposição dos explantes na solução, não foram eficientes para todos os tratamentos, pois além da alta contaminação microbiana houve o aumento da oxidação associada ao aparecimento de fungos e bactérias. Destaca-se que fungicidas sistêmicos são comumente usados no controle assépticos de explantes vegetais dentro da cultura de tecidos. (GOULART; FIALHO, 1999).

No tratamento IV, utilizou-se o fungicida Carbendazim®, para desinfestação de segmentos nodais *Libidibia ferrea* provenientes de viveiro.

Tabela 9 – Desinfestação de segmentos nodais de *Libidibia ferrea* em diferentes concentrações de fungicida sistêmico Carbendazim®. Contaminação (C) fúngica e bacteriana.

Tratamento Carbendazim®	Tempo minutos	Explantes mortos (%)	Explantes vivos (%)	C Fúngica (%)	C Bacteriana (%)	Oxidação (%)
0,50%	10	100	0	100	100	0
0,50%	30	100	0	66	100	33
0,50%	60	100	0	66	100	100
1,00%	10	66	33	0	33	33
1,00%	30	100	0	33	33	100
1,00%	60	100	0	66	66	100
2,00%	10	100	0	0	33	100
2,00%	30	100	0	0	33	100
2,00%	60	100	0	0	66	100
TOTAL		96,2	3,6	37	71	74

Fonte: DANTAS, 2021.

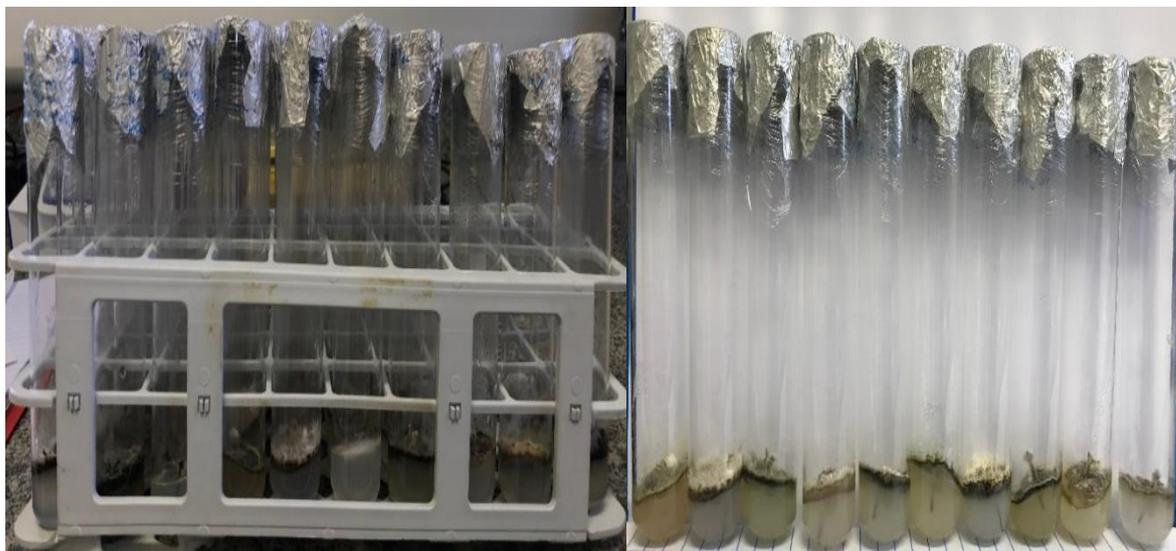
O fungicida Carbendazim® obteve um índice de contaminação fúngica de 37%, bem menor do que no tratamento III (tabela 9), usando o Cabrio®Top que obteve de 67% respectivamente (Tabela 8).

Em relação a bactérias, o índice de contaminação foi de 71%, e a oxidação variou conforme o tempo de exposição dos explantes, -quanto menor o tempo exposto dos explantes menor a chance de oxidação.

Os dados observados neste trabalho, corroboram com PEREIRA *et al.* (2007) que avaliou a aplicação de fungicida sistêmico é um procedimento eficiente na

desinfestação de explantes em plantas tratadas em casa de vegetação como o *Jacaranda decuens*, apresentou baixo nível de contaminação.

