

Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
Mestrado em Biodiversidade Neotropical

ESTUDOS SOBRE DESENVOLVIMENTO *IN VITRO*, *EX VITRO* E
TOXICIDADE DE *CARAPA GUIANENSIS*

Larisse Lobo de Oliveira

Rio de Janeiro
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE (CCBS)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (PPGBIO)

Estudos sobre desenvolvimento *in vitro*, *ex vitro* e toxicidade de
Carapa guianensis

LARISSE LOBO DE OLIVEIRA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas .

Orientadora: Prof. Dr. Andrea Furtado Macedo
Co-orientadora: Prof. Dr. Claudia Fortes Aiub

Rio de Janeiro - RJ
2014

- O48 Oliveira, Larisse Lobo de.
Estudos sobre desenvolvimento in vitro, ex vitro e toxicidade de *Carapa guianensis* / Larisse Lobo de Oliveira, 2014.
xiv, 107 f. ; 30 cm
- Orientadora: Andrea Furtado Macedo.
Coorientadora: Claudia Fortes Aiub.
Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.
1. Andiroba. 2. Meliaceae. 3. Testes de mutagenicidade. 4. Germinação.
I. Macedo, Andrea Furtado. II. Aiub, Claudia Fortes. III. Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro. Centro de Ciências Biológicas e de Saúde. Curso de Mestrado em Ciências Biológicas. IV. Título.

CDD – 583.77

FOLHA DE APROVACAO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo caminho que me trouxe, pelas pessoas que colocou em minha vida e pelo aprendizado de todos esses anos.

Agradeço à minha mãe, por ser mãe, por ser pai e por sempre me estimular a estudar. Apesar de não entender muito de tudo isso aqui e da distância, torce pelo meu sucesso.

Agradeço à minha orientadora, professora Andrea, que foi mais que uma orientadora acadêmica nesses 5 anos de trabalho, desde os abraços aos puxões de orelha. Não cabe no papel tudo que aprendi em sua companhia.

Agradeço à professora Claudia pela oportunidade de expandir minha pesquisa e colaborar com suas ideias e conhecimento.

Agradeço a equipe da Embrapa Agroindústria de Alimentos, em especial à Dra. Rosemar e ao Dr. Alan por aceitarem colaborar com meu projeto.

Agradeço a todos os professores, técnicos, secretárias e demais funcionários integrantes da Unirio, pelo ensino de qualidade e atenção as nossas necessidades diárias.

Agradeço aos meus colegas integrantes do LIBV e do LABMUT pelo companheirismo em nosso ambiente de trabalho. Em especial: ao professor Israel, por permitir que a etapa de toxicologia fosse realizada em seu laboratório; Ellen, a pessoa mais fofa do mundo, obrigada por estar sempre disposta a me ajudar; Maria Clara, obrigada por dar uma força extra na reta final dos experimentos; Erika, a IC com sua aluna de mestrado (eu), obrigada pela paciência mesmo quando eu errava tudo; Carlos, obrigada por toda orientação e disposição para ajudar mesmo estando ocupado com suas obrigações.

Agradeço ao meu namorado José Gabriel pelo carinho e apoio, mesmo nos piores dias que passei, pelo suporte nas dificuldades, por me puxar pela mão quando fraquejei. Você esteve comigo nos bons momentos e não me abandonou nos momentos ruins. Tia Katia e Seu Fonseca, vocês são como pais para mim, e Joel, meu irmão, obrigada por me fazer sentir tão querida. Agradeço a todos os Abdalla e Fonseca por todo o carinho e gentileza, por me fazerem sentir em casa.

Agradeço à minha amiga Thaís pela amizade verdadeira. Nunca houve um dia sem sorriso ao seu lado. Ainda que fosse um dia triste.

Tia Liege, obrigada pela positividade sempre e por torcer sempre para o melhor. O mundo precisa de mais pessoas como você.

Agradeço a todos os integrantes da família Barbuda, que sempre me acolherem e me fizeram sentir como uma de vocês. Quel, você virou minha amiga do coração em pouco tempo e mesmo com distância. Suas palavras foram fundamentais para me alegrar e refletir (seus doces também).

Agradeço à Beth por me ouvir e me ajudar tanto naqueles meses mais complicados da minha vida. Foi uma batalha diária mas você mostrou que eu tinha minhas próprias armas. Obrigada.

Aos membros da banca examinadora, obrigada por aceitarem o convite, contribuírem com conhecimento e fazerem parte deste momento.

RESUMO

Carapa guianensis, árvore neotropical, possui diversas aplicações econômicas e medicinais, sendo valorizada tanto pelo óleo de sua semente, cuja demanda vem aumentando devido ao potencial cosmético e medicinal, e sua madeira com propriedades físicas semelhantes ao mogno. Não existem atualmente protocolos para produção clonal ou *in vitro* de plântulas de *Carapa* e a manutenção dos recursos genéticos e entendimento de suas necessidades para germinação e desenvolvimento são fundamentais para a conservação e manejo. Além do aspecto ecológico, o óleo da semente é utilizada amplamente sem o conhecimento suficiente de possíveis efeitos tóxicos que possa ter para o usuário. Estudos em laboratório foram realizados para investigar os seguintes pontos: os efeitos de variáveis ambientais (temperatura, substrato e qualidade de luz) na germinação e desenvolvimento do epicótilo da andiroba; os efeitos de reguladores de crescimento no cultivo *in vitro* de explantes foliares e gemas apicais de andiroba; os efeitos citotóxico e mutagênico de três óleos extraídos de forma diferente em cinco cepas de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium e o efeito citotóxico dos mesmos três óleos na linhagem celular CHO-K1. Os resultados obtidos mostram que para a germinação da semente, a zona entre 30 e 40°C é a mais favorável, e que a terra adubada e a água foram substratos mais favoráveis do que a areia. Sementes no escuro germinam em maior porcentagem ao final do experimento e em menor tempo. Comparado a areia e a água, a terra adubada foi o melhor substrato para o desenvolvimento da plântula. *In vitro*, o ácido 2,4-diclorofenolacético estimulou a formação de calos em explantes foliares enquanto BA foi superior ao TDZ no desenvolvimento inicial de brotos nas gemas apicais. Os três óleos não induziram mutação nas cepas de bactérias, mas apresentaram efeito tóxico para a linhagem celular CHO-K1.

Palavras-chaves: andiroba, mutagenicidade, cultura de tecidos, germinação

ABSTRACT

The Neotropical tree *Carapa guianensis* has several economic and medicinal applications, and is valued for both the high-quality oil extracted from its seeds, wick demand is increasing due to its cosmetic and pharmaceutical potential, and its mahogany-like wood. No management plans or protocols have been developed for *in vitro* or clonal production of *Carapa* seedlings and the maintenance of genetic resources, and the understanding of its germination requirements is vital for conservation and management. Besides, seed oil is widely used without sufficient knowledge about possible toxic effects. Laboratory studies were conducted to investigate: the effects of three environmental variables (temperature, substratum and light quality) on the seed germination of *C. guianensis* and epicotyl development; the effects of growth regulators on *in vitro* andiroba foliar explants and apical bud culture; the cytotoxic and mutagenic effects of three different andiroba oil, extracted with different procedures, on five *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains and the cytotoxic effects of this same three oils on CHO-K1 cell lineage. Results showed that for seed germination, a temperature range of 30-40°C was the most favorable, and fertilized soil and water were more favorable than sand. Seeds in the dark germinated in higher percentages and in a shorter time. Compared with sand and water, fertilized soil was the best substrate for epicotyl development. *In vitro*, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid stimulates callus formation on andiroba foliar explants, while BA was superior to TDZ for the initial development of shoots. The three oils did not induced mutagenic effects on the strains, but they presented cytotoxicity both for the *Salmonella* strains and the CHO-K1 cells.

Keywords: andiroba, mutagenicity, tissue culture, germination

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- Fig. 1 Schematic sequence of assays 5
- Fig. 2 Fresh and dry weight of explants from old leaves of *Carapa guianensis* cultured in differently supplemented MS medium or MS0 for 4 weeks. Data represent mean values per treatment, and bars indicate SE of 36 explants/medium. Mean values with * are significantly different based on ANOVA followed by Tukey's test at $P \leq 0.05$ 7
- Fig. 3 Four-week-old old leaf explants of *Carapa guianensis* on medium with different concentrations of 2,4-D. (A) 5 μM ; (B) 15 μM ; (C) 35 μM ; (D) 45 μM 8
- Fig. 4 Fresh and dry weight of *Carapa guianensis* callus obtained in 5 μM of 2,4-D supplemented medium and subcultivated on MS0; 1 or 5 μM of 2,4-D or 0.5, 1 or 5 μM of TDZ supplemented medium. Data represent mean values per treatment, and bars indicate SE of 36 explants/medium. Mean values with the same letter or * are not significantly different based on ANOVA followed by Tukey's test at $P \leq 0.05$ 9
- Fig. 5 Two-month-old callus of *Carapa guianensis*, first obtained in 5 μM of 2,4-D supplemented medium and then subcultivated on 0.5 μM of TDZ supplemented medium. Ruler in cm 10
- Fig. 6 Roots on callus of *Carapa guianensis* subcultivated a second time on MS0 supplemented with 3 g/L of charcoal (red arrow indicates root). 11
- Fig. 7 Fresh and dry weight of *Carapa guianensis* callus obtained in 45 μM of 2,4-D supplemented medium and subcultivated on MS0; 1 or 5 μM of 2,4-D or 0.5, 1 or 5 μM of TDZ supplemented medium. Data represent mean values per treatment, and bars indicate SE from 36 explants/medium. Mean values with the same letter or * are not significantly different based on ANOVA followed by Tukey's test at $P \leq 0.05$ 12
- Fig. 8 In vitro establishment of plantlets of *Carapa guianensis* (A) Apical buds on MS0 medium supplemented with 3 g/L charcoal, (B) Plantlet after 4 weeks of subculture on MS supplemented with 5 μM of BA, (C) Plantlet after 8 weeks on MS supplemented with 5 μM of BA. 13

Capítulo 2

Figure 1. Frequency of germination at different periods of time. Values are the germination results after four different periods of time (days): 1-21 d (open bars); 22-35 d (bars with diagonal lines); 36-49 d (closed bars) and 50-63 d (bars with parallel lines). Germinability (mean $\pm$ standard error) of *Carapa guianensis* Aublet seeds under different continuous light treatments, at $27 \pm 1^\circ\text{C}$ with a 16-h L: 8-h D photoperiod. WL = white light, seeds without tegument; WLt = white light, seeds with tegument; D = dark, seeds without tegument; Dt = dark, seeds with tegument; BL = blue light, seeds without tegument; BLt = blue light, seeds with tegument; RL = red light, seeds without tegument; RLt = red light, seeds with tegument; GL = green light, seeds without tegument; GLt = green light, seeds with tegument. Measurements are means of three replicates, with error bars representing SE of the mean. Mean values with the same letter are not significantly different, based on ANOVA followed by Tukey's test at $P \leq 0.05$). 27

Figure 2. Epicotyl growth (epicotyl heights) with time (four weeks) of *C. guianensis* under different light qualities and in the dark. Significant difference between treatments at $P \leq 0.05$ is denoted by different letters. Values are means ($n = 60$) $\pm$ SE. WL = white light; D = dark; BL = blue light; RL = red light; GL = green light 29

Figure 3. Frequency of germination at different time periods in three different substrates (sand, fertilized soil and water) at three temperatures. Values are the germination results after four different periods of time (days): 1-21 d (bars with crosshatching); 22-35 d (bars with right-diagonal lines); 36-49 (bars with left-diagonal lines) and 50-63 d (bars with horizontal lines). Germinability (mean $\pm$ standard error) of *Carapa guianensis* Aublet seeds at different continuous temperature and substrate treatments, in the dark. Measurements are means of three replicates, with error bars representing SE of the mean. Mean values with the same letter are not significantly different, based on ANOVA followed by Tukey's test at $P \leq 0.05$). 31

Figure 4. Epicotyl growth (epicotyl heights) with time (four weeks) of *C. guianensis* at 20°C on three different substrates. Significant difference between treatments at $P \leq 0.05$ is denoted by different letters. Values are means ($n = 60$) $\pm$ SE. 33

Figure 5. Epicotyl growth (epicotyl heights) with time (four weeks) of <i>C. guianensis</i> at 30°C on three different substrates. Significant difference between treatments at $P \leq 0.05$ is denoted by different letters. Values are means ($n = 60$) $\pm$ SE.	34
Figure 6. Epicotyl growth (epicotyl heights) with time (four weeks) of <i>C. guianensis</i> at 40°C on three different substrates. Significant difference between treatments at $P \leq 0.05$ is denoted by different letters. Values are means ($n = 60$) $\pm$ SE.	35
Figure 7. Spectral distributions of the light sources used (data provided by the Sylvania supplier)	45

Capítulo 3

Figura 1 – Molécula de WST-1 e fenômeno de conversão do cromóforo.	70
Figura 2: Avaliação da atividade antioxidante de 3 óleos de andiroba: óleo da semente prensada (B), óleo da semente autoclavada e prensada (A) e óleo da semente extraído em Soxhlet com éter de petróleo.	74
Figura 3: Conteúdo total de polifenóis em 3 óleos de andiroba: óleo da semente prensada (B), óleo da semente autoclavada e prensada (A) e óleo da semente extraído em Soxhlet com éter de petróleo (S). Não houve diferença significativa entre os resultados utilizando o teste de Tukey (0,05).	75
Figura 4: Linha de tendência pirocatecol.	75
Figura 5: Avaliação da viabilidade celular de CHO-K1 em 3h e 24h de exposição aos 3 óleos de andiroba: óleo da semente prensada (A1), óleo da semente autoclavada e prensada (A2) e óleo da semente extraído em Soxhlet com éter de petróleo (A3).	80

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Table 1. Percentages of seed germination under different light treatments.....	24
Table 2. Germination percentages of <i>Carapa guianensis</i> seeds in three different substrates and three different temperatures. Germination percentage was calculated after 63 d of germination by dividing the total number of germinated seeds by the total number of seeds spread and multiplying by 100. Measurements are means of three replicates, with error given as SE of the mean.	30

Capítulo 3

Tabela 1 – Características genéticas das linhagens de <i>Salmonella enterica</i> sorovar Typhimurium	63
Tabela 2 – Controles Positivos utilizados no Teste de Ames e na checagem de fenótipos	66
Tabela 3 – Taxa de reversão espontânea das cepas utilizadas	67
Tabela 4. Composição em ácidos graxos dos óleos de andiroba	72
Tabela 5. Características do óleo de andiroba	73
Tabela 6: Avaliação da mutagenicidade e citotoxicidade do óleo bruto (B) de semente de andiroba.	76
Tabela 7: Avaliação da mutagenicidade e citotoxicidade do óleo prensado autoclavado (A) de semente de andiroba	77
Tabela 8: Avaliação da mutagenicidade e citotoxicidade do óleo extraído por Soxhlet (S) de semente de andiroba.	78

SUMÁRIO

Capítulo 1 - Introdução	1
1. <i>Carapa guianensis</i> Aublet	1
2. Cultura de tecidos vegetais e estudo do desenvolvimento <i>ex vitro</i> da planta	4
3. Estudo da mutagenicidade e genotoxicidade	5
Capítulo 2 - The effect of growth regulators on two different in vitro-cultured explants of <i>Carapa guianensis</i>	12
1. Resumo	13
2. Introdução	14
3. Material e Métodos	15
4. Resultados	19
5. Discussão	27
6. Referências Bibliográficas	28
Capítulo 3 - The effect of light quality, temperature and substrate on seed germination and epicotyl development of <i>Carapa guianensis</i> , a multi-use Neotropical tree	33
1. Resumo	34
2. Introdução	35
3. Resultados	37
4. Discussão	48
5. Material e Métodos	57
6. Referências Bibliográficas	60
Capítulo 4 - Citotoxicidade e mutagenicidade de três óleos de <i>Carapa guianensis</i>	67
1. Introdução	67
1.1. <i>Carapa guianensis</i> Aublet	67
1.2. Estudo da genotoxicidade e citotoxicidade	69
2. Objetivos	71
3. Material e Métodos	71
3.1. Obtenção das amostras	71
3.2. Perfil de ácidos graxos e características dos óleos	72
3.3. Avaliação da atividade antioxidante	73

3.4.	Quantificação de polifenóis	74
3.5.	Ensaio com modelo procarioto	75
3.5.1.	Linhagens bacterianas	75
3.5.2.	Ensaio de mutação reversa bacteriana (Ensaio de <i>Salmonella</i> / microssoma ou Teste de Ames)	80
3.5.3.	Ensaio de sobrevivência bacteriana	81
3.6.	Ensaio com modelo eucarionte	82
3.6.1.	Linhagem celular CHO-K1	82
3.6.2.	Ensaio de viabilidade celular com WST-1	82
4.	Resultados	84
4.1.	Rendimento, perfil de ácidos graxos e características dos óleos	84
4.2.	Atividade antioxidante	86
4.3.	Quantificação de polifenóis	87
4.4.	Teste de Ames/Sobrevivência	88
4.5.	Mensuração da viabilidade e proliferação celular de CHO-K1	92
5.	Discussão	93
6.	Conclusão	97
7.	Referências Bibliográficas	98
Capítulo 5 – Conclusão		108
Capítulo 6 – Perspectivas		109

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1. *Carapa guianensis* Aublet

Carapa guianensis Aubl. (Meliaceae) é uma árvore neotropical amplamente distribuída pelo norte da América do Sul (Amazônia), América Central e ilhas do Caribe (Cloutier *et al.*, 2007). Esta espécie é encontrada tanto em terra firme onde o solo é mais seco, quanto nas várzeas, que são alagadas sazonalmente na bacia Amazônica (McHargue e Hartshorn, 1983; Fournier, 2003). No Brasil, é popularmente conhecida como “andiroba”, embora haja outros nomes vulgares (Pennington, 1981).

C. guianensis é considerada uma espécie multiuso no cenário brasileiro (Tonini et al., 2008a) e seu principal apelo mercadológico advém do óleo extraído das suas sementes, que é um dos produtos naturais comerciais mais importantes no Brasil e possui demanda internacional, sendo exportado para EUA e Europa (Tonini et al., 2008b). Devido ao seu amplo uso, andiroba faz parte da Lista Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do Ministério da Saúde (Amaral e Fierro, 2013).

O óleo de andiroba é rico em ácidos graxos como o oléico, palmítico, mirístico, linoleico, esteárico e araquidônico (Arenciaba Arrebola et al., 2013). Alguns tetraterpenóides foram detectados nas sementes de *Carapa guianensis*: 6-alfa-acetoxi-epoxiazadiradiona, 7-deacetoxina-7-oxogedunina, gedunina, andirobina, metil angolensatedina, 1,3-di-benceno carbo amino-2-octadecílico acil-glicérido, ácido hexacosanóico 2,3-dihidroxi-glicérido, ácido ursólico, naringenina, escopoletina, 3,4-dihidroxi metilbenzoato, 2,6-dihidroxi metilbenzoato, ácido tetratriacontanóico, ácido triacontanóico, epoxiazadiradiona e 6-alfahidroxigedunina.

Muitos destes limonóides citados anteriormente, que estão presentes em grandes quantidades nas sementes de andiroba, pertencentes as categorias de: gedunina, andirobina, mexicanolídeo e fragmalina,, possuem atividade antifúngica, bactericida, antiviral e amplas propriedades terapêuticas em animais e humanos. O óleo de andiroba também possui componentes como, esteróides, coumarinas e flavonóides (Lavie et al. 1972; Marcelle e Moto, 1975; Henriques e Penido, 2014).

Este óleo possui aplicabilidade para iluminação, preparação de sabão, cosméticos, como repelente de insetos (Freire et al., 2006) e potencial larvicida contra *Aedes aegypti* (Prophiro et al, 2012). Relatos etnofarmacológicos indicam o uso do óleo no tratamento da artrite, resfriado, malária e inflamações, com resultados positivos (Mendonça e Ferraz, 2007) e como possível antitumoral (Moura et al., 2002). Estudos recentes, relacionam os extratos de andiroba á atividade de cicatrização em modelos animais (Nayak *et al*, 2010;. Nayak *et al.*, 2011)

O efeito antioxidante do óleo de andiroba, através de administração oral em ratos, evidenciou sua função protetora para formação de espécies reativas de oxigênio (Arencibia Arrebola, 2013). Na indústria farmacêutica homeopática, onde tem sido comercializado sob a forma de cápsula, o óleo é usado para diabetes e reumatismo (Amaral e Fierro, 2013).

Estudo recente, a respeito de levantamento sobre solicitação de patentes relacionadas ao uso da andiroba constando como componente da fórmula do produto, mostraram que, do número total de pedidos de patente, a grande maioria, 69%, referem-se à preparações para assistência médica, odontológica, ou para fins sanitários. 19% das solicitações inclui uso no combate à pragas, como repelentes e biocidas, bem como relacionada à preservação de alimentos ou do gênero alimentício.

6% referem-se à produção de gorduras, óleos gordos ou ceras de matérias-primas (Amaral e Fierro, 2013).

Estudos recentes investigaram o efeito tóxico da ingestão de doses aguda e subaguda, além de delimitar a dose letal em roedores, mostrando que o óleo de andiroba é um produto mais seguro em comparação com algumas drogas antialérgicas já conhecidas no mercado, como a fexofenadina (Tkachyk, 1999; Penido *et al.*, 2005; Compalati *et al.*, 2011). Apesar desses trabalhos, o óleo da semente da andiroba possui muitas aplicabilidades, o número de dados a respeito de sua toxicidade é insuficiente para fornecer segurança no uso (Henriques e Penido, 2014). Assim sendo, por todos os motivos acima descritos, se faz necessária análise do seu nível de segurança.

Além das aplicabilidades citadas, andiroba possui alta demanda pela indústria de fabricação de móveis e construção civil devido às propriedades físicas e mecânicas de sua madeira (Guariguata *et al.*, 2002).

Em decorrência da ampla gama de aplicações comerciais, a exploração de *C. guianensis* é inevitável e cada vez mais intensificada. Isto ocorre, especialmente, em florestas primárias da Amazônia Central, onde a atividade de coleta de sementes, o principal elemento de multiplicação deste indivíduo, pode levar à redução da população, além do histórico local indicar que o tamanho máximo da madeira extraída tem diminuído com o passar das décadas (Fortini e Zarin, 2011). Os indivíduos de *C. guianensis* possuem altas densidades e distribuições agregada na floresta, que são índices favoráveis para a gestão sustentável das espécies (Klimas *et al.*, 2007). No entanto, estes índices apresentam grandes variações através da Floresta Amazônica, havendo locais com árvores produzindo progressivamente menos sementes (Klimas *et al.*, 2012).

Relatos confirmam que existe uma variabilidade intraespecífica natural de produção de sementes de andiroba/indivíduo (Tonini *et al.*, 2008b). Esta variabilidade não permite garantir safras padronizadas de produção de óleo, dentro da mesma região de coleta, numa mesma estação do ano ou de um ano para o outro. Safras com produção muito baixa de sementes ou de óleo podem resultar em manejo florestal muito pouco atrativo do ponto de vista econômico (McHargue e Hartshorn, 1983; Frankie *et al.*, 1974).

Os seguimentos industriais que utilizam *C. guianensis* como matéria-prima precisam ter uma quantidade constante e de forma abundante de um produto com estimativas de produção confiáveis, padronizado geneticamente e de qualidade, para explorar os benefícios da planta dentro da silvicultura. É necessário também pesquisar uma forma de cultivo eficiente e preciso para obtenção de matéria-prima, sem afetar a população da árvore em seu habitat natural, preservando a espécie.

2. Cultura de tecidos vegetais e estudo do desenvolvimento *ex vitro* da planta

O desenvolvimento de procedimentos apropriados para a regeneração de plantas através de organogênese ou embriogênese somática é um dos principais pré requisitos para a propagação clonal potencial, transformação genética e preservação *in vitro* de germoplasma de plantas lenhosas (Handley, 1995; Park *et al.*, 1998; Minocha e Jain, 2000).

A propagação clonal, em condições assépticas, é uma alternativa para plantas, como algumas espécies medicinais, que apresentam problemas de reprodução e propagação em larga escala, produzindo materiais propagados livres de doenças e acelerando processos convencionais de propagação, além de possibilitar reproduzir indivíduos geneticamente idênticos à planta-matriz (Zhou e Wu, 2006).

Entre as espécies lenhosas tropicais, trabalhos reportando sucesso na embriogênese somática de outras árvores da família Meliaceae já foram divulgados: *Melia azedarach* (Vila *et al.*, 2007), *Azadirachta indica* (Shrikhande *et al.*, 1993; Rout, 2005), *Swietenia macrophylla* (Maruyama and Ishii 1999), e *Cedrela fissilis* (Vila *et al.*, 2009). Trabalhos na área de cultura de tecidos, com andiroba, são extremamente relevantes e inéditos para conservação dos recursos genéticos já existentes, recuperação da flora e produção comercial padronizada da espécie. Vale salientar que *C. guianensis* faz parte da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (DAF/SCTIE/MS, 2009).

Conhecer as melhores condições para germinação e desenvolvimento *ex vitro* da plântula é importante para o uso de mudas na fase de reflorestamento de locais onde há necessidade, além de fornecer informações para aclimatização de mudas obtidas *in vitro*. Estas descobertas podem levar ao fornecimento de material vegetal mais produtivo, com características otimizadas e padronizadas (Alves *et al.*, 2008). Desta maneira, facilita-se a prática de silvicultura, melhorando o mercado para empresas farmacêuticas nacionais dedicadas à produção de medicamentos e cosméticos de origem vegetal, aliviando a pressão sob os recursos naturais (Cordell, 2009).

3. Estudo da mutagenicidade e genotoxicidade

A utilização de bactérias para detectar mutações gênicas é, atualmente, uma importante ferramenta para os estudos das etapas do processo de carcinogênese e para detectar compostos genotóxicos, capazes de causar danos à saúde humana e ambiental (Umbuzeiro e Vargas, 2003). Ames e Yamasaki (1971) descreveram um método utilizando mutantes de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium deficientes da síntese de histina para detectar o potencial carcinogênico de compostos químicos.

Este ensaio é uma metodologia rápida, de baixo custo, segura e utilizada atualmente por diversos laboratórios para detectar substâncias mutagênicas. Os testes com organismos procariotos permitem realizar um diagnóstico em curto prazo de como uma amostra atua, caso haja interação com o DNA. No entanto, sabido que a maior parte dos carcinógenos conhecidos depende de metabolização para apresentar seu potencial de interação com o DNA (Claxton, 1997) se faz necessária a utilização de um sistema de metabolização exógena, geralmente, se baseando no uso de frações microsossomais hepáticas de ratos (McCann, 1975) a serem incluídas nos ensaios.

A utilização de modelos bacterianos para a detecção de mutágenos é recomendada pelo *guideline* 471, de 17 de julho de 1997, da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (*Organization for Economic Co-operation and Development* – OECD, 1997), que é um órgão não governamental responsável pela normatização de diretrizes de desenvolvimento. Consequentemente, as demais agências reguladoras de produtos de sanidade humana e animal no mundo submetem aos testes, os produtos que porventura possam ser comercializados em seu território.

No desenvolvimento de fármacos, uma avaliação completa do potencial genotóxico de determinada substância torna-se necessária para que o seu consumo humano seja viável. O ensaio de mutação reversa bacteriana isoladamente não é suficiente para suprir essa necessidade, visto que utiliza organismos procariotos e não identifica todas as formas de interação com o DNA. Dessa forma, testes genotóxicos *in vitro* e/ou *in vivo* em células de mamífero também são usados, nesse processo de desenvolvimento, para expandir a detecção dos mecanismos genotóxicos relevantes na formação de alterações genéticas (FDA, 2013).

A importância de estudos genotóxicos sobre determinada amostra está na detecção de agentes químicos ou físicos que possuem a capacidade de gerar danos ao DNA de forma direta ou indireta. Através dos testes de genotoxicidade, os processos que levam à lesão do DNA podem ser identificados e indicar o risco que o agente investigado possui. Em caso de resultados positivos, tanto em testes *in vitro* como *in vivo*, os agentes em estudo apresentam substâncias com potenciais atividades mutagênicas e carcinogênicas para a espécie humana (Stankevics, 2008).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, N.D.C., SANTOS, T.C.S., RODRIGUES C.R. Avaliação da adequação técnica de indústrias de medicamentos fitoterápicos e oficinais do Estado do Rio de Janeiro. *Ciência, Saúde Coletiva*, 13: 745- 753, 2008.

AMARAL, L. F. G.; FIERRO, I. M. Profile of medicinal plants utilization through patent documents: the andiroba example. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 23(4):716-719, 2013.

AMES B. N.; YAMASAKI E. The detection of chemical mutagens with enteric bacteria, em *Chemical Mutagens: Principles and Methods for their detection*, Hollander, A, Cap. 9, Ed., New York, Plenum Press. 1971.

ARENCIBIA ARREBOLA, D. F. et al. Potencial genotóxico del extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* Aublet para inducir anomalías en la morfología de la cabeza del espermatozoide. *Revista Internacional de Andrologia*. 11(2): 54-59, 2013.

CLAXTON, L. D. The development, validation and analysis of *Salmonella* mutagenicity the methods for environmental situation em: *Microscale testing in aquatic toxicology: advances, techniques and practice*. 1997.

CLOUTIER, D. et al. Impact of selective logging on inbreeding and gene dispersal in an Amazonian tree population of *Carapa guianensis* Aubl. *Molecular Ecology*. 16:797–809, 2007.

COMPALATI, E. et al. Systematic review on the efficacy of fexofenadine in seasonal allergic rhinitis: a meta-analysis of randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trials. *Int Arch Allergy Immunol*, 156(1): 1-15, 2011.

FDA. Use of International Standard ISSO-10993 “Biological Evaluation of Medical Devices Part 1: Evaluation and Testing”, 2013.

FORTINI, L.B., ZARIN, D.J. Population dynamics and management of Amazon tidal floodplain forests: Links to the past, present and future. *Forest Ecology and Management*. 261(3): 551–561. 2011

FOURNIER, L. A. Species description *Carapa guianensis*. In: VOZZO, J. A., eds. *Tropical Tree Seed Manual. Agricultural Handbook*, 721. USDA Forest Service, Washington DC. 2003.

FREIRE, D. C. B. et al. Efeito dos óleos vegetais de andiroba (*Carapa* sp.) e copaíba (*Copaifera* sp.) sobre forídeo, pragas de colméias, (Diptera: Phoridae) na amazônia central. *Acta Amazônica* 36:365 – 368, 2006.

GUARIGUATA, M.R., ARIAS-LECLAIRE, H., JONES, G. Tree seed fate in a logged and fragmented forest landscape, northeastern Costa Rica. *Biotropica*, 34, 405–415. 2002.

HANDLEY, L. W. Future uses of somatic embryogenesis in woody plantation species. In: Jain, S.; Gupta, P.; Newton, R., eds. *Somatic embryogenesis in woody plants*, vol. I. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers: 415–434. 1995.

HENRIQUES, M.; PENIDO, C. The Therapeutic Properties of *Carapa guianensis*. *Current pharmaceutical design*, 20(6): p. 850-856, 2014.

KLIMAS, C.A., KAINER, K.A., WADT, A.B.L.H.O. Population structure of *Carapa guianensis* in two forest types in the southwestern Brazilian Amazon. *Forest Ecology and Management*, 250:256–265. 2007.

KLIMAS, C.A., KAINER, K.A., DE OLIVEIRA WADT, L.H. The economic value of sustainable seed and timber harvests of multi-use species: An example using *Carapa guianensis*. *Forest Ecology and Management*, 268: 81-91. 2012.

LAVIE, D. et al. The constituents of *Carapa guianensis* Aubl and their biogenetic relationship. *Bioorg. Chem.*, 2: 59–64. 1972.

MARCELLE, B. G.; MOTO, B. S. Tetranortriterpenoids from the heartwood of *Carapa guianensis*. *Phytochemistry*, 14: 2717–2718. 1975.

MARUYAMA, E., ISHII, K. Somatic embryogenesis in big-leaf mahogany (*Swietenia macrophylla* king). In: JAIN, S.M., GUPTA, P.K., Newton, R.J.. eds. *Somatic embryogenesis in woody plants. Forestry sciences*. Kluwer, Dordrecht: 355. 1999.

MCCANN, J. et al. Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test. Assay of 300 chemicals. *Proc. Natl. Acad. Scie.* 72 p. 5135-5139, 1975.

MCHARGUE, L. A.; HARTSHORN, G. S. Seed and seedling ecology of *Carapa guianensis*. *Turrialba* 33:39-404, 1983.

MENDONÇA, A. P.; FERRAZ, I. D. K. Óleo de andiroba: processo tradicional da extração, uso e aspectos sociais no estado do Amazonas, Brasil. *Acta Amazonica* 37:353-364. 2007

- MINOCHA, R., JAIN, S. M. Tissue culture of woody plants and its relevance to molecular biology. In: Jain, S. M.; Minocha, S. C., eds. *Molecular biology of woody plants*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers: 315 – 339. 2000.
- MOURA, M. D. et al. Natural Products Reported as Potential Inhibitors of Uterine Cervical Neoplasia. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 21: 67-74. 2002.
- NAYAK, B. S. et al. Experimental evaluation of ethanolic extract of *Carapa guianensis* L. leaf for its wound healing activity using three wound models. *Evid Based Complement Alternat Med*: 1-6, 2011.
- NAYAK, B. S. et al. Investigation of the wound healing activity of *Carapa guianensis* L. (Meliaceae) bark extract in rats using excision, incision, and dead space wound models. *J Med Food* 13: 1141-1146. 2010.
- OECD. Guideline 471 for testing chemicals by Bacterial Reverse Mutation Test, 1997.
- PARK, Y. S., BARRETT, J. D., BONGA, J. M. Application of somatic embryogenesis in high-value clonal forestry: deployment, genetic control, and stability of cryopreserved clones. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 34: 231–239. 1998
- PENIDO, C. et al. Anti-allergic effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet on allergen-induced vascular permeability and hyperalgesia. *Inflamm Res*. 54(7): 295-303, 2005.
- PENNINGTON, T. D. Meliaceae. *Flora Neotropica*, Monograph No. 28. New York Botanical Garden Pr. Department, New York, 470 pp. 1981.
- PROPHIRO, J. S. et al. Evaluation of time toxicity, residual effect, and growth-inhibiting property of *Carapa guianensis* and *Copaifera* sp. in *Aedes aegypti*. *Parasitol. Res*, 110: 713-719. 2012.

SHRIKHANDE, M., THENGANE, S.R., MASCARENHAS, A.F. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Azadirachta indica* A. Juss In *Vitro, Cell Dev Biol*, 29: 38–42. 1993.

STANKEVICINS, L. et al. Genotoxic and antigenotoxic evaluation of extracts from *Arenosclera brasiliensis*, a Brazilian marine sponge. *Toxicol. In Vitro*. 22, 1869–1877, 2008.

TKACHYK, S. J. New treatments for allergic rhinitis. *Can Fam Physician*. 45: 1255-60, 1999.

TONINI, H. et al. Crescimento de espécies nativas da Amazônia submetidas ao plantio no estado de Roraima. *Ciência Florestal* 18:151-158 2008a

TONINI, H. et al. Estrutura populacional e produção de Castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) e andiroba (*Carapa* sp.) no Sul do Estado de Roraima. In: *Anais/1º. Seminário do Projeto Kamukaia Manejo Sustentável de produtos florestais não-madeireiros na Amazônia – Rio Branco, AC: Embrapa Acre. 182p.*

WADT, L.H.O. Editora. Embrapa Acre. 2008b.

VILA, S.A., REY, H.Y., MROGINSKI, L.A. Factors affecting somatic embryogenesis induction and conversion in “paradise tree” (*Melia azedarach* L.). *J Plant Growth Regul*, 26: 268–277. 2007.

VILA, S.A., GONZÁLEZ, H.R., REY, H.Y., MROGINSKI, L.A. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Cedrela fissilis*. *Biol Plant*, 53: 383–386. 2009.

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

CAPÍTULO 2

The effect of growth regulators on two different *in vitro*-cultured explants of

Carapa guianensis

Larisse Lobo de Oliveira¹, Anaíze Borges Henriques², Andrea Furtado Macedo^{1,3}

¹ Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde - CCBS, IBIO, Departamento de Botânica, Laboratório Integrado de Biologia Vegetal - LIBV

² Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Centro de Ciências e da Saúde, Instituto de Biologia, Departamento de Botânica, Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento Vegetal – UFRJ

³ Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde - CCBS, Centro de Inovação em Espectrometria de Massas do Laboratório de Bioquímica de Proteínas – IMasS-LBP.

Corresponding author: Andrea Furtado Macedo. Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro. Laboratório Integrado de Biologia Vegetal, CCBS, IBIO, Departamento de Botânica, Avenida Pasteur 458, 5o. andar, sala 512, Urca - Rio de Janeiro, RJ, Brazil. - CEP: 22.290.240 – E-mail: andrea_fm22@yahoo.com.br, Phone: +55 21 2530-2551

Centro de Inovação em Espectrometria de Massas do Laboratório de Bioquímica de Proteínas (IMasS-LBP). Av. Pasteur, 296 - Térreo. CEP 22.290-240. www.unirio.br/lbp. Phone: 55 21 2542 5204, Fax +55 21 2542 5280, Mobile +55 21 991985671

ABSTRACT: *Carapa guianensis* Aubl. (Meliaceae), known locally as andiroba, is a multi-use species from Amazonia. Andiroba oil is considered an important natural product in the Brazilian market, and international demand is increasing due to its cosmetic and pharmaceutical potential. *C. guianensis* trees produce seed irregularly over different harvest periods, leading to inconsistent oil production and difficulties with supply. No management plans or protocols have been developed for *in vitro* or clonal production of *Carapa* seedlings and the maintenance of genetic resources. This study had two objectives: 1) to assess the effects of growth regulators on *in vitro* andiroba foliar explants, and 2) to determine the response of apical buds to *in vitro* culture. Explants consisting of leaf segments 1 cm on a side were cultivated in MS medium with and without growth regulators. Evaluation was based on fresh and dry weight of the explants after 20 days. In the media with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, we observed changes in weight and in explant appearance (callus). Bud breakage and development of shoots was achieved using 5 μ M of 6-benzylaminopurine. Overall, the results showed that 2,4-dichlorophenoxyacetic acid stimulates callus formation on andiroba foliar explants, while 6-benzylaminopurine was superior to thidiazuron for the initial development of shoots.

Keywords: growth regulators; *Carapa guianensis*; *in vitro*; tissue culture; organogenesis

1 **Introduction**

2 *Carapa guianensis* Aubl. (Melicaceae), commonly known as andiroba, is a
3 neotropical tree distributed throughout South and Central America, as well as the
4 Caribbean Islands (Cloutier et al. 2007). It is a multi-use species, the main product
5 being seed oil used for medicinal purposes due to its significant limonoid content
6 (Mendonça and Ferraz 2007, Henriques and Penido 2014). The bio-oils obtained from
7 *C. guianensis* seed have physical and chemical properties that make them acceptable
8 renewable diesel fuels (Iha et al. 2014). Andiroba oil is used as an insect repellent
9 (Freire et al. 2006) and in the manufacture of cosmetics, due to its high level of
10 unsaturated triacylglycerols (TAG) (Cabral et al. 2014). Additionally, its wood is valued
11 for the construction of buildings and furniture (Guariguata et al. 2002), and cultivated
12 andiroba trees have the potential to recover degraded land.

13 The exploitation of *C. guianensis* is inevitable and is intensifying, mainly in
14 central Amazonia where seed extraction leads to population reduction, as seed dispersal
15 is the main reproductive mode. Evidence indicates that the size of felled logs has been
16 decreasing for decades (Fortini and Zarin 2011).

17 Andiroba trees produce seed irregularly over different harvest periods (Tonini et
18 al. 2008). This variability, which does not allow continuous oil production, generates
19 management difficulties, resulting in periods with low seed and oil production (Frankie
20 et al. 1974, McHargue and Hartshorn 1983). Industries that use *C. guianensis* need a
21 constant source of homogeneous raw plant material.

22 Plant regeneration by tissue culture, through either organogenesis or somatic
23 embryogenesis, is a prerequisite for potential clone propagation, genetic transformation
24 and *in vitro* preservation for germplasm from timber trees, including andiroba (Handley

1995, Park et al. 1998, Minocha and Jain 2000). Clone propagation in aseptic conditions is an alternative method of propagation for some medicinal plant species with large-scale production issues, accelerating the conventional propagation process and producing genetically identical plants (Zhou and Wu 2006).

This study evaluated the effects of growth regulators on *C. guianensis* foliar explants and apical buds, with a view toward shoot induction and providing guidelines for optimizing andiroba cultivation.

Materials and Methods

Plant material

Seeds of *Carapa guianensis* Aublet (andiroba) were collected in the city of Rio de Janeiro (Jardim Botânico do Rio de Janeiro) beneath identified parent trees, with previous authorization from the institution. Seeds, weighing around 20-30 g were washed, soaked in water for 24 h, placed in 200-mL plastic bottles with equal volumes of sterile soil fertilized with plant humus, and watered twice a week. Three kinds of explants were used: a) young leaf explants (less than 1 week old), when they were pink-colored; b) old leaf explants, when each leaf was at most 2 weeks old and green; and c) shoot apical buds. The younger leaves for explants were simply cut into three parts (apex, middle and base). Leaf fragments 1 cm² were obtained from the older green leaves. Apical buds were collected from the same seedlings when the apical segment was still green and soft.

Surface sterilization of explants

The surfaces of the explants from young and old leaves were sterilized with a 50% (v/v) commercial bleach solution for 1.5 min and then washed three times for 1

min each in sterile distilled water. Surface-sterilized explants were placed with their adaxial or abaxial surfaces firmly in contact with the medium in culture flasks.

The apical bud explants were surface-sterilized with a 50% (v/v) commercial bleach solution, for 2 min, followed by a quick dip in 70% (v/v) ethanol solution, and then washed 3 times with sterile distilled water. The exposed ends of the explant were trimmed aseptically and then inoculated on the medium.

Tissue Culture

To assay the effectiveness of growth regulators (GR), surface-sterilized leaf explants were inoculated on sterile MS medium (Murashige and Skoog 1962). The medium was supplemented with 30 g/L sucrose, 7 g/L agar and vitamins, with or without growth regulators (MS0) (Macedo et al. 1999).

To determine if foliar explants would respond to medium supplemented with one GR at a time, the following GRs were used: indoleacetic acid (IAA) (1, 5, 15, 35 or 45 μ M), 6-benzylaminopurine (BA) (1, 5, 15, 35 or 45 μ M), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) (1, 5, 15, 35 or 45 μ M), and thidiazuron (TDZ) (0.5, 1 or 5 μ M) (Fig. 1).

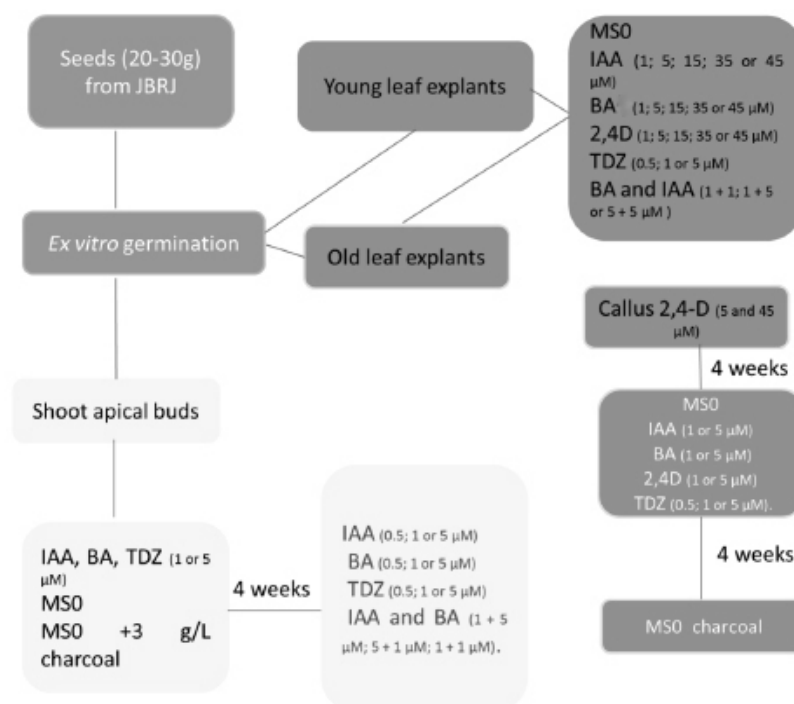


Fig. 1 Schematic sequence of assays

Combinations of BA and IAA (1 + 1; 1 + 5 or 5 + 5 μM) were also tested. The plant material was observed for 2 months. For each treatment, 12 explants were used, and the experiments were repeated three times. The explants were placed on the medium with either the abaxial or the adaxial surface turned up. In order to determine if callus obtained from foliar explants would undergo indirect organogenesis, callus explants were subcultivated on control, IAA, BA and TDZ media. Then, calli developed on the lowest and the highest (5 and 45 μM) 2,4-D medium concentrations were subcultivated (Fig. 1). Explants cultured for 4 weeks in 2,4-D supplemented medium with callus formation were transferred to fresh MS0 medium or to medium supplemented with IAA (1 or 5 μM), BA (1 or 5 μM), 2,4-D (1 or 5 μM) or TDZ (0.5, 1 or 5 μM). Explants alive after 4 weeks were subcultivated on MS0 supplemented with 3 g/L charcoal (Fig. 1.).

For bud growth experiments, the explants were inoculated in MS medium with IAA, BA, TDZ (1 or 5 μM) or no GR, and with or without 3 g/L charcoal (Fig. 1). After 4 weeks the bud explants were transferred to MS medium supplemented with cytokinins and auxins, in an attempt to achieve organogenesis: IAA (0.5, 1 or 5 μM), BA (0.5, 1 or 5 μM), TDZ (0.5, 1 or 5 μM) and combinations of IAA and BA (1 + 5 μM ; 5 + 1 μM ; 1 + 1 μM) (Fig. 1).

All experiments were performed in a climate-controlled room equipped with white fluorescent lamps (Osram F20T12/CW) (approximately 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ photosynthetically active radiation, PAR). For all treatments, a 16-h photoperiod was used. Cultures were maintained at 25 ± 1 °C.

Assessment of leaf explant development

After the culture periods detailed above, the effect of each treatment was evaluated by dry and fresh explant mass. For dry weight, the leaf explants were individually oven-dried in aluminum vessels at 40 °C to constant mass and then weighed. To measure fresh weight, the material was removed from the culture flasks and immediately weighed to prevent dehydration.

Assessment of apical bud explant development

After the culture period, the height of explants and leaf length were measured weekly with a ruler. Fresh weight was determined immediately after each explant was removed from the culture flask after 8 weeks of culture; the dry weight was determined after the explant was oven-dried at 40 °C to constant mass.

Statistics

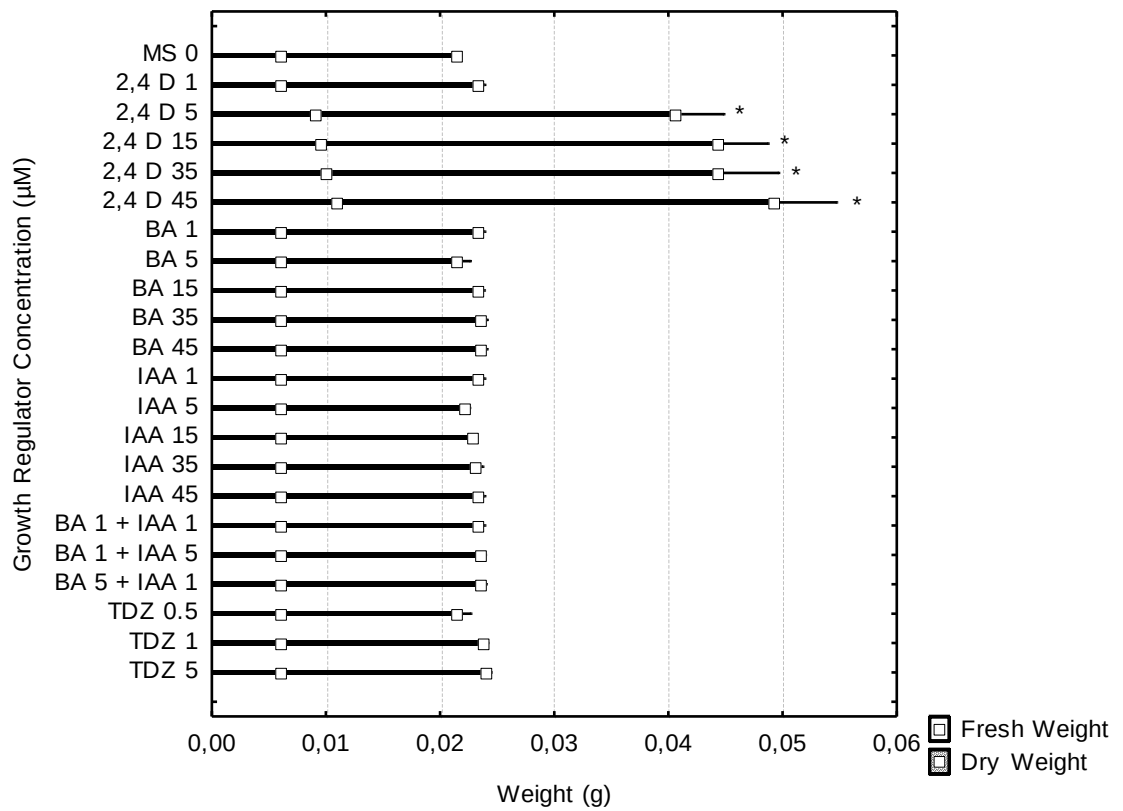
The results were analyzed by Analysis of Variance (ANOVA), followed by Tukey's test with a significance level set at $\alpha = 0.05$, using Statistica 7 software for Windows. Means $\pm$ standard error (SE) are presented.

Results

A method for organogenesis, either direct or indirect, was investigated, with a view to producing *in vitro* shoots as an alternative to sexual propagation for *Carapa guianensis*. Sexual propagation is limited by the tendency of andiroba seeds to lose their power of germination soon after harvest, as a result of dehydration..

Old leaf explants

No callus formation was observed from old leaf-tissue explants cultured in media supplemented with IAA, BA, TDZ or IAA-BA combinations (Fig. 2). However, friable whitish callus was formed in all explants cultured in 2,4-D media, except the medium supplemented with 1 μ M 2,4-D (Figs. 2 and 3). After 4 weeks of observation, a significant difference, according to Tukey's test, in explant fresh and dry weight was observed when comparing explants cultured in 2,4-D supplemented medium with others cultured in MS0 or with IAA, BA, TDZ or IAA-BA supplemented medium (Fig. 2). No difference was observed between the orientations of explants (abaxial or adaxial surface turned up).