Figura 8 – Explantes de *Libidibia ferrea*, contaminados por microrganismos após serem tratadas fungicida Cabrio®Top. Tubos de ensaio com explantes submetidos ao tratamento



Fonte: DANTAS,2021

Os tratamentos com fungicida Cabrio® Top de 0.5% a 2% não foram eficazes, então utilizou-se maiores porcentagem de fungicida sendo 25% ,50%;75% e 100% em diferentes tempo de exposição 30, 60,120 respectivamente como mostra a tabela 8. Entretanto, o tempo de exposição dos explantes ao fungicida Cabrio® Top, possibilitou o aumento de oxidação, sendo esta a maior causa de mortes dos explantes, por outro lado, as contaminações por fungos e bactérias foram diminuídas em uma grande porcentagem respectivamente 48% e 70%. Isto pode ser atribuído ao tempo de exposição dos explantes no fungicida que possibilitaram o aumento de oxidação para 91,58%, levando assim a maior causa das mortes dos explantes, entretanto as contaminações por fungos e bactérias foram diminuídas em uma grande porcentagem respectivamente 33% e 59% como mostra os resultados apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 – Desinfestação de segmentos nodais de *Libidibia ferrea* em diferentes concentrações e tempo de fungicida Cabrio® Top. Contaminação(C) fúngica e bacteriana.

Tratamentos Cabrio® Top	Tempo minutos	Explantos mortos (%)	Explantos vivos (%)	C fúngica (%)	C Bacteriana (%)	Oxidação (%)
25%	30	100	0	66	100	33
50%	30	100	0	33	66	66
75%	30	100	0	66	66	100
100%	30	100	0	0	33	100
25%	30	100	0	33	66	100
50%	60	100	0	66	66	100
75%	60	100	0	33	33	100
100%	60	100	0	0	33	100
25%	120	100	0	66	66	100
50%	120	100	0	33	66	100
75%	120	100	0	33	33	100
100%	120	100	0	0	0	100
TOTAL		100	0	35,75	52,33	91,58

Fonte: DANTAS ,2021

O tratamento V avaliou a ação do fungicida Carbedazin® na desinfestação de segmentos nodais de *L. férrea*, como apresentado na Tabela 11.

Tabela 11 – Desinfestação de segmentos nodais de *Libidibia ferrea* em diferentes concentrações e tempo de fungicida Carbedazim®. Contaminação(C) fúngica e bacteriana

Tratamentos Carbedazim®	Tempo minutos	Explantos mortos (%)	Explantos vivos (%)	C Fúngica (%)	C Bacteriana (%)	Oxidação (%)
25%	30	66	33	33	33	33
50%	30	100	0	66	66	33
75%	30	100	0	100	33	33
100%	30	100	0	0	33	100
25%	60	100	0	33	33	100
50%	60	100	0	33	66	100
75%	60	100	0	33	66	100
100%	60	100	0	0	33	100
25%	120	100	0	33	66	100
50%	120	100	0	0	66	100
75%	120	100	0	0	66	100
100%	120	100	0	0	0	100
TOTAL		95	2,75	22	49,58	91.58

Fonte: Dantas, 2021

Nesse ensaio, constatou-se que 33% dos explantes sobreviveram, na proporção de 25% de fungicida Carbendazim®, no tempo de 30 minutos, possibilitando chances para uso desse tratamento. Sendo assim, a adaptação rápida de populações de fungos aos benzimidazóis (Carbendazim) podem ocorrer com redução da sensibilidade ao fungicida, o que demanda a utilização de fungicidas com diferentes mecanismos de ação (KOLLER, 1998).

Figura 9 - Explantes de *Libidibia ferrea* inoculadas em meio MS tratadas com fungicida cabendazim®. - 1 Tubos de ensaio contaminados - 2 Tubos de ensaio com explantes submetidos ao tratamento 25% de fungicida no tempo de 30 minutos– explantes vivos.