118

119 **Fig. 2** Fresh and dry weight of explants from old leaves of *Carapa guianensis* cultured
 120 in differently supplemented MS medium or MS0 for 4 weeks. Data represent mean
 121 values per treatment, and bars indicate SE from 36 explants/medium. Mean values with
 122 * are not significantly different based on ANOVA followed by Tukey's test at $P \leq 0.05$

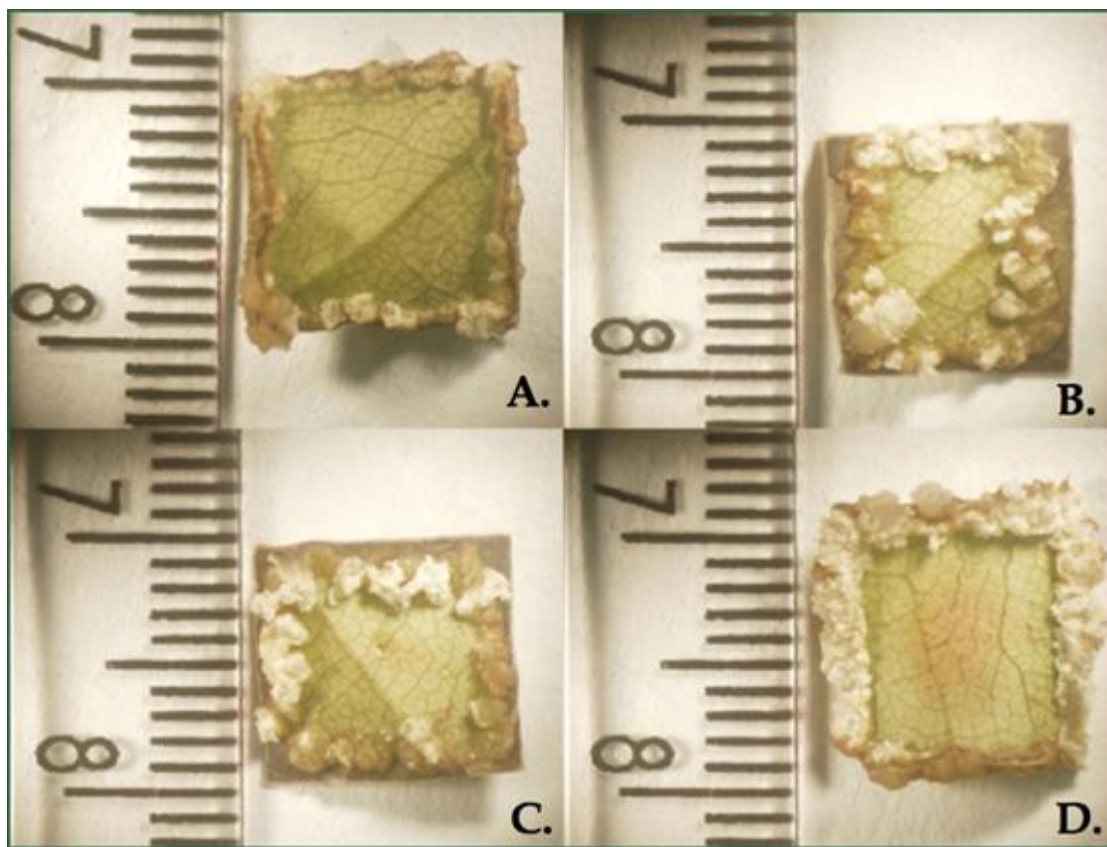
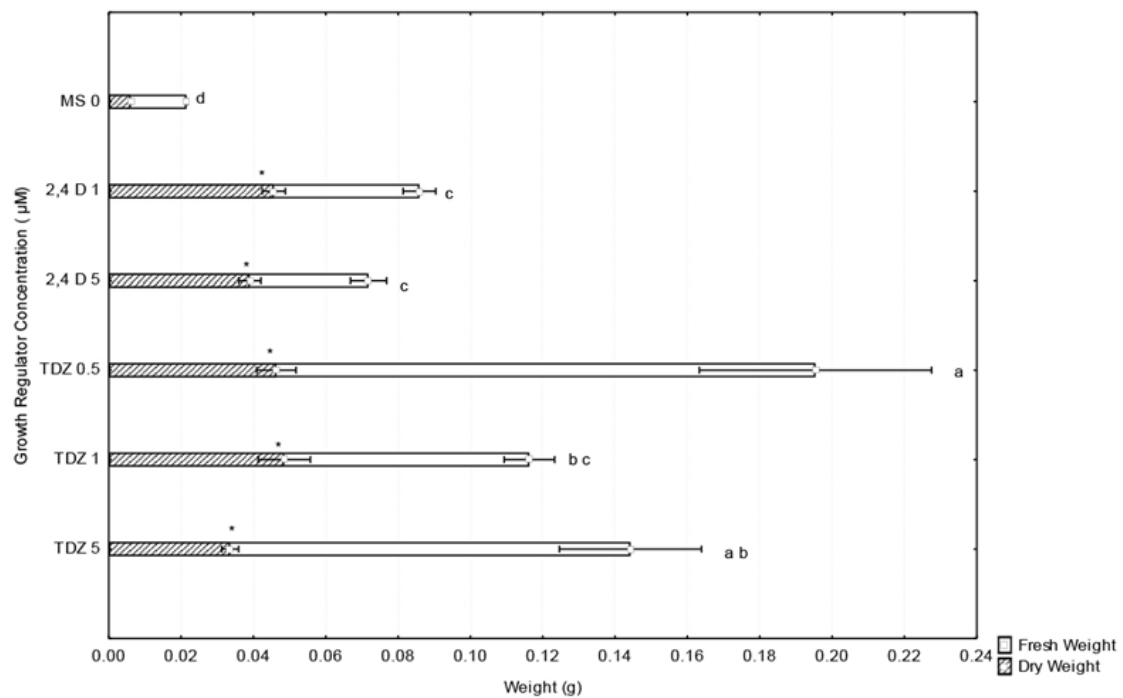


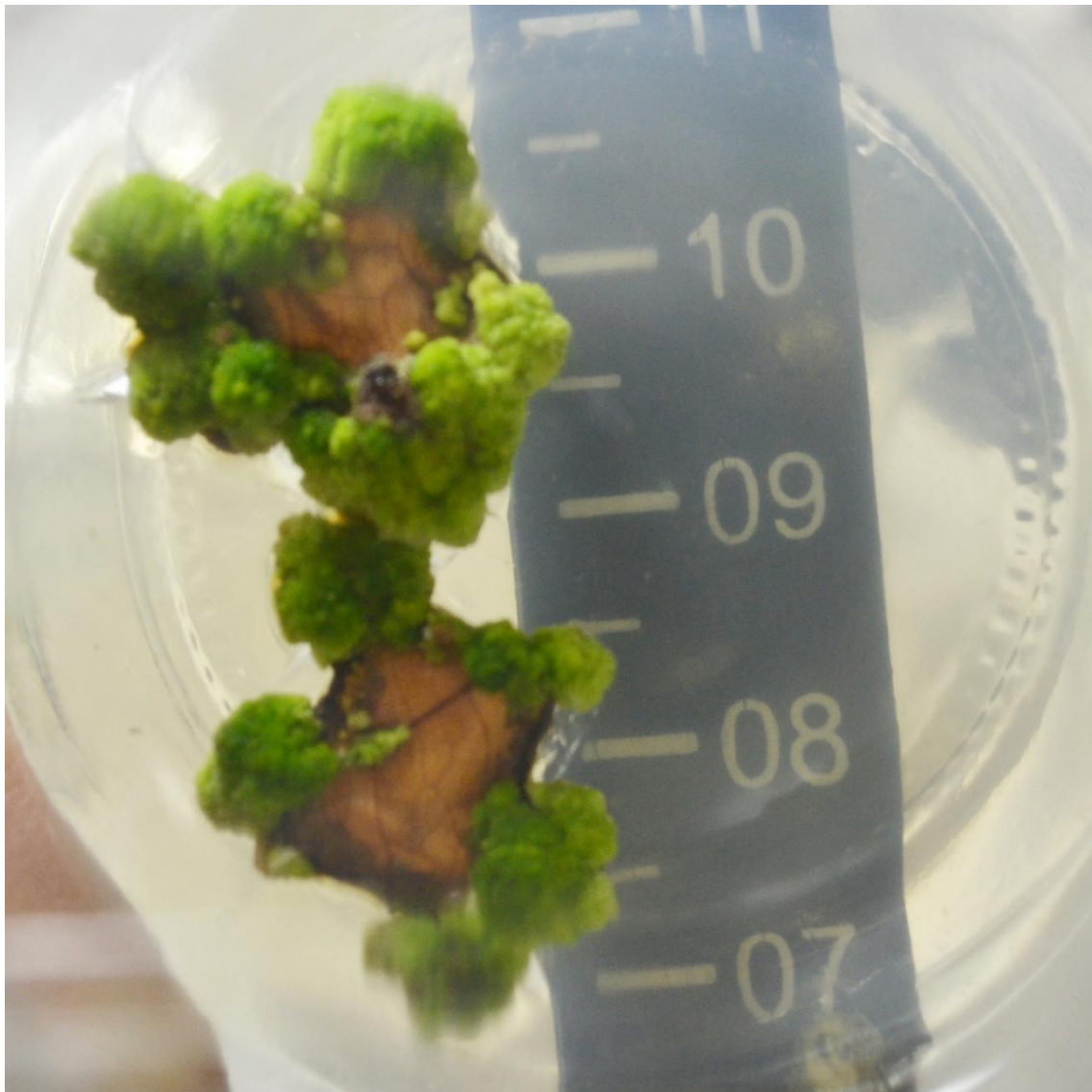
Fig. 3 Four-week-old old leaf explants of *Carapa guianensis* on medium with different concentrations of 2,4-D. (A) 5 μ M; (B) 15 μ M; (C) 35 μ M; (D) 45 μ M

After calluses were obtained on 2,4-D supplemented medium, the effects of different subculture medium conditions on callus development were investigated (Fig. 1). Therefore, calluses obtained from old leaf explants, after 4 weeks of culture in 2,4-D medium (5 or 45 μ M of 2,4-D), were transferred to fresh medium. Calluses obtained with 5 μ M of 2,4-D and then transferred to medium with 1 or 5 μ M of 2,4-D or 0.5, 1 or 5 μ M of TDZ survived and showed increase in callus mass (Figs. 4 and 5.). These calli acquired a brighter green color (Fig. 5). The calli that were subcultivated on MS0 or MS supplemented with IAA or BA did not survive after 4 weeks. These explants turned brown and became dry. Calli subcultivated on 2,4-D and TDZ that showed no or very

136 few signs of brown parts after 4 weeks were transferred to MS0 supplemented with 3
 137 g/L of charcoal (Fig. 1). Only a few calli (30%) that came from 1 μ M 2,4-D produced
 138 very small thin roots after 4 weeks (Fig. 6). The calli that came from TDZ in all
 139 concentrations merely maintained their green color.



140
 141 **Fig. 4** Fresh and dry weight of *Carapa guianensis* callus obtained in 5 μ M of 2,4-D
 142 supplemented medium and subcultivated on MS0; 1 or 5 μ M of 2,4-D or 0.5, 1 or 5 μ M
 143 of TDZ supplemented medium. Data represent mean values per treatment, and bars
 144 indicate SE of 36 explants/medium. Mean values with the same letter or * are not
 145 significantly different based on ANOVA followed by Tukey's test at $P \leq 0.05$.



146
147 **Fig. 5** Two-month-old callus of *Carapa guianensis* first obtained in 5 μ M of 2,4-D-
148 supplemented medium and then subcultivated on 0.5 μ M of TDZ-supplemented
149 medium. Ruler in cm.

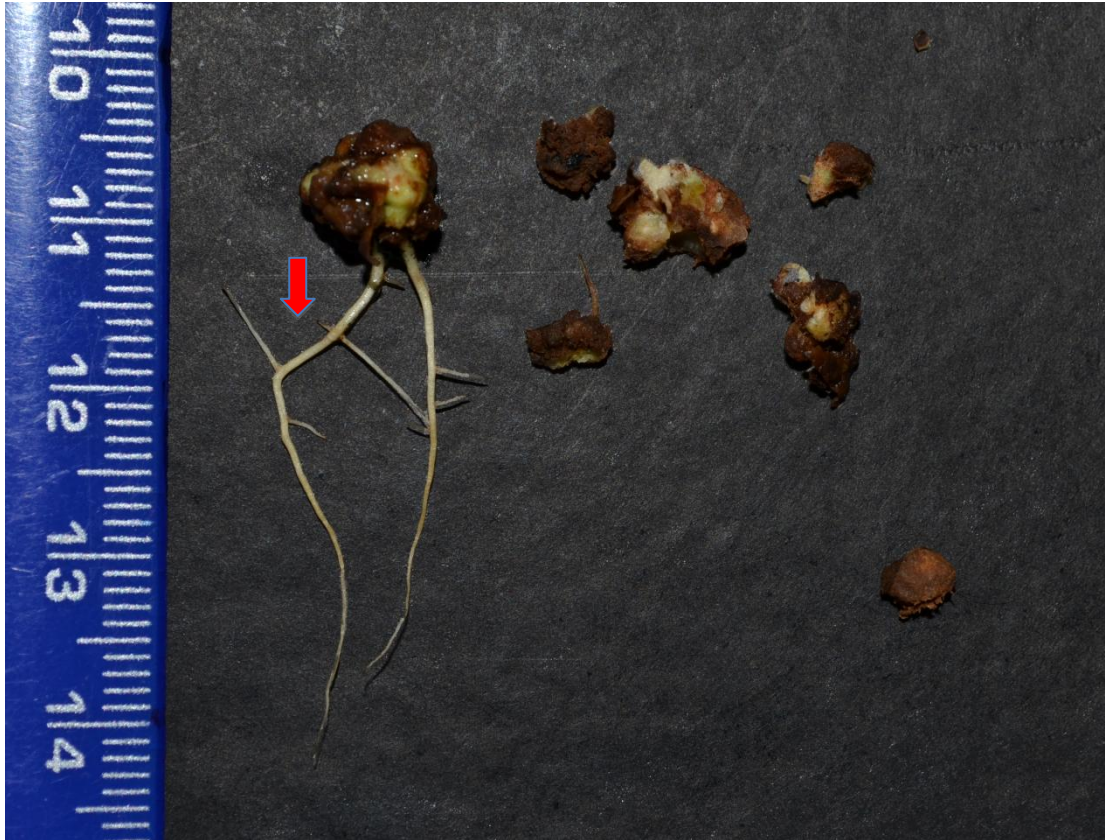


Fig. 6 Roots on callus of *Carapa guianensis* subcultivated a second time on MS0 supplemented with 3 g/L of charcoal (red arrow indicates root).

Callus obtained with 45 μ M of 2,4-D and then transferred to medium with 1 or 5 μ M of 2,4-D or 0.5, 1 or 5 μ M of TDZ also showed increases in callus mass (Fig. 7). The calli that were transferred to MS0 or MS supplemented with IAA or BA did not survive after 4 weeks. These explants turned brown and became dry, as above. Rhizogenesis was not observed in any calli that were first subjected to 2,4-D 45 μ M supplemented medium and then transferred to MS0 supplemented with charcoal, as observed with the callus from 2,4-D. They merely maintained the green callus mass.

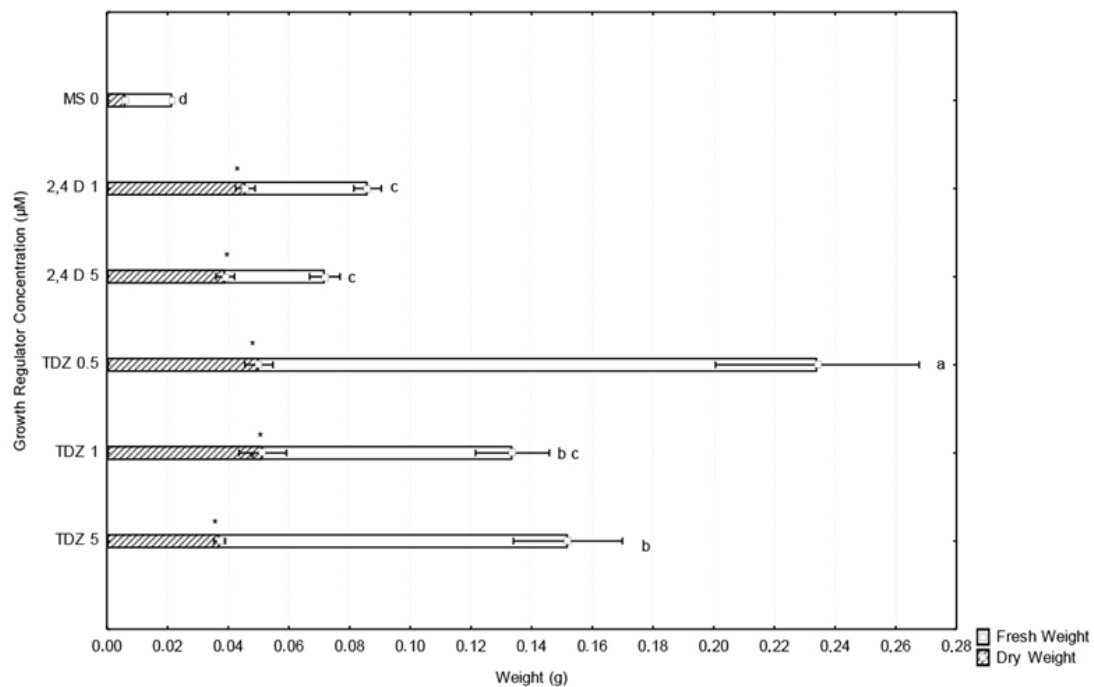


Fig. 7 Fresh and dry weight of *Carapa guianensis* callus obtained in 45 μ M of 2,4-D supplemented medium and subcultivated on MS0; 1 or 5 μ M of 2,4-D or 0.5, 1 or 5 μ M of TDZ supplemented medium. Data represent mean values per treatment, and bars indicate SE from 36 explants/medium. Mean values with the same letter or * are not significantly different based on ANOVA followed by Tukey's test at $P \leq 0.05$.

Young leaf explants

Young, pink-colored leaf explants were tested to compare to the results obtained using old leaf explants, and to determine if they would respond to GR better than older leaves from the same plants (Fig. 1). However, these explants did not survive more than 4 weeks on any culture medium. After the first week of incubation in all media, explants turned from pink, to a pale yellow to green, and then to brown. There was no difference in response among the three parts of the leaf (apex, middle and base).

Apical shoot bud explants

Apical bud explants were cultured in MS0 and with cytokinins and auxins to check their development (Fig. 1). Bud breakage was 100% successful only in MS0 supplemented with charcoal, but shoots did not grow longer than 1 cm. A mean of 3 to 4 small shoots were obtained per bud explant (Fig. 8). On the other media, no bud explant development was observed.

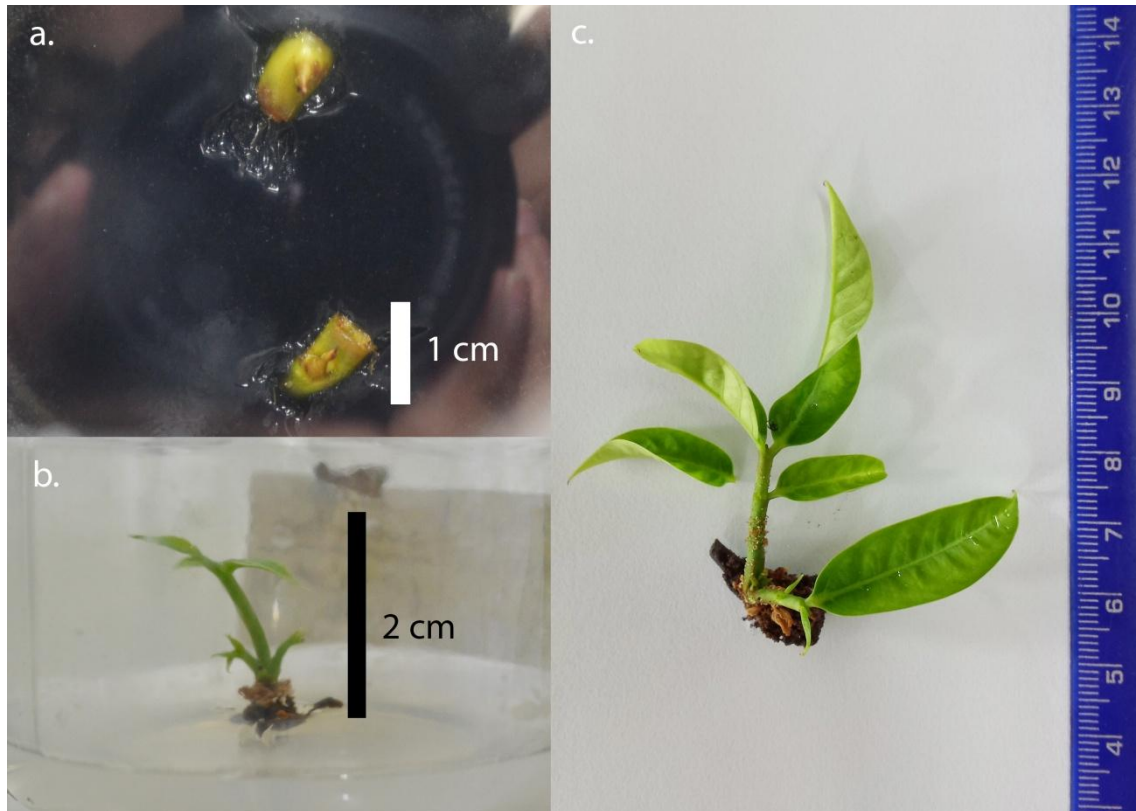


Fig. 8 In vitro establishment of plantlets of *Carapa guianensis* (a) Apical buds on MS0 medium supplemented with 3 g/L charcoal, (b) Plantlet after 4 weeks of subculture on MS supplemented with 5 μ M of BA, (c) Plantlet after 8 weeks on MS supplemented with 5 μ M of BA.

Shoots developed only on BA supplemented medium (Fig. 8), after the initial growth on MS0. On the other GR supplemented media, the explants did not develop and the shoots maintained the size that they had reached on the first medium (MS0). No

signs of rooting were observed. When the medium was not supplemented with 3 g/L of charcoal, all the explants turned brown and died. The plantlets reached 2.55 ± 0.36 cm in height (mean $\pm$ standard error) at the end of 2 months. The leaves reached 3.66 ± 0.38 cm in length (mean $\pm$ standard error).

Discussion

The present results for callus culture contrast with those obtained by Da Costa Nunes et al. (2002) and Rocha and Quoirin (2004). Using a cotyledonary node culture, Da Costa Nunes et al. (2002) found that callus formation in *Cedrela fissilis* Vell., a woody species of Meliaceae, occurred with the growth regulators naphthalene acetic acid (NAA) and BA. These authors obtained the largest increase of fresh weight in treatments with combinations of 6-BA at 1.25, 2.5 and 5.0 μ M with 2.5, 1.25–5.0 or 5.0 μ M of NAA, respectively. Rocha and Quoirin (2004) observed callus formation in mahogany (*Swietenia macrophylla* King), using BA. However, Vila et al. (2009) reported that 2,4-D induces callus formation in *C. fissilis* and somatic embryos were formed after 6 months, reducing the concentration of GR in the medium. In this present study, although the entire plant did not regenerate, there was a morphogenic response with the appearance of roots. In general, the absence or reduction of plant growth regulators led to the development and differentiation of somatic embryos or their conversion into plantlets (Merkle 1995, Hu et al. 2008, Kumar et al. 2008, Yang et al. 2008).

In the present study, *C. guianensis* leaf explants developed *in vitro* in different 2,4-D concentrations and showed callus formation. In agreement with our results, Vila et al. (2007) noted that callus mass in zygotic embryo cultures of *Melia azedarach* L.

(Meliaceae) was induced by high concentrations of 2,4-D and Picloran. To differentiate embryos from calli originating from hypocotyls or immature cotyledons in *Azadirachta indica* A. juss. (Su et al. 1997), it was necessary to use medium supplemented with IAA. Thus, it is evident that callus production in different woody species of Meliaceae is induced by different growth regulators, in varied concentrations. Furthermore, the type of auxins and cytokinins used in the culture media was shown to strongly influence callus formation.

Cytokinins, principally BA, have been reported to be a positive influence to break dormancy from buds and increase its development, as seen on Husain and Anis (2009), where MS medium with 5 μ M of BA was the best condition for multiple shoots growth and the increase of length. BA is naturally present in plant tissues, plus its stability in comparison to other cytokinins (Letham and Palni 1983), may be an explanation for the better response from explants using BA.

In conclusion, although the induction of callus in *Carapa guianensis* has been achieved and bud breakage was inducted, further research is required to confirm the efficiency of embryogenic tissue or bud induction. However, the protocol described here may be suitable for clonal propagation and genetic transformation of *C. guianensis*.

Acknowledgements

The authors are indebted to the Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO) and to the Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro.