Fonte: Dantas, 2021

O uso de hipoclorito de sódio ou de álcool 70%, não foram eficazes e dependendo do tipo produto químico utilizado, as porcentagens de mortes por fungos ou por bactéria, foram bem diferenciadas e o nível de oxidação alto em diferentes produtos. Por isso o tratamento VII, foi preparado usado uma combinação de produtos químicos, fungicida carbendazim® 2%, hipoclorito de sódio 2% e álcool 70% no tempo de 5 minutos para desinfestação de segmentos nodais *Libidibia ferrea* provenientes do viveiro (Tabela 12).

Os tratamentos combinados com fungicida Cabendazim® 2,0%, hipoclorito de sódio 2,0% e álcool 70% obtiveram explantes vivos, devido maior eficiência do Carbendazim® nos tratamentos anteriores utilizou-se então ele neste tratamento, onde obteve-se a maior eficácia para desinfestação de segmentos nodais de *Libidibia ferrea* provenientes de viveiro, 33% de explantes vivos após 30 dias conforme a tabela 10. Essa porcentagem vem concordar com a opinião ressaltada sobre o álcool, que em concentrações de 70% e 80%, além de ação germicida, facilita a ação de outros produtos devido sua ação surfactante (SOUSA et al., 2008).

Tabela 12 - Desinfestação de segmentos nodais de *Libidibia ferrea*, com combinado de produtos químicos, Álcool 70%, hipoclorito de sódio 2%, e Carbendazim@2%, tempo de 5 minutos.

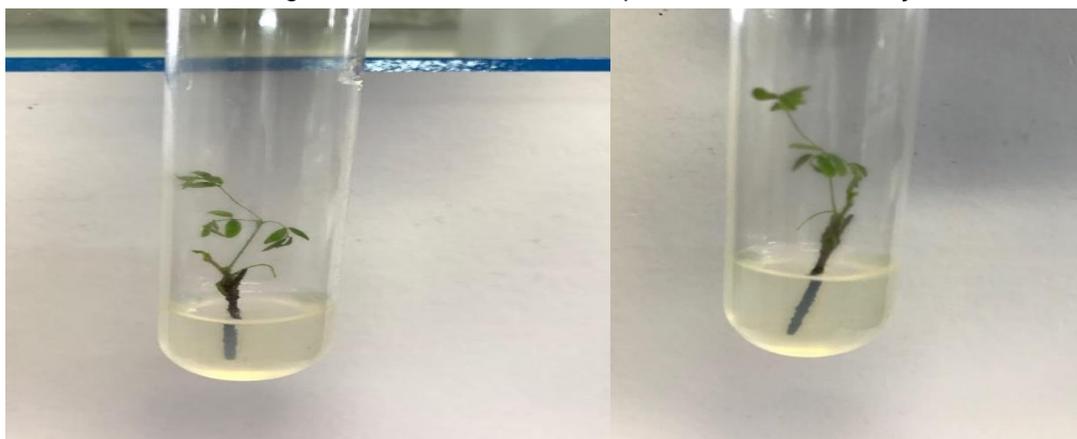
TEMPO = 5 MINUTOS Explantes (N=9)	Composto (álcool 70%,2%carbendazim ,2%hipoclorito)	Total
Explantes mortos (%)	66	66
Explantes vivos (%)	33	33
Contaminação fúngica (%)	33	33
Contaminação bacteriana (%)	22	22
Oxidação (%)	11	11

Fonte: Dantas, 2021

Os resultados desse trabalho reafirmam os dados dos estudos de Esposito-Polesi (2011), que perceberam a dificuldade de obter culturas totalmente assépticas, visto que existe uma comunidade endofítica onipresente nas culturas e que na sua grande maioria desempenha papel fundamental no estabelecimento, desenvolvimento e aclimatização dos cultivos *in vitro*.

No meio de cultura o desenvolvimento das plantas pode ser afetado pela competição de nutrientes e vitaminas por fungos e bactérias que normalmente competem com as plantas, podendo levá-las, inclusive a morte (SCHERWINSKI-PEREIRA, 2010).

Figura 10 – Explantes de *Libidibia ferrea* inoculadas em meio MS tratamentos combinados hipoclorito 2%, fungicida 2% e álcool 70% – Explantes sem contaminação



Fonte: DANTAS, 2021

Sobre o alto índice de contaminação e a falta de enraizamento explantes mortos de *L. ferrea* observado nesse trabalho Kozai e Kubota (2005) afirmam que espécies arbóreas respondem com baixas taxas de sobrevivência e enraizamento a

tratamentos *in vitro*. Sendo assim, espécies vegetais, especialmente as lenhosas enraízam com dificuldade mesmo na presença de hormônios de crescimento.

Sobre esses organismos encontrados nas maiorias das plantas, os principais são fungos e bactérias que vivem nas partes internas das plantas, habitando partes aéreas ou radiculares sem ocasionar dano aparente a seus hospedeiros, assim, se diferenciam dos microrganismos fitopatogênicos que causam doenças às plantas. Azevedo (1998).

BARBOZA, *et al*, (p. 1058, 2007) afirma que em tratamento com hipoclorito em pinhão manso (*Jatropha curcas L.*) nenhum dos métodos utilizados no experimento com hipoclorito foi eficiente para eliminar os contaminantes externos dos explantes segmentos da base foliar e segmentos internodais que apresentavam-se, respectivamente, 80 e 100% contaminados.

Contudo, vale ressaltar que utilizando de hipoclorito 1%, a porcentagem de segmentos nodais contaminados foi de 42,5% não diferindo significativamente do percentual observado quando se utilizou NaOCl a 2,5% (41,6%). Quando se utilizou NaOCl 1% apenas 40% dos explantes de pinhão manso não apresentavam contaminação. BARBOZA, *et al* (p. 1058, 2007). Concordando com esse trabalho que o percentual não foi muito diferente com a diferenças de porcentagem do produto químico.

A oxidação foi um dos principais problemas enfrentados neste trabalho especificamente em relação ao tempo de exposição maior aos agentes desinfestantes. Esse problema está relacionado no isolamento de explantes de espécies lenhosas, cujos tecidos são mais ricos em compostos fenólicos, precursores da síntese de lignina. Grattapaglia e Machado (1998).

Nesse mesmo pensamento em solucionar esse problema além da desinfestação dos explantes outra estratégia que pode ser utilizada para reduzir a contaminação microbiana é a utilização de meios de cultura mais pobres em macro, micronutrientes e sacarose, para diminuir o alto índice de microrganismos beneficiados pelas condições climáticas da amazônica. Essa metodologia tem sido utilizada com sucesso na descontaminação e no cultivo *in vitro* de espécies nativas lenhosas (CHAGAS *et al.*, 2012).

7 CONCLUSÃO

Ambos os substratos experimentados solo orgânico e solo composto, apresentaram germinação e desenvolvimento de plântulas uniformes de *Libidibia ferrea* em condições *ex vitro*.

O substrato de solo composto apresentou média de germinação de 62%, enquanto o substrato solo orgânico apresentou 44% de germinação.