References

Afshari RT, Angoshtari R, Kalantari S (2011) Effects of light and different plant growth

238 regulators on induction of callus growth in rapeseed (*Brassica napus* L.)
 239 genotypes. Plant OMICS 4:60-67.
 240 Ahmed ABA, Rao AS, Rao MV (2010) In vitro callus and in vitro leaf extract of
 241 *Gymnema sylvestre* stimulate β -cells regeneration and anti-diabetic activity in
 242 Wistar rats. Phytomedicine 17:1033-1039.
 243 Cabral EC, da Cruz GF, Simas RC, Sanvido GB, Gonçalves LDV, Leal RV, Eberlin
 244 MN (2013) Typification and quality control of the Andiroba (*Carapa guianensis*)
 245 oil via mass spectrometry fingerprinting. Anal Methods 5(6):1385-1391.
 246 Cloutier D, Kanashiro M, Ciampi AY (2007) Impact of selective logging on inbreeding
 247 and gene dispersal in an Amazonian tree population of *Carapa guianensis* Aubl.
 248 Mol Ecol 16:797–809.
 249 Da Costa Nunes E, Volkmer de Castilho C, Moreno FN, Viana AM (2002) *In vitro*
 250 culture of *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae). Plant Cell Tiss Org Cult 70:259-
 251 268.
 252 Fortini LB, Zarin DJ (2011) Population dynamics and management of Amazon tidal
 253 floodplain forests: Links to the past, present and future. Forest Ecol Manag
 254 261:551-561.
 255 Frankie GW, Baker HG, Opler PA (1974) Comparative phenological studies of trees in
 256 tropical wet and dry forest in the lowlands Costa Rica. J Ecol 62:881-919.
 257 Freire DCB, Brito-Filha CRC, Carvalho-Zilse GA (2006) Efeito dos óleos vegetais de
 258 andiroba (*Carapa* sp.) e Copaíba (*Copaifera* sp.) sobre forídeo, pragas de
 259 colméias, (Diptera: Phoridae) na Amazônia Central. Acta Amaz 36:365-368.
 260 Guariguata MR, Arias-LeClaire H, Jones G (2002) Tree seed fate in a logged and
 261 fragmented forest landscape, northeastern Costa Rica. Biotropica 34:405–415.

262 Handley LW (1995) Future uses of somatic embryogenesis in woody plantation species.
 263 In: Jain S, Gupta P, Newton R (ed) Somatic embryogenesis in woody plants, vol.
 264 1. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 415-434
 265 Henriques MG and Penido C (2014) The Therapeutic Properties of *Carapa*
 266 *guianensis*. Current Pharmaceutical Design 20(6):850-856.
 267 Hu Z, Hu Y, Gao HH, Guan XQ, Zhuang DH (2008) Callus production, somatic
 268 embryogenesis and plant regeneration of *Lycium barbarum* root explants. Biol
 269 Plant 52:93-96.
 270 Husain MK, Anis M (2009) Rapid in vitro multiplication of *Melia azedarach* L. (a
 271 multipurpose woody tree). Acta Physiol Plant 31:765-772.
 272 Iha OK, Alves FC, Suarez PA, Silva CR, Meneghetti MR, Meneghetti SM (2014)
 273 Potential application of *Terminalia catappa* L. and *Carapa guianensis* oils for
 274 biofuel production: Physical-chemical properties of neat vegetable oils, their
 275 methyl-esters and bio-oils (hydrocarbons). Ind Crop Prod 52:95-98.
 276 Kumar JV, Kumari BDR, Castaño E (2008) Cyclic somatic embryogenesis and efficient
 277 plant regeneration from callus of safflower. Biol Plant 52:429-436.
 278 Letham DS, Palni LMS (1983) The biosynthesis and metabolism of cytokinins. Annu
 279 Rev Plant Physiol 34:163–197. doi:10.1146/ annurev.pp.34.060183.001115
 280 Macedo AF, Barbosa NC, Esquibel MA, Cechinel Filho V (1999) Pharmacological and
 281 phytochemical studies of callus culture extracts from *Alternanthera brasiliana*. Die
 282 Pharmazie (Berlin) 54(10):776-777.
 283 McHargue LA, Hartshorn GS (1983) Seed and seedling ecology of *Carapa guianensis*.
 284 Turrialba 33:39-404.
 285 Mendonça AP, Ferraz IDK (2007) Óleo de andiroba: processo tradicional da extração,

286 uso e aspectos sociais no estado do Amazonas, Brasil. Acta Amaz 37:353-364.

287 Merkle SA (1995) Strategies for dealing with limitations of somatic embryogenesis in
288 hardwood trees. Plant Tissue Cult Biotechnol 1:112-121.

289 Minocha R, Jain SM (2000) Tissue culture of woody plants and its relevance to
290 molecular biology. In: Jain SM, Minocha SC (ed) Molecular biology of woody
291 plants, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 315-339

292 Murashige T, Skoog F (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays
293 with Tobacco Tissue Cultures. Physiol Plant 15:473-497.

294 Nagarajan SM, Rajasekaran S, Kandasamy S, Jeyachandran R (2006) In vitro studies
295 on *Swietenia mahagoni* (L.) Jacq. Asian J Microbiol Biotechnol Environ Sci
296 8:473-474.

297 Okere AU, Adegey A (2011) In vitro propagation of an endangered medicinal timber
298 species *Khaya grandifoliola* C. Dc. Afr J Biotechnol 10(17):3335-3339.

299 Park YS, Barrett JD, Bonga JM (1998) Application of somatic embryogenesis in high-
300 value clonal forestry: deployment, genetic control, and stability of cryopreserved
301 clones. In Vitro Cell Dev Biol - Plant 34:231-239.

302 Rocha SC, Quoirin M (2004) Calogênese e rizogênese em explantes de mogno
303 (*Swietenia macrophylla* King) cultivados *in vitro*. Scientia Florestalis 14:91-101.

304 Seibert M, Wetherbee PJ, Job DD (1975) The effects of light intensity and spectral
305 quality on growth and shoot initiation in tobacco callus. Plant Physiol 56:130-139.

306 Su WW, Hwang WI, Kim SY, Sagawa Y (1997) Induction of somatic embryogenesis in
307 *Azadirachta indica*. Plant Cell Tissue Org Cult 50:91-95.

308 Tonini H, Kaminski PE, Costa P, Schwengber LAM (2008) Estrutura populacional e
309 produção de Castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) e andiroba (*Carapa*

310 sp.) no Sul do Estado de Roraima. In: Wadt LHO (ed) Anais/1º. Seminário do
 311 Projeto Kamukaia Manejo Sustentável de produtos florestais não-madeireiros na
 312 Amazônia, Embrapa Acre, Rio Branco, AC, pp 182
 313 Torres AC, Caldas LS, Buso JA (1998) Cultura de tecidos e transformação genética de
 314 plantas, 2nd ed. Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, Brasília
 315 Vila SA, González HR, Rey HY, Mroginiski LA (2009) Somatic embryogenesis and
 316 plant regeneration in *Cedrela fissilis*. Biol Plant 53:383-386.
 317 Vila SA, Rey HY, Mroginiski LA (2007) Factors affecting somatic embryogenesis
 318 induction and conversion in “paradise tree” (*Melia azedarach* L.). J Plant Growth
 319 Regul 26:268-277.
 320 Vila S, Scocchi A, Mroginiski L (2002) Plant regeneration from shoot apical meristems
 321 of *Melia azedarach* L. (Meliaceae). Acta Physiol Plant 24:195–199.
 322 Yadav K, Narrender S (2012) Rapid plant regeneration from nodal explants of
 323 *Spilanthes acmella* (L.) Murr. An endangered medicinal plant. Analele
 324 Universității din Oradea, Fascicula de Biologie (1):35-39.
 325 Yang XM, An LZ, Xiong YC, Zhang JP, Li Y, Xu SJ (2008) Somatic embryogenesis
 326 from immature zygotic embryos and monitoring the genetic fidelity of regenerated
 327 plants in grapevine. Biol Plant 52:209-214.
 328 Zhou LG, Wu JY (2006) Development and application of medicinal plant tissue cultures
 329 for production of drugs and herbal medicinals in China. Nat Prod Rep 23:789-810.
 330

CAPÍTULO 3

Light quality, temperature and substrate effects on *Carapa guianensis* seed (shortened title)

Research paper

The effect of light quality, temperature and substrate on seed germination and epicotyl development of *Carapa guianensis*, a multi-use Neotropical tree

Larisse Lobo de Oliveira¹, Andrea Furtado Macedo^{1,2}

¹ Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde - CCBS, IBIO, Departamento de Botânica, Laboratório Integrado de Biologia Vegetal – LIBV

² Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde - CCBS, Centro de Inovação em Espectrometria de Massas do Laboratório de Bioquímica de Proteínas – IMasS-LBP, UNIRIO

Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO; Rio de Janeiro - RJ – Brazil.

Avenida Pasteur 458, 5o. andar, sala 512, Urca - Rio de Janeiro, RJ, Brazil. - CEP:

22.290.240 – Phone: 55 21 2542 5204, Fax +55 21 2542 5280, Mobile +55 21 991985671; E-

mail: andreaafm22@yahoo.com.br; andrea.macedo@unirio.br

Abstract

The Neotropical tree *Carapa guianensis* has several economic and medicinal applications, and is valued for both the high-quality oil extracted from its seeds and its mahogany-like wood. Recruitment and expansion of *Carapa guianensis* depend mainly on sexual reproduction. This makes the understanding of its germination requirements vital for conservation and management. We conducted laboratory studies to investigate the effects of three environmental variables (temperature, substratum and light quality) on the seed germination of *C. guianensis*. Our results showed that for seed germination, a temperature range of 30-40°C was the most favorable, and fertilized soil and water were more favorable than sand. Seeds in the dark germinated in higher percentages and in a shorter time. Removal of the seed coat accelerated the germination process for all conditions tested, except for green and red light and dark. Green and blue light retarded, and red light stimulated seed germination. Plants under green light always grew taller than in the other treatments. Plants grown under blue light and in the dark showed the same profile after four weeks. Compared with sand and water, fertilized soil was the best substrate for epicotyl development. We suggest that measurement of light quality can be used to estimate the structural impact of forest exploitation, providing information for a functional explanation of anthropogenic effects on tropical-forest diversity. Also, plant development is directly associated with soil and temperature in the Amazon region.

Key words: Neotropical species; germination; spectral light; temperature; substrate.

Introduction

Carapa guianensis Aublet (Meliaceae) is native to northern Brazil (Ferraz et al., 2002), with an Amazonian center of origin and subsequent diversification and migration to the Pacific coast of South and Central America (Klimas et al., 2011; Scotti-Saintagne et al., 2013). In Brazil, this tree is known as andiroba or mahogany (Fournier, 2003). *C. guianensis* is a sub-canopy and canopy, shade-tolerant tree inhabiting seasonally flooded forests (Ferraz, 2002; Lopez and Kursar, 2003).

Andiroba has several economic and medicinal applications, and is valued for both the high-quality oil extracted from its seeds and its mahogany-like wood (Dayanandan et al., 1999; Amaral and Fierro, 2013). Andiroba trees were intensively harvested during the industrial-scale logging boom in the Amazon, from the 1950s until the 1990s (Fortini and Zarin, 2011).

The oil from seeds of *C. guianensis* has many uses, from illumination and soap production to a makeup base, insect repellent (Prophiro et al., 2012) and arthritis treatment (Ferraz et al., 2002; Das Graças Henriques and Penido, 2014). Andiroba-seed oil is one of the most important natural products exported from Brazil (Tonini et al., 2008). This economic potential has prompted the Brazilian government to target *C. guianensis* as one of its priority species for sustainable development (Ministry of the Environment et al., 2009), and to include it in the National List of Medicinal Plants of Interest to the Ministry of Health (Amaral and Fierro, 2013).

Due to the wide range of commercial applications, the exploitation of *C. guianensis* is inevitable and will intensify, especially in the old-growth forests of central Amazonia,

with the likelihood of reducing the species' population and, in many cases, of degradation of the logged area. *C. guianensis* occurs naturally in high densities with a clumped distribution, which favors sustainable management (Klimas et al., 2007; Schwartz et al., 2014), except for the wide variations in its population throughout the Amazon (Plowden, 2004; Klimas et al., 2012). Klimas et al. (2012) showed that combined management of andiroba wood and seed is viable only in occasionally flooded areas, where a collection rate of 10% of the annual seed production is compatible with exploitation of 100% of individuals with $DBH \geq 50$ (≈ 2 trees.ha⁻¹) and a cutting cycle twice in a century. Despite this potential for multiple use, sustainable management of andiroba is not yet a reality. Seed collection and andiroba oil extraction in natural forests have been conducted by local communities with no analysis of population structure (Guarino et al., 2014). Population recruitment and expansion of *C. guianensis* depends solely on sexual reproduction. This makes the understanding of its germination requirements vital for conservation and management. In the Amazon Forest, *C. guianensis* germination can occur in water, during the flood season and in nearby rivers, or in flood-free sites (terra firme) (McHargue and Hartshorn, 1983; Scarano et al., 2003).

Germination and survival of seedlings are important parameters in forest regeneration and in forestation programs. However, seed germination is a complex process controlled both by the internal properties of seeds and by an array of environmental factors including light quality, soil moisture, temperature, and soil chemistry (Tiansawat and Dalling, 2013). Temperature is an important trigger for seed germination, and most freshwater species require light to achieve high germination rates (Xiao et al., 2010). Substrate

type is also an important factor influencing seed germination and growth of aquatic plants (Jarvis and Moore, 2008).

This study examined the influence of light quality, darkness, substrate, flotation and temperature on the germination of seeds and on the epicotyl growth. The analyses extended knowledge of ecological and physiological aspects of *C. guianensis*.

Results

Light-quality and dark effects

Light is an important environmental signal triggering germination or promoting dormancy, depending on the species. For *C. guianensis*, the absence of light promoted germination, compared to the other light treatments, in terms of both the number of germinated seeds and the speed of germination (Table 1). Of all the seeds sown in the dark, over half, 52.5% germinated, and of those that germinated, 62.5% had germinated by day 21 (Table 1). All other treatments resulted in significantly lower and slower germination rates (Table 1).

Table 1. Percentages of seed germination under different light treatments. Seeds with or without a tegument were matured in growth chambers under continuous different light-quality treatments and in the dark, a constant temperature of 27 ± 1 °C and a 16-h photoperiod. Germination was scored as protrusion of the radicle. Germination percentage was calculated after 21 or 63 d of germination, by dividing the total

number of germinated seeds by the total number of seeds spread and multiplying by

100. Measurements are means of three replicates, with error given as SE of the mean.

Light Treatments	% total seed germination to day 63	% total seed germination to day 21, including only germinated seeds	% total seed with tegument, germination to day 63, including only germinated seeds	% total seed without tegument, germination to day 63, including only germinated seeds
White light	38.3 ± 1.7 [†] c	39.3 ± 2.7 c ^{††}	37.5 ± 2.3d ^{††}	66.50 ± 1.0a
Dark	52.5 ± 1.4 a	62.5 ± 1.7 a	57.5 ± 0.9 a	42.5 ± 0.8c
Blue light	38.4 ± 1.6 c	25.1 ± 1.1 d	50 ± 2.5c	50 ± 7.5b
Red light	46.7 ± 1.3 b	31.2 ± 2.2 c	55 ± 1.0b	45 ± 0.5c
Green light	35.0 ± 2.5 c	47.8 ± 2.5 b	52.9 ± 0.8 bc	47.1 ± 1.2c

[†] Mean ± standard error for three groups of 20 explants each.

^{††}Mean values with the same letter are not significantly different, based on ANOVA followed by Tukey's test at $P \leq 0.05$.

Of the spectrum bands tested, green and blue light inhibited and red light stimulated germination of the andiroba seeds, compared to white light (Table 1). Of the 60 seeds sown under red light, 46.7% germinated by the end of the experiment. However, under blue and green light, only about 38% of the seeds germinated by day 60 (Table 1). The results with blue and green lights were statistically similar to the control (WL). However, seeds under green light showed a significantly faster germination rate (47.8% by day 21) than seeds under blue and red lights (Table 1).

More seeds with a tegument, as opposed to those without it, germinated in the dark, under red light or under green light. The opposite was observed for white light, where 66.5% of the seeds without a tegument germinated, and only 37.5% of those with a tegument did so (Table 1). Under blue light, the presence or lack of a tegument did not affect the germination rate, which was 50% in both cases (Table 1).

For the majority of the treatments, the seeds without a tegument germinated faster (Fig. 1). Under blue or red light or in the dark, most seeds without a tegument germinated by the 35th day of cultivation. Seeds with a tegument were still germinating up to the 63rd day, especially for blue light and in the dark (Fig. 1). However, the results for white and green light showed that these spectral bands had different effects than the other treatments. The seeds with a tegument germinated faster under GL, and seeds under WL germinated at the same rate with or without a tegument (Fig. 1).

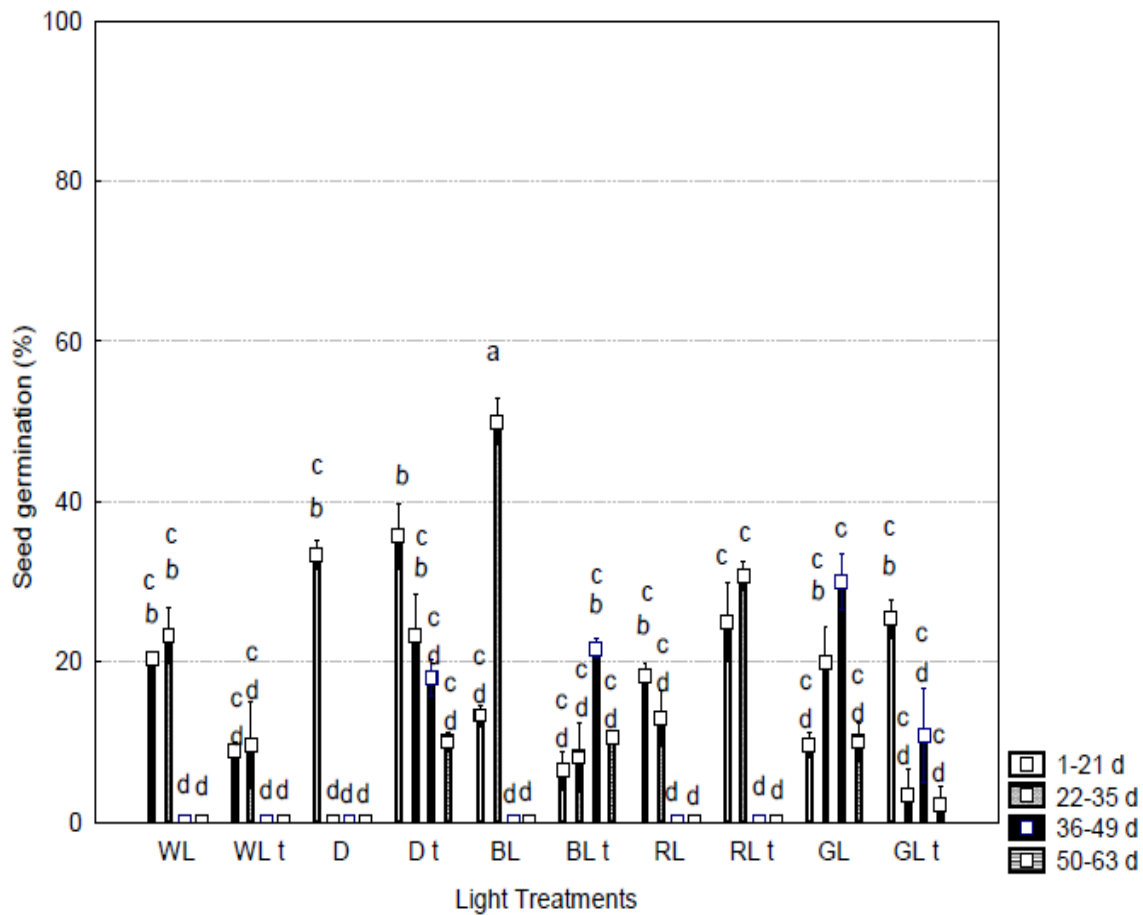


Figure 1. Frequency of germination at different periods of time. Values are the germination results after four different periods of time (days): 1-21 d (open bars); 22-35 d (bars with diagonal lines); 36-49 d (closed bars) and 50-63 d (bars with parallel lines). Germinability (mean $\pm$ standard error) of *Carapa guianensis* Aublet seeds under different continuous light treatments, at $27 \pm 1^\circ\text{C}$ with a 16-h L: 8-h D photoperiod. WL = white light, seeds without tegument; WLt = white light, seeds with tegument; D = dark, seeds without tegument; Dt = dark, seeds with tegument; BL = blue light, seeds without tegument; BLt = blue light, seeds with tegument; RL = red light, seeds without tegument; RLt = red light, seeds with tegument; GL = green light, seeds without tegument; GLt = green light, seeds with

tegument. Measurements are means of three replicates, with error bars representing SE of the mean. Mean values with the same letter are not significantly different, based on ANOVA followed by Tukey's test at $P \leq 0.05$).

After germination, epicotyl growth was measured weekly for four weeks. All spectral bands stimulated growth after 30 days, because all the results exceeded the response under the positive control, white light (Fig. 2). During the four weeks, the epicotyls of plants grown under green light were always taller than in the other treatments (Fig. 2). However, at 30 days of epicotyl development, green and red light induced statistically similar results, with a mean height of around 33 cm (Fig. 2). Plants grown under red light showed accelerated growth, exceeding those grown under white and blue light after two weeks and in the dark after three weeks (Fig. 2). Plants grown under blue light and in the dark showed the same profile during four weeks, and the growth rate stabilized in the fourth week (Fig. 2). Under white light, epicotyls grew faster in the first two weeks, and slowed during the second and third weeks. After the third week, plants under white light resumed their previous growth rate (Fig. 2).

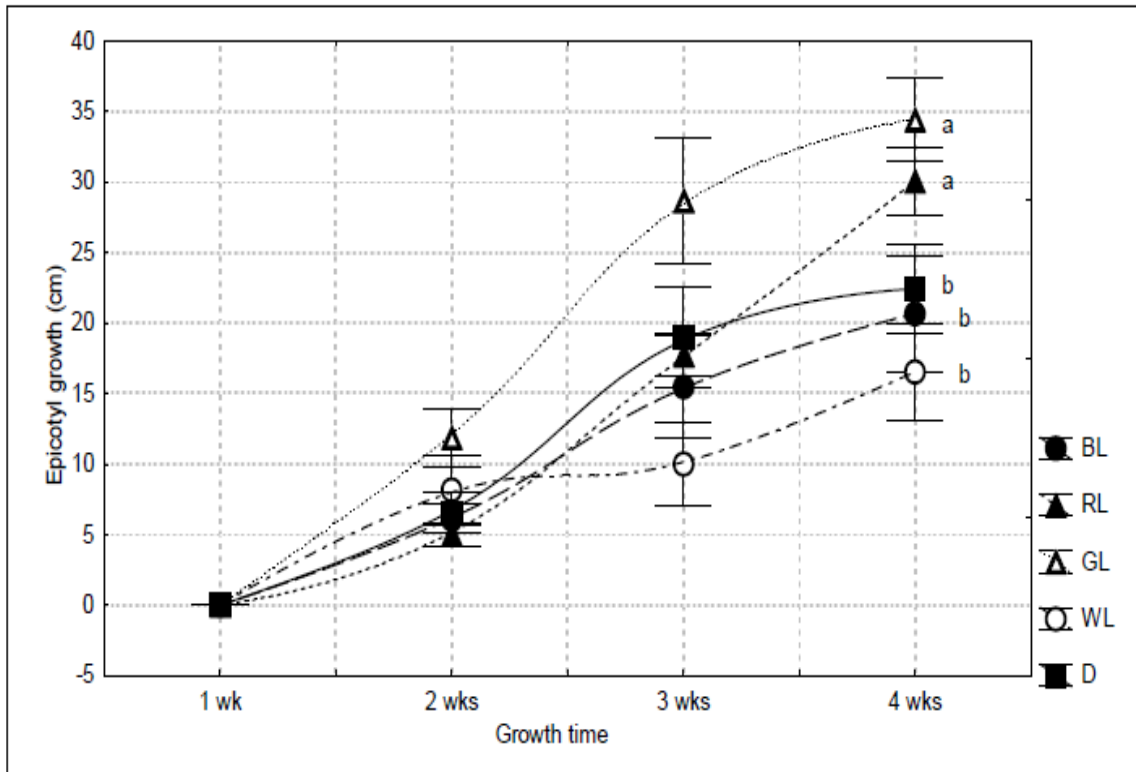


Figure 2. Epicotyl growth (epicotyl heights) with time (four weeks) of *C. guianensis* under different light qualities and in the dark. Significant difference between treatments at $P \leq 0.05$ is denoted by different letters. Values are means ($n = 60$) $\pm$ SE WL = white light; D = dark; BL = blue light; RL = red light; GL = green light.

Temperature and substratum effects

Temperature had a significant effect on seed germination of *C. guianensis* (Table 2). Temperatures of 30 and 40°C produced the highest germination percentages, mainly in the fertilized-soil and water treatments (Table 2). In contrast, seed germination percentage was significantly lower at 20°C in all substrates assayed (Table 2). The substratum also had a significant effect on seed germination (Table 2). The germination percentages in water and

fertilized soil were significantly higher than in sand, under all temperatures, except at 20°C (Table 2). At the same time, there were no significant differences between sand and water at 30 and 40°C.

Table 2. Germination percentages of *Carapa guianensis* seeds in three different substrates and three different temperatures. Germination percentage was calculated after 63 d by dividing the total number of germinated seeds by the total number of seeds spread and multiplying by 100. Measurements are means of three replicates, with error given as SE of the mean.

Temperature \ Substrate	20°C	30°C	40°C
Sand	18.3333 $\pm$ 2.8867 [†] d	80.4533 $\pm$ 18.1368 b	68.4200 b
Fertilized Soil	10.00 d	90.00 $\pm$ 10.00 a ^{††}	100 a
Water	41.6666 $\pm$ 2.8867 c	95.00 a	90.00 a

[†] Mean $\pm$ standard error for three groups of 20 explants each.