Os tratamentos com uso dos agentes químicos puros, não atingiram êxito, pois em todos tratamentos verificou-se a contaminações dos explantes, sendo com Hipoclorito 100%, Álcool 100%, Cabrio® Top100%, Carbedazim® 95% dos explantes contaminados. Apenas o tratamento com o fungicida Carbendazim® combinado com NaClO e álcool 70%, mostrou-se competente na assepsia dos explantes de jucá, porém não foi eficiente para proteger o enraizamento de ataques desses patógenos. Sendo assim, os métodos de assepsia utilizados nesse trabalho não foram adequados para estabelecer um protocolo.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO A.A. *et.al.* Quantification of polyphenols and evaluation o antimicrobial, analgesic and antiinflammatory activities of aqueous and acetone–water extracts of *Libidibia ferrea*, *Parapiptadenia rigida* and *Psidium guajava*. **J. Ethnopharmacol.** 156:88-96. 2014.
- AZEVEDO, J. L. **Microbiologia de microorganismos endofíticos.** In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. de (ed.). *Ecologia microbiana.* Jaguariúna/ EMBRAPA-CNPMA, 488 p. 1998.
- BARBOZA, S.B.S.C. *et al.* Avaliação de métodos de assepsia e tipos de explantes para estabelecimento in vitro de pinhão manso (*Jatropha curcas L.*). **Ornamental Horticulture**, v. 13, p.1058, june 2007.
- BEWLEY, J.D.; Black, M. 1994. **Seeds, Physiology of Development and Germination**, 2^o ed. New York: Plenum Press, 445p.
- BHOJWANI, S. S.; DANTU, P. K. Micropropagation. In: Plant Tissue Culture: Na Introductory Text. India: **Springer India**, p. 245–274. 2013.
- BORGES, E. E. L.; RENA, A. B. Germinação de sementes In: AGUIAR, I. B.; PIÑARODRIGUES, F. M. C.; FIGLIOLIA, M. B. (Coord.). **Sementes florestais tropicais.** Brasília: ABRATES, 1993. p. 83 - 135.
- BRASIL. **Formulário de Fitoterápicos Farmacopeia Brasileira.** 1^a ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), 2011.
- CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Revista Ciência e Cultura.** São Paulo. v.55, n.3. Jul/Set, 2003.
- CAMPOS, R.A.S. *et al.* Micropropagação de *Jatropha elliptica* (Pohl) Müll. Arg. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.9, n.3, p.30-6, 2007.
- CAVALCANTE, T. R. M.; NAVES, R. V.; SERAPHIN, J. C.; CARVALHO, G.D. Diferentes ambientes e substratos na formação de mudas de araticum. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.30, n.1, p.235-240, 2008.
- CAVALHEIRO, M. G. *et. al.* Atividades biológicas e enzimáticas do extrato aquoso de sementes de *Caesalpinia ferrea* Mart. Leguminosae. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 19: 586-591. 2009
- CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção.**4. ed. Jaboticabal: FUNEP, 588 p., 2000.
- CARVALHO, J. M. F.; VIDAL, M. S. **Noções de Cultivo de Tecidos Vegetais.** Campo Grande: Embrapa, 42 p. 2003.
- CARVALHO, A.C.P.P. *et.al.* **Glossário de culturas de tecidos d plantas.** Plant Cell Culture and Micropropagation, Lavras, v. 7, n.1, p. 30-60, 2011.

CID, L.P.B. A propagação *in vitro* de plantas. O que é isso? **Rev. Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**. 8p. 2002.

CHAGAS, E. A. *et al.* **Tissue culture techniques for native Amazonian fruit trees**. In: LEVA, A.; RINALDIP, M. R. (Eds.). Recent advances in plant *in vitro* culture. Croatia: InTech Prepress, p. 151-164, 2012.

CUNHA, H.B. & PASCOALOTO, D. **Hidroquímica dos rios da Amazônia**. Centro Cultural dos Povos da Amazônia – CCPA. Manaus. 147p. 2006.

DAMIÃO FILHO, C. F.; MÔRO, F. V. **Morfologia externa de espermatófitas. Jaboticabal**: FUNEP, 2001. 101 p.

DANTAS, S.; OLIVEIRA, S.; CÂMARA, T. Contaminação microbiana no cultivo *in vitro* de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.10, p. 391-407, 2002.

DANTAS, Joelma Medeiros. **Resposta germinativa de sementes de *Libidibia ferrea* Martius submetidas a fatores abióticos**, 2015 - Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação - Universidade Federal Rural do Semi - Árido, Mossoró, 2015.

ESPOSITO-POLESI, N. P. **Revista Brasileira de Biociências**. Porto Alegre, v. 9, n. 4, p. 533-541, out/dez. 2011. (REVISÃO) ISSN 1980-4849/ 1679-2343
FLORIANO, E. P. Germinação e dormência de sementes florestais, **Caderno Didático nº 2**, 1ª ed./ Eduardo P. Floriano Santa Rosa, 2004.

FOWLER, João A. P.; BIANCHETTI, Arnaldo. **Dormência em sementes florestais**. Colombo: EMBRAPA-Florestas, 2000. 27 p.

FREITAS, C. A. B. **Estabelecimento *in vitro* de *Annona crassiflora* e *Annona squamosa* utilizando segmentos nodais**. Dissertação Mestre em Biologia Geral - Universidade Federal da Grande Dourados. Dourados, 2014.