^{††} Mean values with the same letter are not significantly different, based on ANOVA followed by Tukey's test at $P \leq 0.05$.

Germination frequency in the different periods was also affected by substrate and temperature conditions (Fig. 3). In all treatments, the same profile of seed germination was observed (Fig. 3). The majority of seeds germinated in the first 21 days of culture and the

germination rate then progressively declined (Fig. 3). The exception was the 20°C-water assay, where the majority of seeds germinated at the end of the experiment (Fig. 3). At 20°C, in water, the seeds tended to germinate later (Fig. 3). In the other temperature treatments and compared to the other substrates assayed, for seeds in water, the germination rate did not decline as rapidly on succeeding days of cultivation, particularly at 40°C.

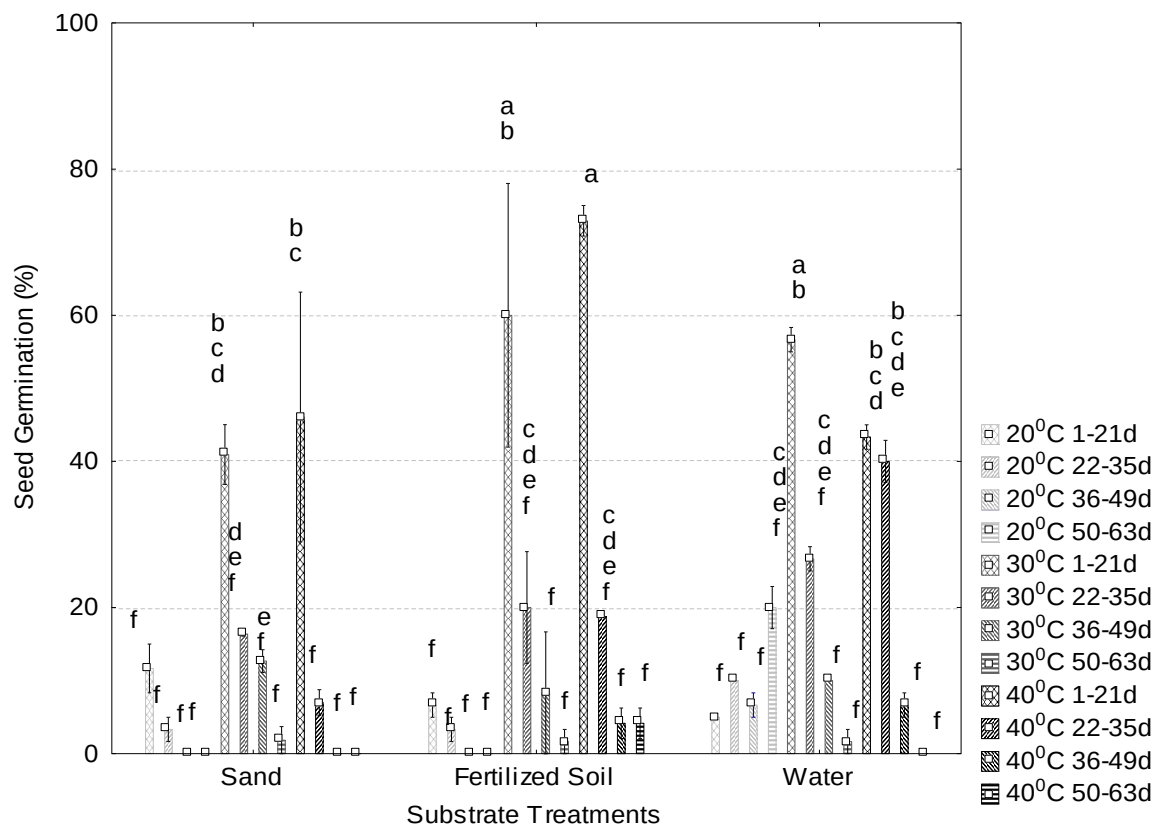


Figure 3. Frequency of germination at different time periods in three different substrates (sand, fertilized soil and water) at three temperatures. Values are the germination results after four different periods of time (days): 1-21 d (bars with crosshatching); 22-35 d (bars with right-diagonal lines); 36-49 (bars with left-diagonal lines) and 50-63 d (bars with horizontal lines). Germinability (mean $\pm$ standard error) of *Carapa guianensis* Aublet seeds

at different continuous temperature and substrate treatments, in the dark. Measurements are means of three replicates, with error bars representing SE of the mean. Mean values with the same letter are not significantly different, based on ANOVA followed by Tukey's test at $P \leq 0.05$).

After germination, the epicotyl growth was measured weekly for four weeks. At 20 and 30°C, in the three substrates assayed, the epicotyl reached similar heights, between 54 and 68 cm, and showed no significant difference in final height in each temperature (Fig. 4 and 5). However, epicotyl growth at 20 and 30°C in water was slightly slower than in the other substrates (Figs. 4 and 5). At 40°C a different epicotyl growth profile was observed (Fig. 6). The epicotyls grew best on fertilized soil, reaching 58 cm, followed by sand (30 cm) and water (29 cm) (Fig. 6). As in the other temperature experiments and also at 40°C, the epicotyls showed the slowest growth rate in water (Fig. 6).

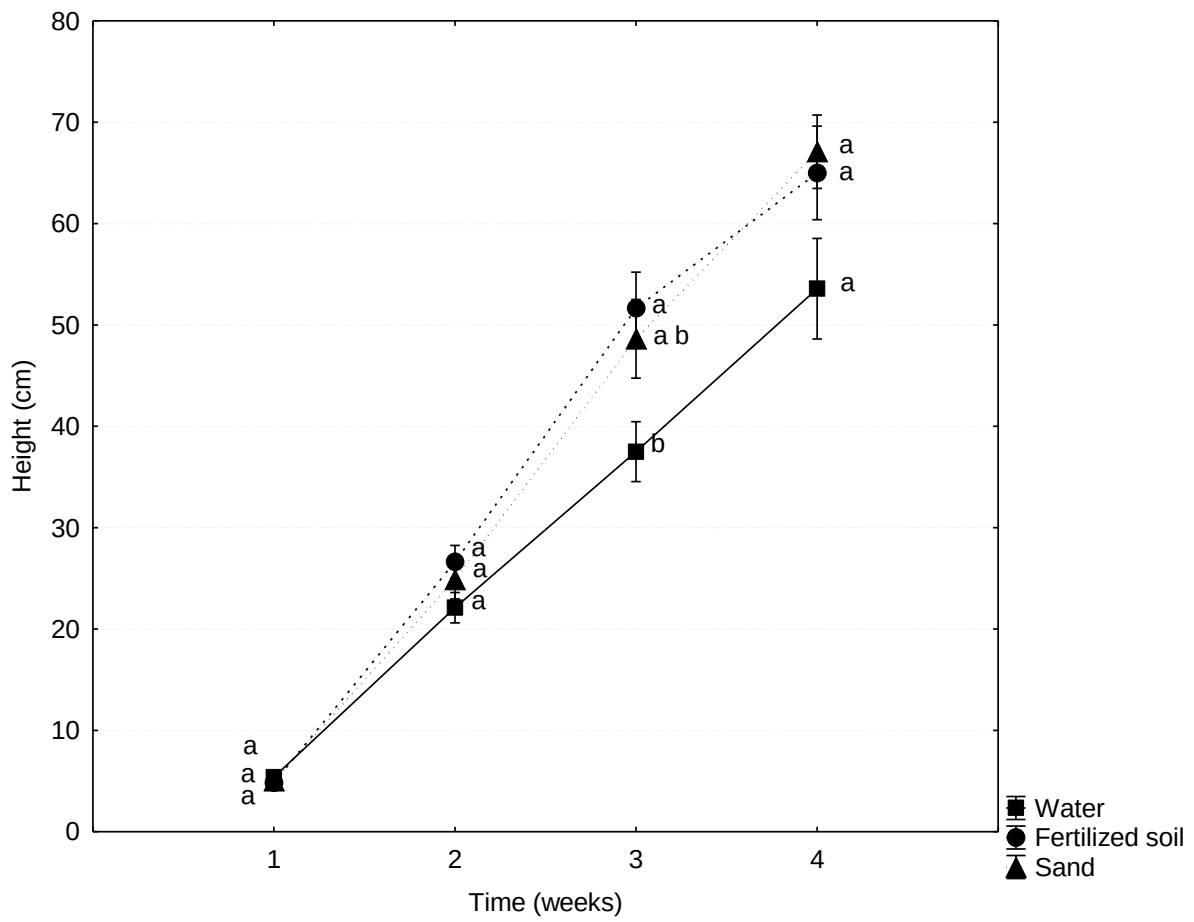


Figure 4. Epicotyl growth (epicotyl heights) with time (four weeks) of *C. guianensis* at 20°C on three different substrates. Significant difference between treatments at $P \leq 0.05$ is denoted by different letters. Values are means ($n=60$) $\pm$ SE

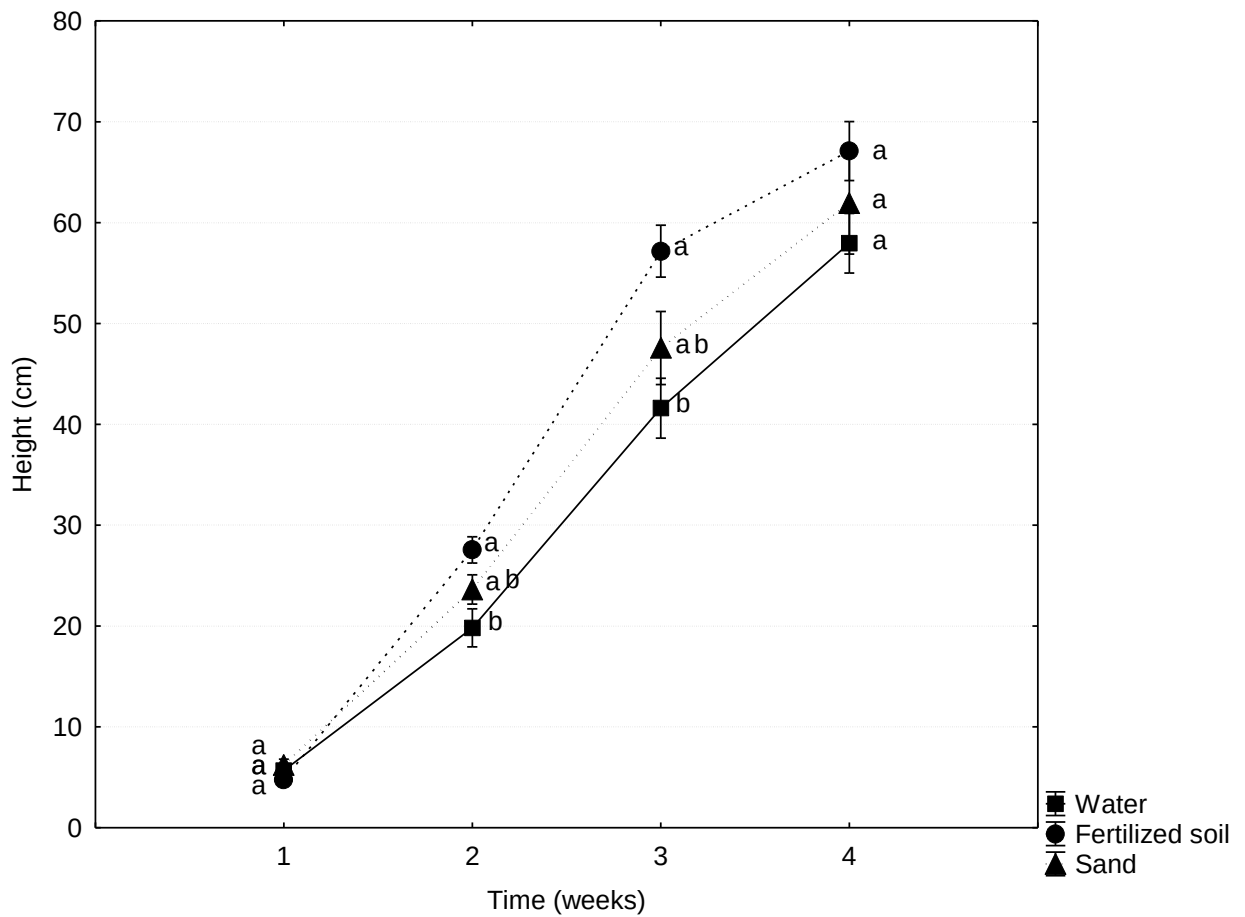


Figure 5. Epicotyl growth (epicotyl heights) with time (four weeks) of *C. guianensis* at 30°C on three different substrates. Significant difference between treatments at $P \leq 0.05$ is denoted by different letters. Values are means ($n = 60$) $\pm$ SE.

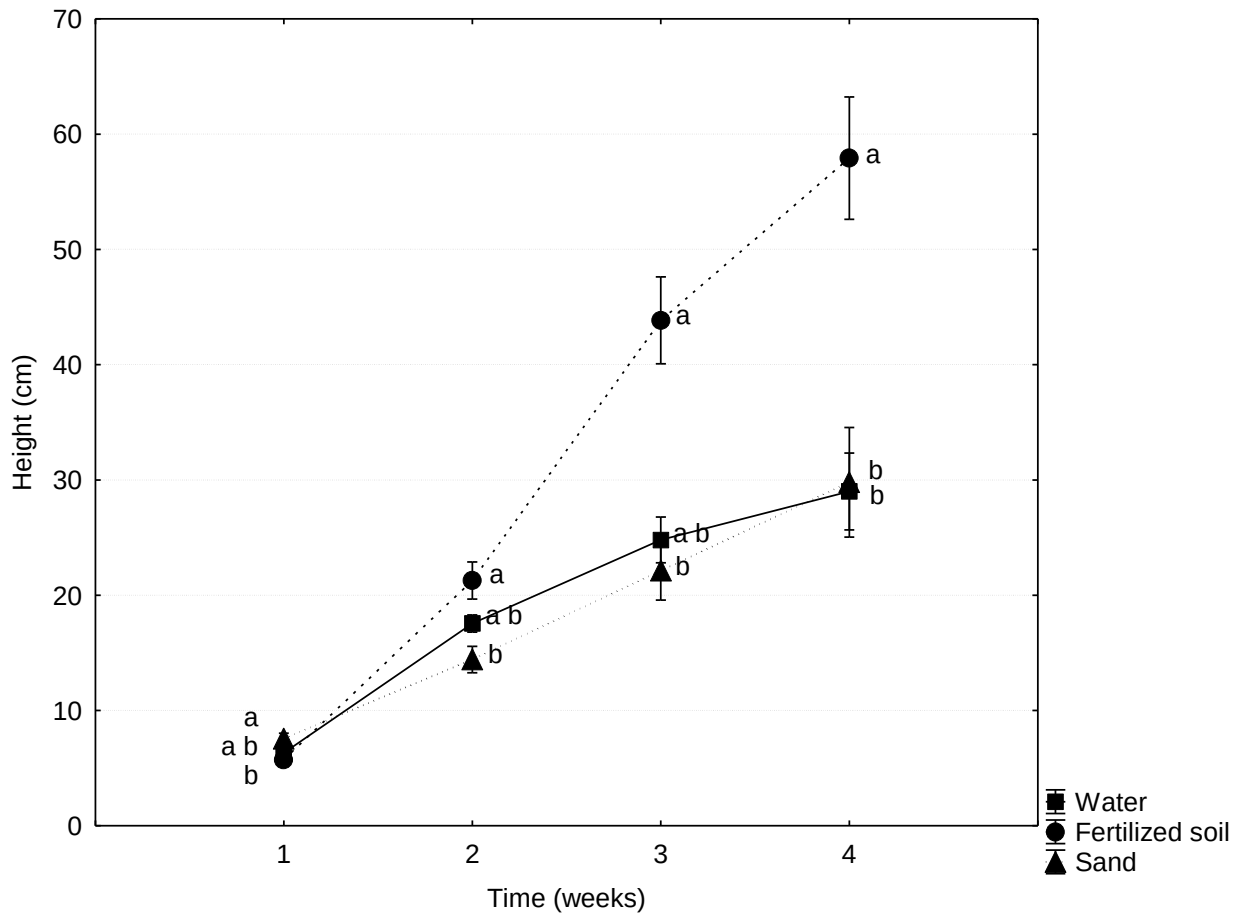


Figure 6. Epicotyl growth (epicotyl heights) with time (four weeks) of *C. guianensis* at 40°C on three different substrates. Significant difference between treatments at $P \leq 0.05$ is denoted by different letters. Values are means ($n=60$) $\pm$ SE.

Discussion

Light-quality and dark effects

The quality and quantity of solar radiation are crucial for growth and competition in forest ecosystems. The spectral waveband between 350 nm and 800 nm, termed morphogenetically active radiation (MAR) (Combes et al., 2000), triggers or inhibits

processes such as seed germination, stem growth, leaf expansion and orientation, flowering, and dormancy (Grant, 1997; Capers and Chazdon, 2004). Spectral ratios such as red/far red (R/FR) and blue/red (B/R) give important information about the light quality within stands (Hertel et al., 2011).

The absence of light is the ideal condition for germination of *C. guianensis* seeds, but not for epicotyl growth (Table 1; Fig. 2). These results diverge from other studies such as that of Dissanayake et al. (2010), where mean germination decreased from 63.3% in the light to 18.3% in the dark for seeds of *Parthenium argentatum* Gray. However, this species has small seeds; and in general, large-seed species such as andiroba, with large reserves to sustain prolonged periods of sapling growth in the dark (e.g., underground), do not require light to germinate (Milberg et al., 2000). *C. guianensis* is a partially shade-tolerant (PST) species, and its germination and seedling survival can be affected by the amount of light penetration (Schwartz et al., 2012), and probably also the light quality. In a recent review, Tiansawat and Dalling (2013) noted that in tropical environments, large seeds are independent of light for germination but are affected by the diurnal temperature. This finding concords with our work on *C. guianensis*. The same authors suggested that light is probably not the best indicator of habitat quality for large seeds, since the seedlings can emerge successfully from below the depth to which light penetrates into the soil, or from beneath layers of surface leaf litter.

Seeds in their natural environment are shaded in two ways, when they are buried in soil or lie beneath leaf litter, and when they are under the canopy. Spectral irradiance is also strongly influenced by the architecture of the canopy (Hertel et al., 2011). Plant canopies and soil operate as light filters, affecting the spectral and spatial distribution of light at

ground level (Grant, 1997), due to wavelength-selective reflection, transmission, and absorption of the photons, stand structure, foliation period, and the radiation above the canopy (Capers and Chazdon, 2004). Both situations affect light quantity and quality due to the selective absorption, by chlorophyll, of the blue and red wavelengths: under full sunlight, R:FR is around 1.2, but falls to approximately 0.55 under 3 mm soil, and to 0.1 in dense shade (Casal and Sánchez, 1998). Andiroba seeds germinate in the absence of light with a low proportion of red/long red, such as under the canopy of dense tropical forests on terra firme (Smith, 1982; Figueroa and Vásquez-Yanes, 2002). The wide range of R:FR values associated with spatial variation among microsites provides a gradient, potentially allowing fine-scale discrimination by seeds of safe sites for germination (Tiansawat and Dalling, 2013).

In general, long wavelengths such as far-red penetrate farther into soil, and short wavelengths such as blue are rapidly attenuated (Bliss and Smith, 1985). In our study, green and blue lights had no effect, and red light increased the germination rate of andiroba seeds (Table 1). These responses probably occurred because andiroba has evolved specific strategies adapted to germinate in the dense Amazon Forest, beneath the canopy or buried by rodents, while on terra firme. These shaded conditions are more influenced by red than by green or blue light. Gkika et al. (2014) also observed that the final percentage of seed germination was higher under red-light conditions for *Erysimum naxense* and *Erysimum krendlii*, compared with four other light regimes tested. Other studies have recorded similar results. Rattan and Tomar (2013) observed that green light, and to a lesser degree blue light, negatively affected seed germination of *Hippophae salicifolia*, a deciduous tree; red light produced the highest germination percentage.

Seeds subjected to blue light had higher dormancy than those under other light spectra (Fig. 1 and Table 1). In the Amazon rainforest, seeds can also fall into the river, and not in the soil, on terra firme. In this environment, blue light predominates due to the more-open environment. This may be the reason that the seeds take longer to germinate under blue light, to await anchorage in the soil or the arrival of the dry season. Although Scarano et al. (2003) argued that seed dormancy can increase under floating; the quality of light can be an important factor triggering germination.

Similarly to the conclusions of Barrero et al. (2012), working with *Brachypodium* genotypes, on the soil surface a predominantly blue light would inhibit germination. After the first few millimeters, where blue light disappears, seeds would find an appropriate germination environment, as the ratio of red to far-red would be high. Finally, deeper in the soil, the ratio of red to far-red would be pushed toward far-red, again inhibiting germination. Previous studies showed that *C. guianensis* decreased in density after logging, probably affected by light incidence, and that additional silvicultural treatments could be useful to increase the density (Schwartz et al., 2012).

Our results concerning the effect of darkness on germination also agree with those of Arias-Le Claire (2001), who reported data showing that burial of *C. guianensis* seeds by rodents, under natural conditions, increases germination. Thus, these data suggest that the successful regeneration of *C. guianensis* during the dry season, in both flooded and non-flooded forests, depends on the preservation of these rodent populations (Ferraz et al., 2002; Nyiramana et al., 2011). In another study, seed-coat fragments of *C. grandiflora* as well as cotyledons with rodent tooth marks were observed in the majority of experimental

sets (Nyiramana et al., 2011). This could explain why seeds without a tegument germinated faster and in larger numbers in the dark (Fig. 1 and Table 1).

According to the seed classification presented by Takaki (2001), *C. guianensis* seems to be insensitive to light. Therefore, *C. guianensis* germination must be controlled by phyA (phytochrome A) through a very-low-fluence response (VLFR). This type of response does not display the classical red/long red reversibility that is a typical survival mechanism of small-seed plants. Through this mechanism, seeds will only germinate in optimal light conditions, with subsequent successful development and growth of the sapling (Milberg et al., 2000).

Very-low-fluence responses, can also be induced by weak green light (Takaki, 2001), as seems to be the case with andiroba. However, green and blue light retarded and red light stimulated germination of the andiroba seeds (Table 1). Previous studies have indicated that the active form of the phytochrome may increase the embryo's growth potential and promote the activity of degrading enzymes, thus reducing the mechanical resistance of tissues near the micropyle region (Sánchez et al., 1986; De Miguel et al., 2000). The inhibitory effect of blue light on germination could be due to the low levels of red radiation, resulting in failure to activate the phytochrome (Dissanayake et al., 2010).

More seeds with a tegument than without it, germinated in the dark, under red light or green light; the opposite was observed for white light (Table 1). These data agree with those of Ferraz et al. (2002) for andiroba seeds under white light.

Under our conditions, the presence of a tegument, and dark, red- and blue-light treatments were dormancy-promoting factors in the *C. guianensis* seeds, compared to the other experiments (Fig. 1). Under these conditions, germination occurred up to day 63. In

contrast, under green light, seed dormancy was stronger in the absence of a tegument (Fig. 1). Seed dormancy was always weaker if seeds were under white light, with or without a tegument, compared to all other experimental conditions (Fig. 1). Our observations of weaker dormancy expression under white light contrast with previous reports for grasses such as the *Brachypodium* genotypes wild oats, barley and wheat (Cumming and Hay, 1958; Barrero et al., 2012), thus indicating that the seed size and light conditions of the environment where the plant has developed are important features affecting seed responses to light quality.

Some authors have reported that when tegument integrity is lost, the control of seed germination changes, with the activation of phy A or phy B. These two phytochromes are evolutionarily different and have distinct effects (Takaki and Gama, 1998). Our data for a shorter germination time in seeds without a tegument (Fig. 1) agree with those of Suda and Pereira (1997) and Oliveira et al. (2003). Suda and Pereira (1997) suggested that the germination-inducing mechanism is activated faster in the absence of a tegument, independently of the light wavelength. This would probably occur due to an increased supply of respiratory gases and water to the embryo, to a change in light and temperature sensitivities, or to the elimination of inhibitory substances (Mayer and Poljakoff-Mayber, 1989; Bewley and Black, 1994). A study of guayule seed germination provided evidence of an inhibitory effect of the seed coat, because removing the seed coat significantly increased germination (Dissanayake et al., 2010). However, this is relevant to our work only for germination velocity or dormancy break (Fig. 1), but not for germination rate (Table 1), where the presence of a tegument increases the number of germinating seeds.

When the epicotyls emerge, green and red light stimulate growth in the same manner (Fig. 2). In shade, under the canopy, green and yellow-green bands prevail due to the reflection of light and transmission through leaves (Théry, 2001). This “forest” spectrum is most similar to the green and red lamps used in our experiments. Epicotyls grown under blue light were repressed (Fig. 2). Under the vegetation cover, “the blue part of the spectrum, present in the canopy, disappears as the distance from the canopy increases” (Théry, 2001). It is logical to assume that blue light repressed the growth of the andiroba epicotyls.

In agreement with Théry (2001), we suggest that light-quality measurement can be used to estimate the structural impact of forest exploitation, and this will provide the information necessary for a functional explanation of anthropogenic effects on tropical-forest diversity. Studies of the effects of human disturbance on forest light and species diversity show that it is crucial to investigate the use, distribution and importance of light environments in conservation projects.