GALDIANO JÚNIOR, Renato Fernandes et al. Crescimento *in vitro* e aclimatização de *Cattleya loddigesii* Lindley (Orchidaceae) com carvão ativado sob dois espectros luminosos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n.5, p. 801-807, 2012.

GALDINO, G.; MESQUITA, M. R.; FERRAZ, I. D. K. Descrição morfológica da plântula e diásporos de *Caesalpinia ferrea* Mart. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 747-749, jul. 2007.

GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture**. 1. ed. Eversley: Exegetics, 709 p. 1984.

GONZALEZ, F. G. 2005. **Estudo farmacognóstico e farmacológico de *Caesalpinia ferrea* Martius**. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo. 137 p.

GOULART, A. C. P.; FIALHO, W. F. B. Incidência e controle de *Fusarium moniliforme* Sheldon em sementes em milho. **Revista Brasileira de Sementes**, 21(1): p. 216-22, 1999.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. 1998. Micropropagação. *In*: Torres, A.C.; Caldas, L.S.; BUSO, J.A. (eds.) **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Vol. I. Embrapa-SPI / Embrapa-CNPQ. Brasília.

HARTMANN, H. T. *et.al.* **Plant Propagation: principles and practices**. 8 ed. New Jersey: Prentice Hall, 915p. 2011.

JUNGHANS, T.G.; SOUZA, S.A. **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. 2 ed. rev. Brasília, DF: Embrapa, 2013.

KERBAUY, G. B. **Clonagem de plantas in vitro: uma realidade**. Biotecnologia. Ciência e Desenvolvimento, v. 1, p. 30–33, 1997.

KERBAUY, G.B. **Fisiologia Vegetal**. 3ª ed. Guanabara Koogan S.A., Guanabara, 430p. 2019.

KOZAI, T.; KUBOTA, C. **Concepts, definitions, ventilation methods, advantages and disadvantages**. *In*: KOZAI, T.; *et al* (Ed.). Photoautotrophic (Sugar-free medium) micropropagation as a new micropropagation and transplant production system. Netherlands: Springer, p. 19-22. 3 cap. 2005.

KOLLER, W. **Chemical approaches to managing plantpathogens**. *In*: RUBERSON, J. R. (Ed.). Handbook of Integrated Pest Management. New York: Dekker, 1998. p. 1-38.

KOORNNEEF, M. *et.al.* Characterization and mapping of a gene controlling shoot regeneration in tomato. **Plant Journal**, v.3, p.131-141, 1993.

LABOURIAU, L.G. A germinação de sementes. Washington: OEA: 1983. p. 174.
LEBOWITZ, F.J. **Plant Biotechnology, a laboratory manual**. 1995.

LIMA, de D.; GARCIA, L. C. Avaliação de métodos para o teste de germinação em sementes de *Acacia mangium* Willd. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 18, n. 2, p. 180-185, 1996

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1992.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Plantarum, 512p, 2002.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2.ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 511p, 2008.

LUCENA, A. M. A.; COSTA, F. X.; SILVA, H.; GUERRA, H. O. C. 2004. Germinação de essências florestais em substratos fertilizados com matéria orgânica. *In*:

CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AGRÍCOLA, 32, 2003, Goiânia, **Resumos...** Goiânia: SBEA, 2003. 1 CD-ROM.

MACHADO, F.A. *Libidibia ferrea*: Jucá. In: CORADIN, L.; CAMILLO, J.; PAREYN, F. G. C. (Ed.). **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro**: região Nordeste. Brasília, DF: MMA, 2018. Cap. 5, p. 542-547 il. color. (Série Biodiversidade, 51).

MAIA, G.N. Caatinga: **árvores e arbustos e suas utilidades**. São Paulo: D&Z Computação Gráfica, Leitura & Arte, 413 p. 2004.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba, SP: FEALQ, 2005. 495.

MILÉO DA SILVA et.al. Assepsia de segmentos nodais de mini-rosa (*Rosa* sp.) para o estabelecimento in vitro. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 7, n. 1, p. 225-230, 5 out. 2019.

MORAIS, T. P. et.al. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Brazilian Journal of Medicinal Plants**, v. 14, n. 1, p. 110–121, 2012.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. **A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures**. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NAKAMURA, E. S. et. al. Cancer chemopreventive effects of constituents of *Libidibia ferrea* and related compounds. **Cancer Letters**, v. 177, n. 2, p. 119–124, 2002.

NASSIF, S.M.L.; Vieira, I.G.; Fernandes, G.D. 1998. Fatores Externos (ambientais) que Influenciam na Germinação de Sementes. **Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais**.

NAUE, C.R.; BENITIZ, L.B.; MEDEIROS, C.V. Eliminação de contaminantes microbianos da cultura de tecidos de *Nicotiana tabacum* L. In: **Congresso iniciação científica**, 16. 2007, Pelotas. Resumos. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, 2007. p.1-5.

NIETSCHE, S. Estabelecimento in vitro de explantes de três cultivares de bananeira. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.3, p.989-991, 2006.

NOZAKI, A.H. et.al. Pauferrol, a novel chalcone trimer with a cyclobutane ring from *Caesalpinia ferrea* Mart exhibiting DNA topoisomerase II inhibition and apoptosis-inducing activity. **Tetrahedron Letters**. v. 48, p. 8290–8292, 2007.

NETO, Raimundo Nonato Onofre. **Efeitos de diferentes substratos na germinação e vigor de semente de mulateiro – *Calycophyllum spruceanum* BENTH. (RUBIACEAE) em casa de vegetação**, 2011. (Monografia). – Curso de Engenharia Florestal. Universidade Federal do Acre. Rio Branco, 2011.

OHIRA, S. *et al.* New chalcone dimers from *Caesalpinia ferrea* Mart act as potent inhibitors of DNA topoisomerase II. **Tetrahedron Letters**, v. 54, p. 5052–5055, 2013.

OLIVEIRA, A.F. *et al.* Avaliação da Atividade cicatrizante fazer Jucá (*Caesalpinia ferrea* Mart. Ex Tul. var. *ferrea*) em Lesões cutâneas de caprinos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Botucatu, v.12 n.3, 2010.

PASQUAL, M.; HOFFMANN, A.; RAMOS, J.D. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicação**. Lavras: UFLA, 1997. 159p.

PEREIRA, G. A. *et al.* Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de explantes de bananeira 'IAC 2001' em diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. **Tecnologia & Ciência Agropecuária João Pessoa**, v. 3, n. 2, p. 43-46, 2009.

PEREIRA, G. A.; CORREA, L. S.; BOLIANI, A. C. Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de explantes de bananeira 'Grande naine' em diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. **Revista Brasileira de Fruticultura Jaboticabal**, Edição Especial, p. 222-226, 2011.

PEREIRA, J.E.S.; FORTES, G.R. de L. Efeito do uso de segmentos basais e apicais na multiplicação *in vitro* da macieira. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL**, 7. 1999, Brasília. Resumos... Brasília, DF: SBFV, 1999. p.90

PEREIRA, A.M.S. (Coord.). **Recursos genéticos e conservação de plantas medicinais do Cerrado**. Ribeirão Preto: Co-Edição: Biota/Reserva Ecocerrado do Brasil, 2007. 356p.

PELCZAR, M. J. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. São Paulo: Makron Books, v. 1, p. 210-224, 1996.

PINHAL, H. F., *et al.* Aplicações da cultura de tecidos vegetais em fruteiras do Cerrado. **Ciência Rural**, Santa Maria 2011.

QUEIROZ, L. P. **Leguminosas da caatinga**. Universidade Estadual de Feira de Santana, 2009.

QUISEN, R.C; ANGELO, P.C. SILVA. **Manual de Procedimentos do Laboratório de Cultura de Tecidos**. Manaus, AM: EMBRAPA- Amazônia Ocidental, 44p, 2008.

RIBEIRO, D., A.*et al.* Promising medicinal plants for bioprospection in a Cerrado area of Chapada do Araripe, Northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, p. 1522–1533, 2014.