Temperature and substratum effects

Seed germination is complex, and in addition to light, the temperature and substrate (affecting moisture conditions, retaining or draining water from the area) affect germination and seed dormancy state (Bewley and Black, 1994). Temperatures can be detected several centimeters beneath the soil surface, so temperature can be a more effective signal of environmental conditions for large seeds than light quality in tropical environments (Tiansawat and Dalling, 2013). In some species (*Solanum hayesii*, *Holcus lanatus* and *Poa annua*), temperature can trigger germination in the dark (Pearson et al. 2003).

In this present study, the germination rate of *C. guianensis* seeds was higher at 30 and 40°C (Table 2), in contrast to the ideal germination temperatures of 20 to 30°C found for other Brazilian species (Sakita et al., 2007; Kissman and Scalón, 2011). However, some tropical-forest species such as *Acacia catechu*, *Acacia nilotica*, *Albizia lebbek*, *Dalbergia sisso* and *Tectona grandis* show a similar trend of a lower germination rate at 20°C and higher germination rate above 35°C (Khera and Singh, 2005). At higher temperatures, changes in protein structure occur that promote the germination process (Bewley and Black, 1994). Andiroba is native to northern Brazil, where temperatures are high year-round.

C. guianensis is typical of both wet and dry areas. Amazonian species such as andiroba can germinate and show epicotyl growth during both the wet and dry seasons in flood-prone forests, as well as in unflooded forests (Henriques and Sousa, 1989; Pennington et al., 1981). Due to their huge seed reserves, large seeds such as andiroba do not show dormancy (Vázquez-Yannes and Orozco-Segovia, 1990) and have rapid epicotyl growth that favors seedling establishment and survival by avoiding anoxic stress during submersion in the flood season (McHargue and Hartshorn, 1983). In nature, these species germinate and develop rapidly when on substrates that retain water or when they are floating. These findings partially accord with our results, because the highest germination rates were observed in fertilized soil and water, mainly in higher temperatures (Table 2); but germination in water was slightly slower than in other substrates (Fig. 3). Therefore, the substrate and temperature both affected the germination rate and speed, but in different ways. The number of germinated seeds was similar in fertilized soil and water at both 30 and 40°C (Table 2), but germination was delayed in water, and a temperature increase

reduced this trend (Fig. 3). Our data accord with those of Scarano (2003) regarding the delayed germination of andiroba seed in water, but in those experiments the temperature ranged from 20 to 30°C.

The assay of epicotyl growth resulted in the same findings as for germination speed. Temperature increase affected the growth response. Epicotyl growth was higher in fertilized soil than in water, although not significantly so (Figs. 4 and 5). Epicotyl growth was significantly higher in fertilized soil compared to water and sand, only at 40°C (Fig. 6). Therefore, for epicotyl growth, the effects of water and fertilized soil were similar, but temperature had a promoting effect. These findings contrast with those of Sacarano (2003), where *C. guianensis* seedling growth was delayed in water compared to vermiculite, at 20-30°C. Scarano (2003) reported that epicotyl growth was more accentuated in the hard substrate than in water, possibly because of nutrients in the substrate. Seeds germinate and plantlets start to develop in water because of the nutrients provided by the endosperm (Manasse, 1990). Our results suggested that water availability and drainage are more important for epicotyl growth, but only in higher temperatures.

In sand, the germination rate was lower than in the other substrates, mainly at 20°C (Table 2), probably due to the poor water environment. This species requires appropriate moisture conditions because of its thick seed coat and large size (Khera and Singh, 2005). In sand, water drains rapidly, which prevents ideal moisture conditions for germination.

This study provided important information about the best conditions for appropriate development of *Carapa guianensis* seeds and establishment of plantlets. Conditions similar to the Amazon habitat, including high temperatures and moist soil, are ideal, and low humidity and temperatures will result in low germination rates. In addition, we suggest that

light-quality measurement be used to estimate the structural impact of forest exploitation, providing information for a functional explanation of anthropogenic effects on tropical-forest diversity, since germination and epicotyl growth are influenced by different light qualities.

Materials and methods

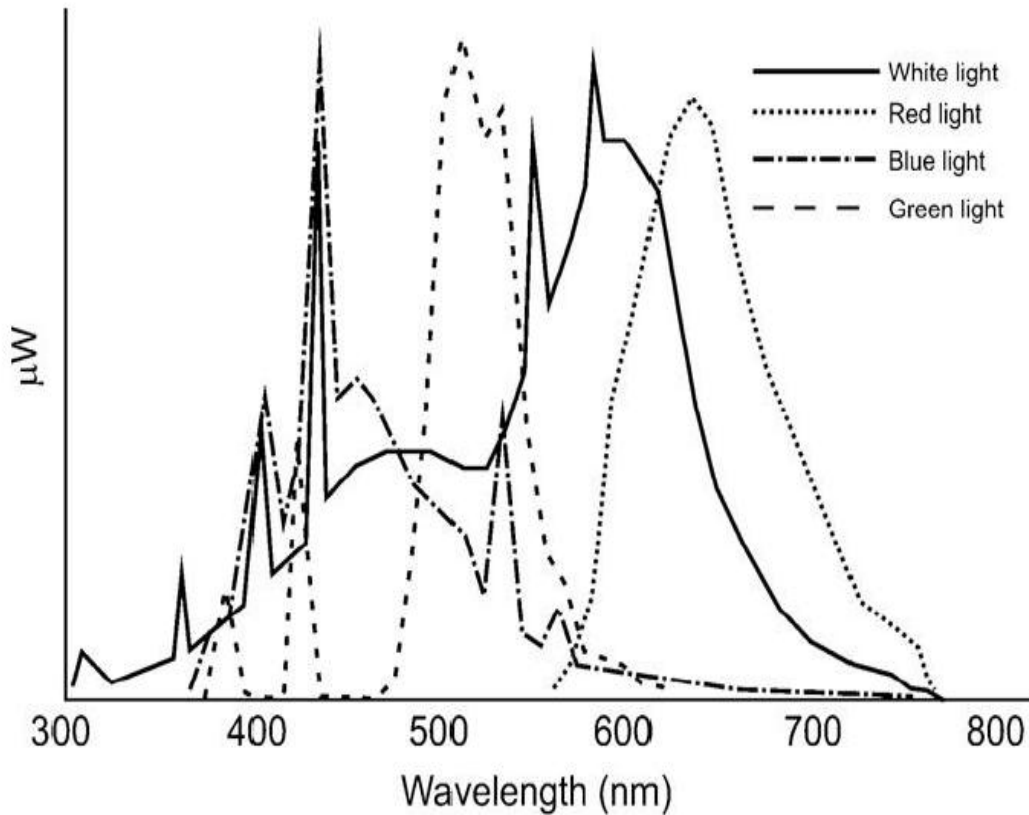
Plant Material

Carapa guianensis Aublet (andiroba) seeds were harvested in the city of Rio de Janeiro (Jardim Botânico do Rio de Janeiro), from under identified parent trees, with prior authorization from the Botanical Garden.

Light experiment

Two randomized groups of 60 seeds (three replicates each of 20 seeds/light treatment), each seed weighing around 20-30 g, one group with integuments (seed coats) and the other without, were washed, soaked in water for 24 h, and then placed in 200-mL plastic bottles with equal volumes of sterile fertilized soil mixed with plant humus (Sabino), watered twice a week, and maintained in individual growth chambers (Controlled Environments). The growth chambers were equipped with Sylvania Cool 60 F20-T12-Cor fluorescent tubes, providing photosynthetically active radiation (PAR) at approximately $20 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. The tubes were used for the light-quality experiments, to provide red light (RL); green light (GL); white light (WL) or blue light (BL) (Fig. 7). WL and continuous-darkness (D) conditions were used as control treatments to assess the effect of light on seeds and

epicotyls under the same culture conditions. A 16-h L: 8-h D photoperiod was used for all treatments, and the cultures were maintained at $27 \pm 1^\circ\text{C}$ for 70 days.



Temperature and substratum experiment.

Three germination substrata (well-washed sand, fertilized soil, and water) were tested for their effects on the germination of *C. guianensis* seeds. The grain size of the sand was approximately 0.1 mm. Fifty mL of tap water was added to the plastic bottles with sand or fertilized soil twice a week. The water in the water experiments was changed twice a week

to prevent fungus contamination. The germination experiments were carried out in the dark, in growth chambers with constant temperatures (20, 30 or 40 °C). Each replicate contained 20 seeds/seed treatment. The seeds were placed on the three types of substratum in the same bottles described in the section above. All treatments lasted 70 days and were replicated three times.

Assessment of seed germination and epicotyl growth

In all assays, germination was considered as the emergence of the radicle. The effects of the different light qualities and darkness, different substrates and temperatures on the germination of andiroba were analyzed based on: a) the amount of time between inoculation and the observation of the protrusion of the small radicle; and b) number of germinated seeds, in each treatment, within the germination-time intervals (1 to 21 days, 22 to 35 days, 36 to 49 days and 50 to 63 days). Epicotyl growth (n=60/treatment) was assayed weekly, for one month, by measuring the epicotyl elongation with a caliper ruler.

Statistics

The statistical tests were conducted with the Statistica for Windows software (StatSoft, Inc. 2005, STATISTICA - data analysis software system, version 7.1). The results for each treatment are shown as the mean and standard error (SE) of three independent experiments. The statistical significance of differences among groups was evaluated by analyses of variance, followed by a multiple-comparison Tukey's test. *P* values lower than 0.05 were considered significant.

Acknowledgments

The authors are indebted to the Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO) and to the Instituto de Pesquisas, Jardim Botânico do Rio de Janeiro.

References

- Amaral LFG, Fierro IM (2013) Profile of medicinal plants utilization through patent documents: the andiroba example. *Braz J Pharmacogn* 23:716-719
- Arias-Le Claire H (2001) Remoción y germinación de semillas de *Dipteryx panamensis* y *Carapa guianensis* en bosques fragmentados de Sarapiquí, Costa Rica. *Rev For Centroamericana* 34:42-46
- Barrero JM, Jacobsen JV, Talbot MJ, White RG, Swain SM, Garvin DF, Gubler F (2012) Grain dormancy and light quality effects on germination in the model grass *Brachypodium distachyon*. *New Phytol* 193:376–86
- Bliss D, Smith H (1985) Penetration of light into soil and its role in the control of seed-germination. *Plant Cell Environ* 8:475–483
- Bewley JR, Black M (1994) *Seeds: physiology of development and germination*. Plenum Press, New York
- Capers RS, Chazdon RL (2004) Rapid assessment of understory light availability in a wet tropical forest. *Agric Forest Meteorol* 123:177–185
- Casal J, Sánchez R (1998) Phytochromes and seed germination. *Seed Sci Res* 8:317–329

- Combes D, Sinoquet H, Varlet-Grancher C (2000) Preliminary measurements and simulation of the spatial distribution of the Morphogenetically Active Radiation (MAR) within an isolated tree canopy. *Ann Forest Sci* 57:497–511
- Da Silva Dias A, Campos JJ, Villalobos R, Louman B, Gonçalves L (2002) Manejo florestal diversificado en una comunidad ribereña de la Amazonía brasileña: consideraciones sociales y silviculturales. *Rev For Centroamericana* 38:78–84
- Dayanandan S, Dole J, Bawa K, Kesseli R (1999) Population structure delineated with microsatellite markers in fragmented populations of a tropical tree, *Carapa guianensis* (Meliaceae). *Mol Ecol* 8:1585–1592
- De Miguel L, Burgin MJ, Casal JJ, Sánchez RA (2000) Antagonistic action of low-fluence and high-irradiance modes of response of phytochrome on germination and β -mannase activity in *Datura ferox*. *J Exp Bot* 51:1127-1133
- Dissanayake P, George DL, Gupta ML (2010) Effect of light, gibberellic acid and abscisic acid on germination of guayule (*Parthenium argentatum* Gray) seed. *Industrial Crops and Products* 32:111–117
- Ferraz IDK, Camargo JLC, Sampaio PTB (2002) Sementes e plântulas de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl. e *Carapa procera* D. C.): aspectos botânicos, ecológicos e tecnológicos. *Acta Amazon* 32:647-661
- Figuerola JA, Vásquez-Yanes C (2002) Efecto de la calidad de la luz sobre la germinación de semillas en el árbol pionero *Heliocarpus appendiculatus* (Tiliaceae). *Rev Biol Trop* 50:31-36

- Fortini LB, Zarin DJ (2011) Population dynamics and management of Amazon tidal floodplain forests: Links to the past, present and future. *Forest Ecol Manag* 261:551–561
- Fournier LA (2003) Species description *Carapa guianensis*. In: Vozzo JA (ed) *Tropical Tree Seed Manual*. Agricultural Handbook Number 721, USDA Forest Service, Washington, DC 22-37.
- Gkika PI, Krigas N, Menexes G, Eleftherohorinos IG, Maloupa E (2013). Effect of temperature and light on seed germination of *Erysimum naxense* and *Erysimum krendlii*. *Cent Eur J Biol* 8:1194-1203.
- Grant RH (1997) Partitioning of biologically active radiation in plant canopies. *Int J Biometeorol* 40:26–40
- Guarino EDSG, Gessner CM, Wadt LHO, da Fonseca FL, Raposo A (2014) Estrutura etária e espacial de uma população natural de *Carapa guianensis* Aubl. (Meliaceae) na Amazônia Sul Ocidental. Age and spatial structure of *Carapa guianensis* Aubl. (Meliaceae) in southwestern Amazon. *Sci For* 42(101):91-99
- Gyula P, Schäfer E, Nagy F (2003) Light perception and signaling in higher plants. *Curr Opin Plant Biol* 5:446–452
- Henriques M, Penido C (2014) The Therapeutic Properties of *Carapa guianensis*. *CurrPharmaceut Design* 20:850-856
- Henriques RPB, Sousa ECEG (1989) Population structure, dispersion and microhabitat regeneration of *Carapa guianensis* in northeastern Brazil. *Biotropica* 21: 204–209

- Hertel C, Leuchner M, Menzel A (2011) Vertical variability of spectral ratios in a mature mixed forest stand. *Agric For Meteorol* 151:1096–1105
- Kissmann C, Scaloni SPQ (2011) Seed biometry and the effect of pre germinative treatments, temperature, and light on seed germination and subsequent growth of three *Stryphnodendron* species. *J Torrey Bot Soc* 138:123-133
- Klimas A, Kainer KA, Wadt LHO (2007) Population structure of *Carapa guianensis* in two forest types in the southwestern Brazilian Amazon. *Forest Ecol Manag* 25:256–265
- Klimas CA, Kainer KA, Wadt LH, Staudhammer CL, Rigamonte-Azevedo V, Correia MF, Lima LMS (2011) Control of *Carapa guianensis* phenology and seed production at multiple scales: a five-year study exploring the influences of tree attributes, habitat heterogeneity and climate cues. *J Trop Ecol* 28:105–118
- Khera N, Singh RP (2005) Germination of some multipurpose tree species in five provenances in response to variation in light, temperature, substrate and water stress. *Trop Ecol* 46:203-218
- Klimas CA, Kainer KA, Wadt LHO (2012) The economic value of sustainable seed and timber harvests of multi-use species: An example using *Carapa guianensis*. *Forest Ecol Manag* 268:81-91
- Leite ITA, Takaki M (2001) Phytochrome and temperature control of seed germination in *Muntingia calabura* L. (Elaeocarpaceae). *Braz Arch Biol Technol* 44:297-302
- Lopez OR, Kursar TA (2003). Does flood tolerance explain tree species distribution in tropical seasonally flooded habitats? *Oecologia* 136:193-204
- Manasse RS (1990) Seed size and habitat effects on the water-dispersed perennial, *Crinum erubescens* (Amaryllidaceae). *Am J Bot* 77:1336–1341

- Mayer A, Poljakoff-Mayber A (1989) *The Germination of Seeds*. Pergamon Press Ltd., Oxford, UK
- McHargue LA, Hartshorn GS (1983) Seed and seedling ecology of *Carapa guianensis*. *Turrialba* 33:399–404
- Milberg P, Andersson L, Thompson K (2000) Large-seeded species are less dependent on light for germination than small-seeded ones. *Seed Sci Res* 10:99-104
- Ministry of the Environment (MMA); Ministry of Agrarian Development (MDA); Ministry of Social Development, Hunger Alleviation (MDS) (2009) National Plan to Promote Sociobiodiversity Product Chains (Plano Nacional de Promoção das Cadeias de Produtos da Sociobiodiversidade). Brasília, Brazil
- Nyiramana A, Mendoza I, Kaplin BA, Forget PM (2011) Evidence for seed dispersal by rodents in tropical montane forest in Africa. *Biotropica* 43:654–657
- Oliveira LM, Davide AC, Carvalho MLM (2003) Avaliação de métodos para a quebra da dormência e para a desinfestação de sementes de canafístula (*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert). *Rev Árvore* 27:597–603
- Pennington TD, Styles BT, Taylor DAH (1981) *Meliaceae*. *Flora Neotropica Monograph* 28. New York Botanical Garden Press, New York.
- Plowden C (2004) The ecology and harvest of andiroba seeds for oil production in the Brazilian Amazon. *Conserv Soc* 2:251–272
- Prophiro JS, da Silva MA, Kanis LA, da Silva BM, Duque-Luna JE, da Silva OS (2012) Evaluation of time toxicity, residual effect, and growth-inhibiting property of *Carapa guianensis* and *Copaifera* sp. in *Aedes aegypti*. *Parasitol Res* 110:713–719

- Rattan V, Tomar A (2013) Effect of different lights on the seed germination of *Hippophae salicifolia*. IIOAB J 4:27–29
- Sakita AEN, Silva A, Paula RC (2007) Germinação de sementes de *Aspidosperma polyneuron* M. Arg. (peroba rosa) sob diferentes condições de qualidades de luz e temperatura. Inst Flor Sér Reg 31:203–207
- Sánchez RA, de Miguel L, Mercuri O (1986) Phytochrome control of cellulase activity in *Datura ferox* L. seeds and its relationship with germination. J Exp Bot 37:1574-1580
- Scarano FR, Pereira TS, Rôças G (2003) Seed germination during floatation and seedling growth of *Carapa guianensis*, a tree from flood-prone forests of the Amazon. Plant Ecol 168:291-296
- Schwartz G, Lopes JC, Kanashiro M, Mohren GM, Peña-Claros M (2012) Disturbance Level Determines the Regeneration of Commercial Tree Species in the Eastern Amazon. Biotropica 46:148–156
- Schwartz G, Peña-Claros M, Lopes JCA, Mohren GMJ, Kanashiro M (2012) Mid-term effects of reduced-impact logging on the regeneration of seven tree commercial species in the Eastern Amazon. Forest Ecol Manag 274:116–125
- Scotti-Saintagne C, Dick CW, Caron H, Guichoux E, Vendramin GG, Buonanici A, Duret C, Sire P, Valencia R, Lemes MR, Gribel R, Scotti I (2013) Phylogeography of a species complex of lowland Neotropical rain forest trees (*Carapa*, Meliaceae). J Biogeography 1:1-17
- Smith H (1982) Light quality, photoperception and plant strategy. Ann Rev Plant Physiol 33:481–518

- Suda CNK, Pereira MFDA (1997) Sensibilidade à luz de sementes de *Euphorbia heterophylla* L. durante a germinação. *Rev Bras Fisiol Vegetal* 9:55-64
- Takaki M (2001) New proposal of classification of seeds based on forms of phytochrome instead of photoblastism. *Rev Bras Fisiol Vegetal* 13:103–107
- Takaki M, Gama LHP (1998) The role of the seed coat in phytochrome-controlled seed germination in *Lactuca sativa* L. cv. Grand Rapids. *Seed Sci Technol* 26:355-362
- Théry M (2001) Forest light and its influence on habitat selection. *Plant Ecol* 153:251–261
- Tiansawat P, Dalling JW (2013) Differential seed germination responses to the ratio of red to far-red light in temperate and tropical species. *Plant Ecol* 214:751-764
- Tonini H, Kaminski PE, Costa P, Schwengber LAM (2008) Estrutura populacional e produção de Castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) e andiroba (*Carapa* sp.) no Sul do Estado de Roraima. In: Wadt LHO (ed) *Anais/1º Seminário do Projeto Kamukaia Manejo Sustentável de produtos florestais não-madereiros na Amazônia*. Embrapa, Rio Branco, AC, p 182
- Vázquez-Yanes C, Orozco-Segovia A (1990) Seed dormancy in the tropical rain forest. In: Bawa KS, Hadley M (eds), *Reproductive Ecology of Tropical Forest Plants. Man and the Biosphere Series*. Vol. 7. UNESCO, Paris, pp. 247–259

CAPÍTULO 4

CITOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE DE TRÊS ÓLEOS DE *Carapa guianensis*

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Carapa guianensis* Aublet

Carapa guianensis Aubl. (Meliaceae) é uma árvore neotropical amplamente distribuída pelo norte da América do Sul (Amazônia), América Central e ilhas do Caribe (Cloutier *et al.*, 2007). Esta espécie é encontrada tanto em terra firme onde o solo é mais seco, quanto nas várzeas, que são alagadas sazonalmente na bacia Amazônica (McHargue e Hartshorn, 1983; Fournier, 2003). No Brasil, é popularmente conhecida como “andiroba”, embora haja outros nomes vulgares (Pennington, 1981).

C. guianensis é considerada uma espécie multiuso no cenário brasileiro (Tonini *et al.*, 2008a) e seu principal apelo mercadológico advém do óleo extraído das suas sementes, que é um dos produtos naturais comerciais mais importantes no Brasil e possui demanda internacional, sendo exportado para EUA e Europa (Tonini *et al.*, 2008b). Devido ao seu amplo uso, andiroba faz parte da Lista Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do Ministério da Saúde (Amaral e Fierro, 2013).

O óleo de andiroba é rico em ácidos graxos como o oléico, palmítico, mirístico, linoleico, esteárico e araquidônico (Arenciaba Arrebola *et al.*, 2013). Alguns tetraterpenóides foram detectados nas sementes de *Carapa guianensis*: 6-alfa-acetoxi-epoxiazadiradiona, 7-deacetoxina-7-oxogedunina, gedunina, andirobina, metil angolensatedina, 1,3-di-benceno carbo amino-2-octadecílico acil-glicérido, ácido hexacosanóico 2,3-dihidroxi-glicérido, ácido ursólico, naringenina, escopoletina, 3,4-

dihidroximetilbenzoato, 2,6-dihidroximetilbenzoato, ácido tetratriacontanóico, ácido triacontanóico, epoxiazadiradiona e 6-alfahidroxigedunina.

Muitos destes limonóides citados anteriormente, que estão presentes em grandes quantidades nas sementes de andiroba, pertencentes as categorias de: gedunina, andirobina, mexicanolídeo e fragmalina,, possuem atividade antifúngica, bactericida, antiviral e amplas propriedades terapêuticas em animais e humanos. O óleo de andiroba também possui componentes como, esteróides, coumarinas e flavonóides (Lavie et al. 1972; Marcelle e Moto, 1975; Henriques e Penido, 2014).

Este óleo possui aplicabilidade para iluminação, preparação de sabão, cosméticos, como repelente de insetos (Freire et al., 2006) e potencial larvicida contra *Aedes aegypti* (Prophiro et al, 2012). Relatos etnofarmacológicos indicam o uso do óleo no tratamento da artrite, resfriado, malária e inflamações, com resultados positivos (Mendonça e Ferraz, 2007) e como possível antitumoral (Moura et al., 2002). Estudos recentes, relacionam os extratos de andiroba á atividade de cicatrização em modelos animais (Nayak *et al*, 2010; . Nayak *et al.*, 2011)

O efeito antioxidante do óleo de andiroba, através de administração oral em ratos, evidenciou sua função protetora para formação de espécies reativas de oxigênio (Arencibia Arrebola, 2013). Na indústria farmacêutica homeopática, onde tem sido comercializado sob a forma de cápsula, o óleo é usado para diabetes e reumatismo (Amaral e Fierro, 2013).

Estudo recente, a respeito de levantamento sobre solicitação de patentes relacionadas ao uso da andiroba constando como componente da fórmula do produto, mostraram que, do número total de pedidos de patente, a grande maioria, 69%, referem-se à preparações para assistência médica, odontológica, ou para fins sanitários. 19% das solicitações inclui uso no combate à pragas, como repelentes e

biocidas, bem como relacionada à preservação de alimentos ou do gênero alimentício. 6% referem-se à produção de gorduras, óleos gordos ou ceras de matérias-primas (Amaral e Fierro, 2013).

Estudos recentes investigaram o efeito tóxico da ingestão de doses aguda e subaguda, além de delimitar a dose letal em roedores, mostrando que o óleo de andiroba é um produto mais seguro em comparação com algumas drogas antialérgicas já conhecidas no mercado, como a fexofenadina (Tkachyk, 1999; Penido *et al.*, 2005; Compalati *et al.*, 2011). Apesar desses trabalhos, o óleo da semente da andiroba possui muitas aplicabilidades, o número de dados a respeito de sua toxicidade é insuficiente para fornecer segurança no uso (Henriques e Penido, 2014). Assim sendo, por todos os motivos acima descritos, se faz necessária análise do seu nível de segurança.

1.2 Estudo da mutagenicidade e genotoxicidade

A utilização de bactérias para detectar mutações gênicas é, atualmente, uma importante ferramenta para os estudos das etapas do processo de carcinogênese e para detectar compostos genotóxicos, capazes de causar danos à saúde humana e ambiental (Umbuzeiro e Vargas, 2003). Ames e Yamasaki (1971) descreveram um método utilizando mutantes de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium deficientes da síntese de histina para detectar o potencial carcinogênico de compostos químicos. Este ensaio é uma metodologia rápida, de baixo custo, segura e utilizada atualmente por diversos laboratórios para detectar substâncias mutagênicas. Os testes com organismos procariotos permitem realizar um diagnóstico em curto prazo de como uma amostra atua, caso haja interação com o DNA. No entanto, sabido que a maior parte dos carcinógenos conhecidos depende de metabolização para apresentar seu

potencial de interação com o DNA (Claxton, 1997) se faz necessária a utilização de um sistema de metabolização exógena, geralmente, se baseando no uso de frações microsossomais hepáticas de ratos (McCann, 1975) a serem incluídas nos ensaios.

A utilização de modelos bacterianos para a detecção de mutágenos é recomendada pelo *guideline* 471, de 17 de julho de 1997, da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (*Organization for Economic Co-operation and Development* – OECD, 1997), que é um órgão não governamental responsável pela normatização de diretrizes de desenvolvimento. Consequentemente, as demais agências reguladoras de produtos de sanidade humana e animal no mundo submetem aos testes, os produtos que porventura possam ser comercializados em seu território.

No desenvolvimento de fármacos, uma avaliação completa do potencial genotóxico de determinada substância torna-se necessária para que o seu consumo humano seja viável. O ensaio de mutação reversa bacteriana isoladamente não é suficiente para suprir essa necessidade, visto que utiliza organismos procariotos e não identifica todas as formas de interação com o DNA. Dessa forma, testes genotóxicos *in vitro* e/ou *in vivo* em células de mamífero também são usados, nesse processo de desenvolvimento, para expandir a detecção dos mecanismos genotóxicos relevantes na formação de alterações genéticas (FDA, 2012).

A importância de estudos genotóxicos sobre determinada amostra está na detecção de agentes químicos ou físicos que possuem a capacidade de gerar danos ao DNA de forma direta ou indireta. Através dos testes de genotoxicidade, os processos que levam à lesão do DNA podem ser identificados e indicar o risco que o agente investigado possui. Em caso de resultados positivos, tanto em testes *in vitro* como *in*

vivo, os agentes em estudo apresentam substâncias com potenciais atividades mutagênicas e carcinogênicas para a espécie humana (Stankevicius, 2008).

2. OBJETIVOS

Identificar a mutagenicidade, citotoxicidade e perfil fitoquímico de óleos de andiroba obtidos por 3 diferentes processos de extração.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção das amostras

Sementes de *Carapa guianensis* Aublet. foram coletadas no Jardim Botânico do Rio de Janeiro e levadas para a Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (Unirio), onde foram limpas superficialmente com pano úmido e congeladas em freezer -18°C. As coletas foram realizadas nos meses de dezembro e janeiro. As sementes foram transportadas para o Laboratório de Óleos Graxos da Embrapa Agroindústria de Alimentos em recipiente térmico, onde foram mantidas congeladas.

Para extração dos óleo, as sementes congeladas foram cortadas em lâminas e secas em estufa com circulação de ar a 60°C. Estas lâminas foram utilizadas como matéria-prima para 3 extrações: duas prensagens e uma extração em Soxhlet.

A extração do óleo bruto (B), realizada por prensagem, foi realizada em prensa de laboratório do tipo *expeller*, modelo CA 59 G (Komet), com capacidade máxima de processamento de 5 kg/h de matéria prima. Foram utilizados parafuso com distância entre ranhuras de 12 mm, malha de saída de óleo com orifícios de 1 mm de diâmetro e bocal de saída de torta com 10 mm de diâmetro. O óleo obtido foi

centrifugado a 10000 rpm por 10 minutos, à temperatura ambiente, e o óleo sobrenadante foi congelado a -18°C.

Para comparação, quanto ao efeito de tratamento térmico na extração de óleo e composição, as sementes foram autoclavadas na temperatura 121°C por 15 minutos, em seguida, secas em estufa e trituradas para extração de óleo por prensagem (óleo A). O óleo obtido foi centrifugado a 10000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente e o óleo sobrenadante foi congelado a -18°C (AOCS, 2009).

A extração com éter de petróleo (30-60°C) foi feita em aparelho Soxhlet, por 16 horas (óleo S). O solvente foi evaporado em rotaevaporador e sob corrente de nitrogênio. O óleo obtido também foi congelado a -18°C.

3.2 Perfil de ácidos graxos e características dos óleos

Para composição em ácidos graxos, os ésteres metílicos foram obtidos de acordo com Hartman e Lago (1973). A cromatografia em fase gasosa foi realizada em cromatógrafo gasoso modelo Agilent 7890, com detector de ionização de chama, utilizando-se coluna capilar de sílica fundida de 60 m, 0,32 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de fase estacionária de ciano-propil-siloxano com programação de temperatura de 150 a 200°C e taxa de aquecimento de 1,3°C/min. O injetor foi mantido temperatura de 250°C no modo de divisão de fluxo (split) na razão de 50:1. Foi injetado um volume de 1µL de uma solução diluída em diclorometano (2%). A temperatura do detector de ionização de chama foi de 280°C e o fluxo de gás carreador (H₂) foi de 2,5 mL/min (medido a 40°C). A identificação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos foi realizada por comparação dos tempos de retenção com padrões da NU CHEK (Elysian, MN) e a quantificação foi realizada por normalização

interna. A partir do perfil de ácidos graxos o índice de iodo e de saponificação foram calculados.

O teor de ácidos graxos livres nos óleos foi determinado por titulometria, de acordo com o método oficial Ca 5a 40 da AOCS (2009) e o resultado expresso como ácido oléico. A análise do índice de peróxidos (miliequivalentes de peróxido por 1000 g de amostra) foi realizada de acordo com o método Cd 8 53 da AOCS (2009). O índice de refração foi realizado em refratômetro Abbé Bausch e Lomb a 40°C e a densidade foi determinada em densímetro digital AP PAAR DMA-46 a 20°C.

3.3 Avaliação da atividade antioxidante

A capacidade antioxidante dos óleos foi avaliada através do método do seqüestro de radicais DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), proposto por Brand-Williams et al., 1995.

Uma alíquota de 100 µL de solução do radical livre DPPH (250 µM), diluído em metanol absoluto e 100 µL de uma das quatro concentrações (1; 10; 100 e 1000 µL/mL) de cada amostra foram homogeneizadas, sob agitação de 150 rpm. Após a homogeneização, as amostras foram incubadas à 30°C por 30 minutos. O hidroxitolueno butilado (BHT) é um composto antioxidante e foi utilizado como controle positivo do ensaio, nas mesmas concentrações utilizadas para as amostras, diluído em metanol absoluto.

A descoloração do DPPH foi determinada medindo a absorbância espectrofotométrica a 517 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata e os valores utilizados foram a média aritmética das três leituras, em leitor de microplacas Parkin Elmer EnVision.

As concentrações que obtivessem um percentual da atividade antioxidante total, maior ou igual a 50% ($AAT\% \geq 50\%$), foram consideradas antioxidantes para essa concentração do radical DPPH (RUFINO et al., 2007).

A AAT (%) foi calculada de acordo com LIEBENBERG (2004):

$$AAT (\%) = (Abs_{517nm} \text{ amostra} / Abs_{517nm} \text{ branco}) \times 100.$$

3.4 Quantificação de polifenóis

Os 3 extratos óleos foram diluídos individualmente em DMSO para que se obtivesse a concentração de 9,1 mg/mL.

Em placa de microtitulação de 96 poços, foram misturados 35 μ L de um dos óleos de *C. guianensis* com 35 μ L do reagente Folin-Ciocalteu, permanecendo protegidos da luz a 30⁰ por 5 min. Em seguida, 35 μ L de Na₂CO₃ (20 mg/mL) foram adicionados às misturas e as placas foram mantidas à 30°C em ambiente escuro por 2 h. Após esse período, foi realizada uma leitura de absorvância em comprimento de onda de 760 nm (leitor de microplacas Parkin Elmer EnVision). O ensaio foi realizado em triplicata e as médias das absorvâncias foram calculadas e utilizadas para se obter a absorvância corrigida, a partir das médias do branco das amostras.

A estimativa do teor total de polifenóis em % (massa/massa) foi feita em relação ao pirocatecol. Para a curva de calibração foram utilizadas as concentrações de 2,2, 5,5, 11, 22 e 33 μ g/mL de pirocatecol. Os coeficientes angular e linear da curva de calibração foram determinados e usados para se converter os valores de absorvância corrigida das frações para μ g/mL de pirocatecol, de acordo com a equação:

$$\text{Teor } (\mu\text{g/mL}) = (Abs - B) / A$$

onde:

$Abs = \text{absorv\^ancia corrigida}$

$A = \text{coeficiente angular da curva de calibra\c{c}\~ao do pirocatecol}$

$B = \text{coeficiente linear da curva de calibra\c{c}\~ao do pirocatecol.}$

Para o cáculo do teor total de polifenóis, foi usada a equação:

$\text{Teor total de polifenóis (\%)} = 100 \times \text{Teor (\mu g/ml)} / \text{Concentra\c{c}\~ao do óleo,}$

onde a concentração do óleo equivale à 9,1 mg/mL (Mazzafera, 2003; Bhale *et al.*, 2007).

3.5 Ensaio com modelo procarioto

3.5.1 Linhagens bacterianas

Seguindo modificações do método descrito por Maron e Ames (1983), foram utilizadas cinco linhagens do clone LT2 da bactéria *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium (TA97, TA98, TA100, TA102 e TA1535), deficientes na síntese do aminoácido histidina (*His*⁻), geneticamente modificados no *operon* da histidina, para detectar mutágenos diversos, que produzam padrões determinados de mutação, cujas características são mostradas na tabela 1.

A cepa TA97 apresenta uma mutação no *locus hisD6610*, identificando substâncias capazes de adicionar uma citosina (par C:G), ficando um sítio apurnico/apirimidnico (AP), que posteriormente é preenchido por G, através da ativação do reparo por via BER, alterando o quadro de leitura. A mutação induzida na cepa TA98 (deleção de par C:G) está localizada em um *hotspot* (8 repetições C:G) do *locus hisD3052*, importante para a síntese da enzima histidinol desidrogenase e essa

mutação detecta mutágenos capazes de realizar adição ou deleção do pares C:G. A mutação (substituição do par de base A:T por G:C) no *locus hisG46* da cepa TA100 e TA1535 substitui o aminoácido leucina por prolina, levando à deficiência na síntese de uma enzima importante na via da histidina. A cepa TA102 possui um par de bases extra no *locus hisG428*, o qual foi inserido com o plasmídeo pAQ1, conferindo também resistência à tetraciclina, sendo capaz de detectar mutações por substituição de pares A:T por C:G (Maron e Ames, 1983).

O gene *uvrB* é deletado nas cepas TA97, TA98, TA100 e TA1535, levando à deficiência no sistema de reparo por excisão de nucleotídeos, resultando em aumento da sensibilidade na detecção de mutágenos, além da deleção do sistema responsável pela síntese de biotina. Todas as cepas utilizadas possuem uma mutação no gene *rfa*, importante na síntese de lipopolissacarídeos (LPS), os quais se comportam como constituintes da parede celular de bactérias gram negativas, aumentando a permeabilidade à grandes moléculas. O plasmídeo pKM101 também é utilizado para elevação da sensibilidade bacteriana à possíveis substâncias teste. Este plasmídeo aumenta a sensibilidade do sistema na detecção de substâncias mutagênicas, através do aumento da via de reparo de DNA propenso a erro (*error-prone repair*) e seleciona bactérias resistentes à ampicilina (Maron e Ames, 1983).

Tabela 1 – Características genéticas das linhagens de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium.

Cepa	Mutação <i>His</i>	Plasmídeo	Outras mutações	Tipo de mutação detectada	
TA97	<i>hisD6610</i>	pKM101	<i>rfa</i> , Δ (<i>uvrB</i> <i>chl bio</i>)	Frameshift	Adição de G:C
TA98	<i>hisD3052</i>	pKM101	<i>rfa</i> , Δ (<i>uvrB</i> <i>chl bio</i>)	Frameshift	Adição ou deleção de G:C
TA100	<i>hisG46</i>	pKM101	<i>rfa</i> , Δ (<i>uvrB</i> <i>chl bio</i>)	Substituição	G:C por A:T
TA102	pAQ1	pKM101,	<i>Rfa</i>	Substituição	A:T por G:C

	(<i>hisG428</i>)	pAQ1		
TA1535	<i>hisG46</i>	<i>rfa,Δ(uvrB chl bio)</i>	Substituição	G:C por A:T

Legenda: Cada cepa apresenta mutação em loci gênicos diferentes, capazes de detectar diferentes tipos de mutágenos, indutores de alterações no quadro de leitura, substituições ou transversões.

Fonte: Adaptado de Mortelmans e Zeiger, 2000.

3.5.1.1 Checagem de fenótipos

Para verificar se as cepas utilizadas apresentam as características genéticas específicas que lhes conferem uma maior capacidade de detectar mutágenos, foi realizada uma bateria de testes capazes de verificar os aspectos fenotípicos, relativos à expressão do genótipo bacteriano. A essa bateria de testes, se dá o nome de checagem de fenótipos. Os procedimentos a seguir foram realizados de acordo com Maron & Ames (1983).

São verificadas características como: (a) presença da mutação no gene *rfa*, que aumenta a permeabilidade na parede de LPS, permitindo que moléculas de alto peso molecular atravessem a parede celular das bactérias; (b) a presença da mutação no gene *uvrB*, que conferiria um mecanismo de reparo por excisão de nucleotídeos (NER), através da resistência à radiação UVB; (c) a presença do plasmídeo pKM101, que confere resistência ao antibiótico ampicilina e aumenta a taxa de reparo propenso a erro (EPR); (d) a presença do plasmídeo pAQ1, que confere resistência ao antibiótico Tetraciclina e apresenta um domínio extra de mutação da histidina; (e) o requerimento de histidina e (f) biotina e, por fim, as taxas de mutação (g) espontânea e (h) induzida.

Para detectar a mutação *rfa*, 100µL das culturas bacterianas crescidas em meio Louria Bertani (5g/L de extrato de levedura; 10g/L de triptona; 10g/L de NaCl) (LB) a $1-2 \times 10^9$ células/mL foram dispersas em ágar nutriente, utilizando 2mL de ágar de superfície (7 g/L ágar; 5 g/L NaCl, 45 °C). Após a polimerização do ágar de

superfície, um disco de papel filtro estéril foi aplicado no centro da placa, 10µL de uma solução de Cristal Violeta (1 g/L) foi aplicada no papel e, após 18-24 horas, os resultados foram avaliados. Esperava-se observar um halo de inibição de cerca de 15 mm de diâmetro em todas as cepas portadoras dessa mutação.

Para detectar a mutação *uvrB*, foram realizadas estrias de cada linhagem em placas de LB, com auxílio de alças bacteriológicas descartáveis. Metade de cada placa foi coberta, deixando um lado da placa exposto à radiação UV (15W – germicida) à uma distância de 33 cm, por 8 segundos. Após a incubação por 18-24h, foi realizada a avaliação. Esperava-se observar o crescimento das linhagens na metade não irradiada e, na metade irradiada, apenas a TA102, portadora do sistema de reparo por excisão de nucleotídeos, deveria crescer.

Para detectar a resistência aos antibióticos ampicilina e tetraciclina, 100µL das culturas $1-2 \times 10^9$ células/mL foram colocadas em 10mL de LB na presença de 31,5µL de ampicilina (8 mg/mL) ou 2,5µL de tetraciclina (8 mg/mL). Esperava-se que as linhagens utilizadas fossem resistentes à ampicilina e sensíveis à tetraciclina, com exceção da TA102, que também era resistente ao último.

Para detectar o requerimento de histidina e biotina, foi realizada a incubação, em tubos de ensaio estéreis, de 100µL das culturas bacterianas crescidas em LB a $1-2 \times 10^9$ células/mL em: (a) ausência dos dois componentes, (b) na presença de histidina (0,1 M) ou (c) de biotina (0,5mM) e (d) na presença de ambos, diluídos a 10% em 2 mL de ágar de superfície. O ágar de superfície foi vertido em placas de ágar Vogel-Bonner 10X (10 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 100 g/L $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 500 g/L K_2HPO_4 ; 175 g/L $\text{Na}(\text{NH}_4)\text{HPO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) contendo 20 g/L de glicose (ágar VB – Meio mínimo). Esperava-se observar crescimento apenas nas placas em que há adição de histidina e biotina. Para a cepa TA102, haveria o crescimento nas placas que continham

histidina, sendo ausente a biotina, já que esta cepa não é auxotrófica para a síntese dessa vitamina.

Para verificar as taxas de reversão espontânea e induzida, cada linhagem bacteriana foi incubada a 37°C por 16 horas, em LB com ampicilina e tetraciclina (para TA102) até atingir a fase estacionária ($1-2 \times 10^9$ células/mL). Eram colocados, em um tubo de ensaio: 100 µL dessa suspensão bacteriana, 500 µL de tampão fosfato de sódio (0,2 M; pH 7,4) e 100 µL de DMSO (controle negativo) ou um controle positivo, específico para cada linhagem (tabela 2).

Tabela 2 – Controles Positivos utilizados no Teste de Ames e na checagem de fenótipos

Cepa	Sem metabolização (-S9)
TA97	4-Nitroquinolina-N-Óxido (CAS: 56-57-5) 1,0 µg/placa
TA98	4-Nitroquinolina-N-Óxido (CAS: 56-57-5) 1,0 µg/placa
TA100	Azida Sódica (CAS: 26628-22-8) 0,5 µg/placa
TA102	Mitomicina C (CAS: 50-07-7) 0,5 µg/placa
TA1535	Azida Sódica (CAS: 26628-22-8) 0,5 µg/placa

Legenda: Controles positivos (mutágenos) utilizados na checagem de fenótipo. Estão expressos os controles utilizados (nome usual e número CAS) e a dose utilizada, para cada linhagem, na ausência ou presença de metabolização exógena.

Fonte: Adaptado de Mortelmans e Zeiger, 2000.

Os tubos eram então incubados a 37°C por 20 minutos. Em seguida, 2 mL de ágar de superfície, contendo solução de histidina e biotina (10%) à 45 °C foi adicionado no tubo de ensaio e a mistura final foi vertida sobre uma placa de Petri de ágar Vogel-Bonner. Esta mistura final foi incubada a 37 °C por 72 horas e as unidades formadoras de colônias revertentes *His*⁺ foram contadas manualmente. Esperava-se obter um número de colônias revertentes dentro das seguintes faixas: apresentada na

tabela 3, tanto para o padrão espontâneo, quanto para o induzido, utilizando os mutágenos específico para cada linhagem, descritos na tabela 2.

Tabela 3 – Taxa de reversão espontânea das cepas utilizadas

Cepa	Reversão	
	[-]	[+]
TA97	80-215	>400
TA98	20-55	>100
TA100	100-240	>500
TA102	100-400	>800
TA1535	15-35	>80

Legenda: Taxas de reversão espontânea ([-]) e induzida por mutágenos específicos ([+]).
(Adaptado de MARON & AMES, 1983)

3.5.2 Ensaio de mutação reversa bacteriana (Ensaio de *Salmonella*/ microssoma ou Teste de Ames)

Cada linhagem bacteriana era incubada a 37°C por 16 horas, sob agitação em LB com tetraciclina e/ou ampicilina até atingir a fase estacionária ($1-2 \times 10^9$ células/mL). Eram colocados, em um tubo de ensaio: 100 µL dessa suspensão bacteriana, 500 µL de tampão fosfato de sódio (0,2 M; pH 7,4) e 100 µL de uma das concentrações das amostras diluídas em DMSO (1/5000; 1/1000; 1/500; 1/100 e 1/50 para o óleo B ou 1/32; 1/16; 1/8; 1/4; 1/2 e puro para os óleos A e S), ou controles positivo (de acordo com cada linhagem na ausência de metabolização) ou controle negativo (DMSO).

Os tubos eram então incubados a 37°C por 20 minutos. Em seguida, 2 mL de top ágar contendo solução de histidina e biotina (10%) à 45 °C foi adicionado no tubo de ensaio e da mistura final foi vertida sobre uma placa de Petri de ágar Vogel-Bonner. Esta mistura final foi incubada a 37 °C por 72 horas e as unidades formadoras de colônias revertentes *His*⁺ foram contadas manualmente. A amostra foi considerada

positiva/mutagênica quando: (a) o número de revertentes no ensaio foi, pelo menos, duas vezes maior que o número de revertentes espontâneos (observados no controle negativo), gerando um índice de mutagenicidade maior ou igual a dois, ($IM \geq 2$), (b) houve comportamento dose-resposta e (c) significância estatística.

Os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos duas vezes. Os resultados foram analisados por *one-way* ANOVA, seguido do pós-teste correlativo de Tukey, a fim de determinar diferenças estatísticas significantes ($p \leq 0,01$) (OECD, 1997; Aiub et al., 2004; Stankevicius et al., 2008).

3.5.3 Ensaio de sobrevivência bacteriana

As avaliações quantitativas foram feitas para determinar os efeitos citotóxicos dos óleos de andiroba. No ensaio, 10 μ L da suspensão bacteriana tratada como descrito para o Teste de Ames foi diluída em microtubos contendo uma solução salina 0,9% (NaCl 9 g/L), sendo realizada uma diluição seriada onde a diluição final foi 10^{-7} . Em seguida, 100 μ L da mistura foram colocados em uma placa de Petri com ágar LB e espalhados com auxílio de pérolas de vidro. Estas placas foram incubadas a 37°C por 24 h. As colônias foram contadas manualmente e um cálculo percentual foi feito em relação ao controle negativo. Foram consideradas concentrações citotóxicas aquelas onde o percentual de sobrevivência foi menor que 70%, em relação ao controle negativo, e onde houve diferença estatística significativa. Os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos duas vezes. Os resultados foram analisados por *one-way* ANOVA, seguido do pós-teste correlativo de Tukey, a fim de determinar diferenças estatísticas significantes ($p \leq 0,01$) (OECD, 1997; Aiub et al., 2004; Stankevicius et al., 2008).

3.6 Ensaio com modelo eucarionte

3.6.1 Linhagem celular CHO-K1

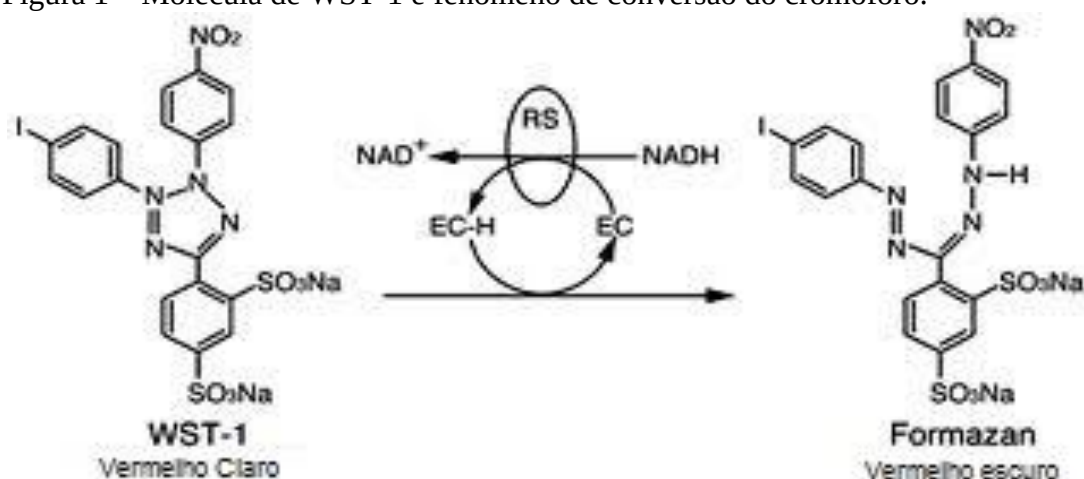
A linhagem CHO-K1, oriundas do epitélio germinativo do ovário de hamster chinês (*Cricetulus griseus*), utilizada no presente estudo, foi gentilmente cedida pelo Dr. Júlio Scharfstein, responsável pelo Laboratório de Imunologia Molecular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, e mantidas no Laboratório de Mutagênese Ambiental pelo Ms. Carlos Fernando Araujo-Lima.

3.6.2 Ensaio de viabilidade celular com WST-1

O ensaio de viabilidade celular com WST-1 (*Water Soluble Tetrazolium One*) (Roche) é um ensaio colorimétrico para a quantificação não-radioativa da proliferação e viabilidade celular e citotoxicidade, alternativo ao uso do ensaio de incorporação de [³H]-timidina (timidina tritiada). Sua finalidade é permitir que sais de tetrazólio sejam reduzidos em cristais hidrossolúveis de formazan, através da atividade das desidrogenases mitocondriais dependentes de NADH (figura 1). Foi seguido o protocolo descrito pelo fabricante (ROCHE, 2006) para determinar as condições ótimas de experimentação e para realização dos experimentos.

A linhagem de célula CHO-K1 foi utilizada a partir de culturas com 90-95% de confluência. A população de células viáveis é ajustada para que se tenha 10⁵ células/mL. Dessa suspensão de células são pipetados 100µL onde se tem uma população de 10⁴ células. As placas foram colocadas numa incubadora com uma atmosfera de CO₂ 5%, a 37 °C *overnight* para garantir a adesão das células ao substrato.

Figura 1 – Molécula de WST-1 e fenômeno de conversão do cromóforo.



Legenda: A conversão do substrato WST-1, pela atividade das desidrogenases mitocondriais dependentes de NADH, em um cristal solúvel de formazan vai gerar uma mudança na coloração do cromóforo, que pode ser mensurada através de espectrofotometria.

Fonte: Adaptado de ROCHE, 2006.