RUI, B. R., *et al.* Principais métodos de desinfecção e desinfectantes utilizados na avicultura: revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. Paraná. Número 16, Periódicos Semestral, janeiro de 2011.

SALLES, E. A. P. B. Desinfestação e introdução *in vitro* de segmentos nodais de *Acacia mearnsii*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 37, n. 92, p. 485-491, out./dez. 2017.

SALATI, E.; Santos, A.A.; Lovejoy, T.E.; Klabin, I. 1998. **Por que salvar a floresta Amazônica?** Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 1998, 114p.

SANTANA, JAS. *et.al.* Tecnologias de baixo custo para a superação da dormência em sementes de *Caesalpinia ferrea* var. *Ferrea* Mart. ex. Tul. (pau-ferro). **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v.6, n.1, p. 225-229, 2011

SILVA, Carlos Eduardo Sales da. **Compostos bioativos de duas espécies de *Libidibia ferrea*: caracterização e propriedades biológicas.** 2015. Tese (Doutorado) – Curso de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015.

SILVA, Daniel da. **Micropropagação de *Caesalpinia ferrea* Martius.** 2015 Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia – Escola Superior de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2015.

SILVA, C.S. *et al.* Avaliação do uso da casca do fruto e das folhas de *Caesalpinia ferrea* Martius como suplemento nutricional de Fe, Mn e Zn. **Ciência Tecnologia Alimento.**, Campinas, v. 30, n. 3, p. 751-754, 2010.

SKIRVIN, R. M. *et.al.* **Establishment of contaminant-free perennial plants on vitro.** In vitro cellular & developmental Biology-plant, v. 35, n°4, p. 278-290, 1999.

SOUSA, G. C. *et al.* Contaminação microbiana na propagação in vitro de *Cattleya walkeriana* e *Schomburgkia crispa*. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. S1, p. 405- 407, 2008.

SOUZA M. A S. M.; RAMOS, M. B. P.; VARELA, V. P. Influência da temperatura e do substrato na germinação de sementes de ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia* (Vahl.) Nich) In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 54.; REUNIÃO AMAZÔNICA DE BOTÂNICA, 3., 2003, Belém. **Resumos...** Belém: Universidade da Amazônia, 2003. p.356.

SOUZA, A.S. *et al.* Introdução à cultura de tecidos de plantas. In: SOUZA, A.S.; JUNGHANS, T.G. **Introdução à Micropropagação de Plantas.** Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006.

STEIN, V.C. *et al.* Efeito do genótipo na propagação in vitro de *Plantago* sp. **Revista Verde**, v.4, n.2, p.68-75, 2009.

TERMIGNONI, R.R. **Cultura de Tecidos Vegetais.** Porto Alegre: Editora da UFRGS, 182 p., 2005.

UEDA, H. *et al.* Aldose reductase inhibitors from the fruits of *Caesalpinia ferrea* Mart. **Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 8, n. 5, p. 377–381, 2001.

VIANNA, G.R. *et.al.* Rifampicina na descontaminação bacteriana de explantes de mamoeiro provenientes do campo. **Bragantina**, Campinas, v.56, n.2, p.249-254, 2003.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R.L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. Viçosa: Editora. UFV, 272 p, 2009.

XIMENES, N.C.A. **Purificação e Caracterização da Lectina da Vagem da *Caesalpinia ferrea* (Cf e PL)**: aplicação biológica. Dissertação de Mestrado em Bioquímica Universidade Federal do Pernambuco, Recife. 53p, 2004.

WALTER, L. S.; SANTOS, C. A. dos; OLIVEIRA, L. dos S.; SILVA, E. C. A. da. Influência de tratamentos pré-germinativos e crescimento inicial de plântulas de *Libidibia ferrea*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, [S. l.], v. 38, 2018. DOI: 10.4336/2018.pfb.38e201801684. Disponível em: <https://pfb.cnpf.embrapa.br/pfb/index.php/pfb/article/view/1684>. Acesso em: 18 fev. 2023.

WENDLING, I.; DUTRA, L. F.; GROSSI, F. **Produção de mudas de espécies lenhosas**. Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2006. (Série Documentos, 130).