Após essa etapa, o meio foi retirado e foram adicionados 90µL de meio de cultura fresco. Para o tratamento das células, 10 µL de cinco concentrações (0,50; 1,00; 5,00; 10,00; 50,00; 100,00 µL/mL) dos 3 extratos oleosos foram adicionados, equivalendo a 10% do volume total (pois o DMSO pode ser tóxico para células, em altas concentrações) e as placas foram incubadas durante 3 horas ou 24 horas.

Passado o tempo de exposição, o meio de cultura foi removido, as culturas foram lavadas com PBS duas vezes e 90µL de meio fresco suplementado, foram adicionados. Foram colocados 10µL do reagente WST-1, ao abrigo da luz, e o sistema de reação foi incubado a 37 °C, com umidade de 5% de CO₂ por 120 minutos (HepG2) ou 180 minutos (CHO-K1) para que ocorresse a redução do sal de tretazólio.

Os controles do ensaio foram o branco (ausência de células), negativo (células e meio de cultura) e solvente (DMSO 5% do volume final). Após a incubação, as placas foram lidas em espectrofotômetro de microplacas, no comprimento de onda de 440nm. O percentual de sobrevivência foi calculado pela razão entre as absorvâncias obtidas no solvente e nas amostras. Os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos duas vezes. Os resultados foram analisados por *one-way* ANOVA, seguido do pós-teste correlativo de Bonferroni, a fim de determinar diferenças estatísticas significantes ($p \leq 0,01$).

4. RESULTADOS

4.1 Rendimento, perfil de ácidos graxos e características dos óleos

O rendimento de óleo do processo de prensagem das sementes secas sem autoclavagem (óleo B) e com autoclavagem (óleo A) foram de 14,85% e 20,62% (base seca), respectivamente (tabela 4). Como a extração por Soxhlet (óleo S) apresentou rendimento de 61,50% (base seca), indica que a extração por prensa foi incompleta e que o processo pode ser otimizado, mas também que se trata de uma matéria-prima de difícil manipulação por ser de aspecto “borrachento”. A autoclavagem melhorou o rendimento indicando que o tratamento térmico é necessário para desnaturar estrutura celular para remoção de óleo. O rendimento do soxhlet indica extração completa ou o valor teórico. O valor está expresso em base seca porque o material estava seco. É possível expressar em base úmida a partir da umidade do material.

Para efeito de atividade biológica, os óleos obtidos podem apresentar diferenças, pois no Soxhlet podem ser extraídos diversos compostos ou aumentar ou diminuir a quantidade de princípios ativos extraídos junto com óleo, em virtude da

polaridade do solvente. Quanto á prensa, o mesmo pode ocorrer tanto em relação a estes princípios ativos quanto pela desnaturação protéica que pode mudar as classes de compostos transferidos ao óleo e suas quantidades.

A tabela 1 apresenta os resultados de composição em ácidos graxos dos óleos obtidos. Os resultados são semelhantes entre os processos de extração utilizados. As diferenças observadas são discretas. São observados altos teores de ácidos graxos saturados (C16:0 e C18:0) e baixo de ácidos polinsaturados (C18:2 e C18:3), sendo favorável do ponto de vista da estabilidade oxidativa. O perfil é útil na avaliação de adulteração.

Tabela 4. Composição em ácidos graxos dos óleos de andiroba

Ácido Graxo	Óleo bruto obtido por prensagem		Óleo obtido por prensagem de semente autoclavada		Óleo obtido por extração em solvente Soxhlet	
	Média (g/100g)	INC EXP	Média (g/100g)	INC EXP	Média (g/100g)	INC EXP
C14:0	0,05	zero	0,05	0,002	0,05	zero
C16:0	27,71	0,041	27,50	0,102	28,33	0,321
C16:1	0,90	0,003	0,89	0,002	0,94	0,013
C17:0	0,12	0,003	0,12	0,003	0,13	0,003
C18:0	9,34	0,018	9,52	0,005	9,09	0,066
C18:1	49,90	0,030	49,71	0,065	49,56	0,194
C18:2	9,58	0,025	9,82	0,029	9,62	0,033
C20:0	1,43	0,005	1,43	0,007	1,38	0,030
C18:3	0,26	0,004	0,27	0,003	0,23	0,003
C20:1	0,13	0,008	0,13	0,007	0,13	0,011
C22:0	0,36	0,003	0,35	0,007	0,35	0,009
C24:0	0,22	0,010	0,22	0,005	0,21	0,005

INC EXP = Incerteza experimental = 4,53 multiplicado pelo DP dividido pela raiz de n (3) repetições.

Tabela 5. Características do óleo de andiroba

Análises	Óleo B	Óleo A	Óleo S
Acidez (% de ácido oleico)	0,30	0,28	0,24
Peróxidos (meq/kg)	0,97	0	0
Refração (nD 40°C)	1,4595	1,4603	1,4593
Densidade (g/cm ³)	0,9174	0,9183	0,9169

Não há diferença quanto à densidade obtida (tabela 5) que seria esperado já que compostos menores influenciam pouco na densidade do óleo. Quanto ao índice de refração, o maior valor obtido para o óleo da andiroba autoclavada é compatível com o maior teor de ácido linoléico desta amostra. A acidez foi baixa, indicando que não houve hidrólise enzimática que seria esperada para amostras úmidas ou a coleta ocorreu logo após ouriço cair da árvore e a semente foi congelada rapidamente. O nível de oxidação inicial é baixo indicando que o tratamento das sementes foi adequado de modo a preservar o óleo.

4.2 Atividade Antioxidante

Na figura 2 abaixo, pode ser observado que na maior concentração testada (100 µL/mL), o óleo B e A apresentaram índices de seqüestro próximos a 50,87 e 46,16%, sendo iguais estatisticamente ao BHT, além de apresentarem um comportamento dose-dependente entre suas concentrações. O óleo S apresentou índice de seqüestro mais baixo que os outros, 29,04%.

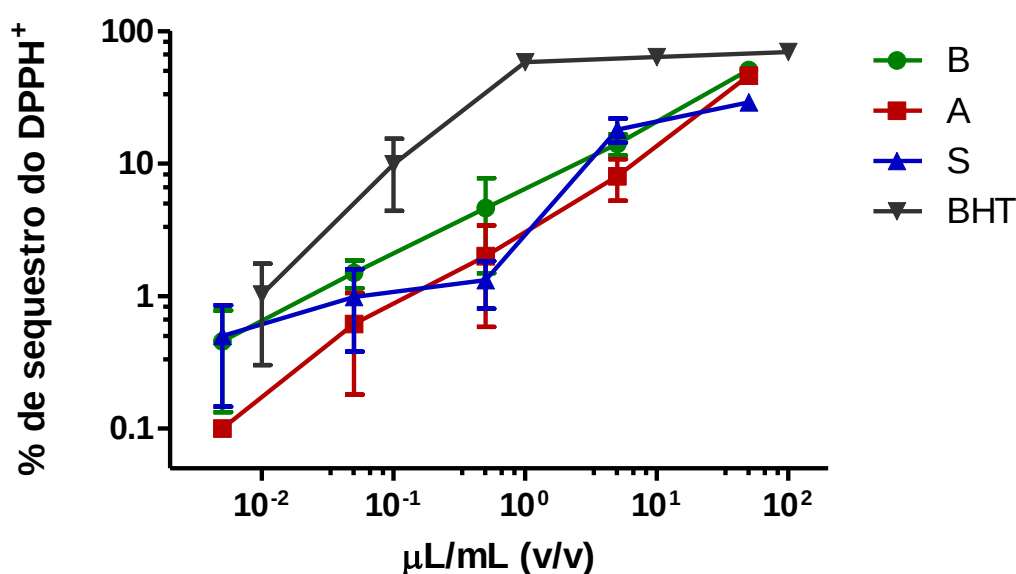


Figura 2: Avaliação da atividade antioxidante de 3 óleos de andiroba: óleo da semente prensada (B), óleo da semente autoclavada e prensada (A) e óleo da semente extraído em Soxhlet com éter de petróleo.

4.3 Quantificação de polifenóis

De acordo com a curva de calibração obtida do pirocatecol, os valores dos coeficientes angular e linear foram 0,0119 e 0,0059 respectivamente. Os valores da média das absorbâncias foram: 1,125 para o óleo B, 0,986 para o óleo A e 0,990 para o óleo S. A partir dos coeficientes angular e linear, dos valores das médias de absorbâncias e da concentração utilizada dos óleos de *C. guianensis* (9,1 mg/mL), foi calculado a porcentagem de polifenóis totais em cada amostra. Os óleos apresentaram um equivalente de $10,34 \pm 0,014$ mg/g de pirocatecol para o óleo B e $9,05 \pm 0,02$ mg/g para os óleos A e S, não havendo diferença significativa entre eles.

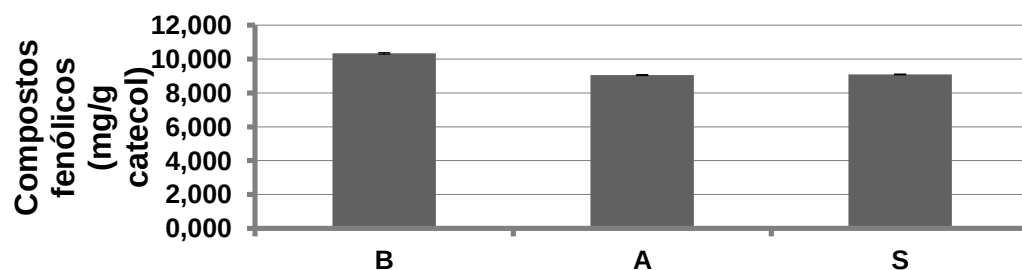


Figura 3: Conteúdo total de polifenóis em 3 óleos de andiroba: óleo da semente prensada (B), óleo da semente autoclavada e prensada (A) e óleo da semente extraído em Soxhlet com éter de petróleo (S). Não houve diferença significativa entre os resultados utilizando o teste de Tukey (0,05).

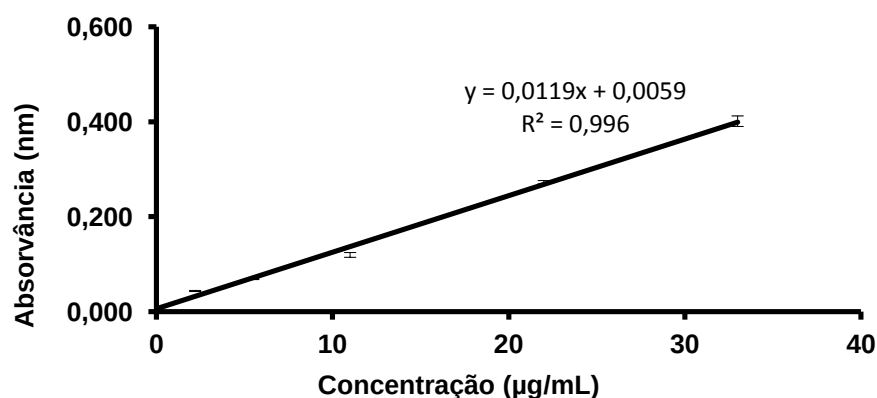


Figura 4: Linha de tendência pirocatecol.

4.4 Teste de Ames/Sobrevivência

Nenhum dos óleos testados apresentou resposta mutagênica nas concentrações utilizadas para nenhuma das cinco cepas. No entanto, o óleo B se mostrou citotóxico para TA97, TA102 e TA1535. O óleo A e o óleo S mostraram-se citotóxicos apenas para a cepa TA1535.

As concentrações do óleo B foram menores que as concentrações dos outros dois óleos, pois utilizando-se concentrações mais altas, não havia sobrevivência das colônias (dado não mostrado).

Tabela 6: Avaliação da mutagenicidade e citotoxicidade do óleo bruto (B) de semente de andiroba.

Óleo B	Diluição óleo/DMSO (v/v)	-S9		
		Média ± DP	I.M.	% Sobr
TA97	DMSO	67.0 ± 0.0	1.0	100.0
	1/5000	92.0 ± 8.5	1.3	100.00
	1/1000	89.0 ± 13.1	1.3	100.0
	1/500	72.7 ± 10.1	1.0	77.8
	1/100	81.7 ± 9.3	1.2	100
	1/50	83.0 ± 11.3	1.2	34.8
TA98	DMSO	41.3 ± 9.1	1.0	100.0
	1/5000	41.0 ± 12.2	0.9	100.0
	1/1000	36.0 ± 7.0	0.8	100.0
	1/500	44.7 ± 0.6	1.0	100.0
	1/100	41.0 ± 3.5	0.9	99.7
	1/50	39.7 ± 6.0	0.9	100.0
TA100	DMSO	118.0 ± 28.0	1.0	100.0
	1/5000	168.0 ± 18.4	1.4	100.0
	1/1000	180.0 ± 13.0	1.5	97.6
	1/500	190.0 ± 19.1	1.6	95.0
	1/100	172.0 ± 28.2	1.4	85.1
	1/50	148.0 ± 18.0	1.2	72.1
TA102	DMSO	428 ± 16.3	1.0	100.0
	1/5000	429 ± 9.2	1.0	83.7
	1/1000	443 ± 39.6	1.0	82.6
	1/500	462 ± 12.0	1.0	75.1
	1/100	430 ± 24.0	1.0	63.8
	1/50	445 ± 58.9	1.0	12.7
TA1535	DMSO	14.0 ± 4.6	1.0	100.0
	1/5000	16.3 ± 1.5	1.1	78.1
	1/1000	14.7 ± 2.6	1.0	61.1
	1/500	11.7 ± 2.1	0.8	60.0
	1/100	11.7 ± 1.1	0.8	41.5
	1/50	10.7 ± 6.0	0.7	18.0

Legenda: DP = desvio padrão. IM = índice de mutagenicidade. Sobr = Sobrevivência. Controles positivos sem S9: 4-nitroquinolino-N-óxido (4-NQO) (1,0µg/placa) para TA97, 186±17 revertentes, e TA98 100±10 revertentes; Azida Sódica (AS) (1.0 µg/placa) para TA100, 607±56 revertentes; Mitomicina C (MMC) (0.5 µg/placa) para TA102, 2968±34 revertentes; Metilmetano Sulfonato (MMS) (50µg/placa) para TA1535, 100±10 revertentes.

Tabela 7: Avaliação da mutagenicidade e citotoxicidade do óleo prensado autoclavado (A) de semente de andiroba.

Óleo A	Diluição óleo/DMSO (v/v)	-S9		
		Média ± DP	I.M.	% Sobr
TA97	DMSO	92.7 ± 2,52	1.0	100.0
	1/32	92.7 ± 9.71	1.0	91.7
	1/16	104.7 ± 9.07	1.1	99.4
	1/8	103.7 ± 15.0	1.1	100.0
	½	99.0 ± 6.24	1.0	100.0
	¼	96.3 ± 7.02	1.0	92.1
	Bruto	92.7 ± 9.71	1.0	100.0
TA98	DMSO	37.0 ± 10.4	1.1	100.0
	1/32	37.0 ± 10.4	1.1	100.0
	1/16	40.0 ± 6.24	1.2	100.0
	1/8	33.5 ± 4.95	1.0	100.0
	½	47.0 ± 4.24	1.5	100.0
	¼	41.3 ± 3.06	1.3	100.0
	Bruto	31.4 ± 7	1.0	100.0
TA100	DMSO	146.0 ± 32.7	1.0	100.0
	1/32	152.0 ± 18.7	1.0	73.6
	1/16	164.0 ± 16.0	1.1	86.0
	1/8	131.0 ± 21.9	0.9	100.0
	½	176.0 ± 14.2	1.2	100.0
	¼	179.0 ± 17.1	1.2	100.0
	Bruto	148.0 ± 7.09	1.0	59.2
TA102	DMSO	358.0 ± 2.83	1.0	100.0
	1/32	267,5 ± 33.2	0.7	56.9
	1/16	289.0 ± 55.7	0.8	85.8
	1/8	262.7 ± 105.0	0.7	71.1
	½	290.7 ± 44.5	0.8	100.0
	¼	280.3 ± 50.0	0.7	83.8
	Bruto	388.0 ± 50.2	1.0	100.0
TA1535	DMSO	12.3 ± 4.04	1.0	100.0
	1/32	13.0 ± 2.83	1.0	89.2
	1/16	12.0 ± 1.41	0.9	54.1
	1/8	14.5 ± 4.95	1.1	41.3
	½	16.7 ± 4.16	1.3	83.8
	¼	10.0 ± 4,24	0.8	69.8
	Bruto	15.3 ± 4.16	1.2	100.0

Legenda: DP = desvio padrão. IM = índice de mutagenicidade. Sobr = Sobrevivência. Controles positivos sem S9: 4-nitroquinolino-N-óxido (4-NQO) (1,0µg/placa) para TA97, 186±17 revertentes, e TA98 100±10 revertentes; Azida Sódica (AS) (1.0 µg/placa) para TA100, 607±56 revertentes; Mitomicina C (MMC) (0.5 µg/placa) para TA102, 2968±34 revertentes; Metilmetano Sulfonato (MMS) (50µg/placa) para TA104, 100±10 revertentes.

Tabela 8: Avaliação da mutagenicidade e citotoxicidade do óleo extraído por Soxhlet (S) de semente de andiroba.

Óleo S	Diluição óleo/DMSO (v/v)	-S9		
		Média ± DP	I.M.	% Sobr
TA97	DMSO	92.7 ± 2.52	1.0	100.0
	1/32	77.3 ± 16.1	0.8	86.8
	1/16	75.7 ± 9.29	0.8	75.2
	1/8	74.3 ± 3.51	0.8	76.6
	½	90.7 ± 5.69	0.9	90.4
	¼	93.3 ± 5.13	1.0	96.6
	Bruto	74.0 ± 17.3	0.8	84.1
TA98	DMSO	31 ± 9.54	1.0	100.0
	1/32	28.7 ± 11.9	0.9	100.0
	1/16	33.0 ± 3.61	1.0	100.0
	1/8	45.0 ± 22.7	1.4	100.0
	½	30.7 ± 3.07	0.9	100.0
	¼	113.0 ± 83.5	1.1	100.0
	Bruto	30.3 ± 4.93	0.9	100.0
TA100	DMSO	132.0 ± 10.8	1.0	100.0
	1/32	131.0 ± 18.1	0.9	100.0
	1/16	138.0 ± 17.3	1.0	100.0
	1/8	129.0 ± 29.9	0.9	100.0
	½	119.0 ± 32.9	0.9	100.0
	¼	130.0 ± 27.0	0.9	100.0
	Bruto	108.0 ± 6.24	0.8	100.0
TA102	DMSO	363.0 ± 8.89	1.0	100.0
	1/32	267,5 ± 33.9	0.7	100.0
	1/16	289.0 ± 65.8	0.7	73.6
	1/8	259.3 ± 22.0	0.7	92.9
	½	258.5 ± 21.9	0.7	89.3
	¼	365.3 ± 46.2	1.0	94.9
	Bruto	388.0 ± 18.0	1.0	100.0
TA1535	DMSO	10.5 ± 3.54	1.0	100.0
	1/32	12.3 ± 0.58	1.1	59.8
	1/16	11.0 ± 2.0	1.3	56.3
	1/8	11.0 ± 2.0	1.1	46.1
	½	11.0 ± 2.0	1.0	18.9
	¼	11.0 ± 2.65	1.0	54.6
	Bruto	12.5 ± 3.54	1.1	100.0

Legenda: DP = desvio padrão. IM = índice de mutagenicidade. Sobr = Sobrevivência. Controles positivos sem S9: 4-nitroquinolino-N-óxido (4-NQO) (1,0µg/placa) para TA97, 186±17 revertentes, e TA98 100±10 revertentes; Azida Sódica (AS) (1.0 µg/placa) para TA100, 607±56 revertentes; Mitomicina C (MMC) (0.5 µg/placa) para TA102, 2968±34 revertentes; Metilmetano Sulfonato (MMS) (50µg/placa) para TA104, 100±10 revertentes.

4.5 Mensuração da viabilidade e proliferação celular de CHO-K1

Na figura 5, pode ser observado que os óleos testados apresentaram comportamento dose-dependente. Foi definida, como limite para citotoxicidade, a sobrevivência de 80% para CHO-K1. Assim, no período de 3h de exposição, os 3 óleos foram citotóxicos em todas as concentrações das diluições óleo/DMSO (v/v), exceto até 5 $\mu\text{L/mL}$ para os óleos B e A e 1 $\mu\text{L/mL}$ para o óleo S.

Para o período de 24h de exposição, apenas a menor concentração, 0.5 $\mu\text{L/mL}$, do óleo 3 não apresentou efeitos citotóxicos para as células.

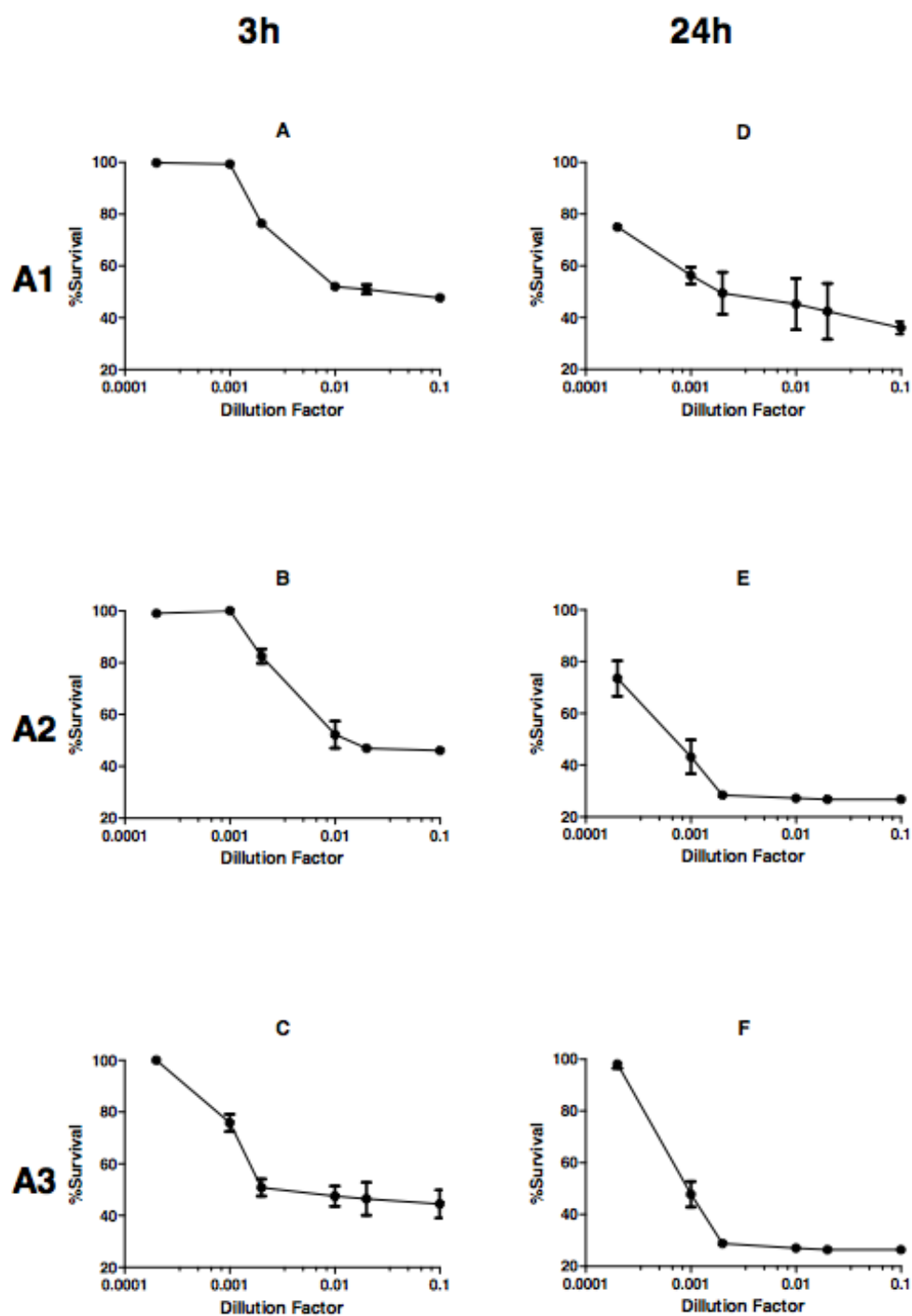


Figura 5: Avaliação da viabilidade celular de CHO-K1 em 3h e 24h de exposição aos 3 óleos de andiroba: óleo da semente prensada (A1), óleo da semente autoclavada e prensada (A2) e óleo da semente extraído em Soxhlet com éter de petróleo (A3).

5. DISCUSSÃO

O método de avaliação da atividade antioxidante direta pelo sequestro do radical DPPH foi utilizado por se tratar de um método rápido e eficaz para detecção

de espécies químicas capazes de reduzir radicais livres diretamente, sem a influência de respostas metabólicas, através de propriedades químicas sequestrantes de algumas estruturas. Este é um método considerado um ensaio sensível e independente da polaridade do substrato (Ani *et al.*, 2006).

Diversos estudos apontam uma estreita relação entre a produção de compostos fenólicos e a atividade antioxidante apresentada por espécies vegetais (Maizura *et al.*, 2011), embora esta propriedade possa estar sendo exercida por outros metabólitos (Niki, 2011). A quantificação de polifenóis totais realizada no presente estudo está de acordo com os dados observados pelos autores citados, já que em maiores concentrações houve maior atividade antioxidante.

O uso do modelo de mutação reversa bacteriana e mensuração de viabilidade celular utilizadas foram baseadas em recomendações feitas por agências reguladoras internacionais, como o FDA e a OECD para a avaliação da segurança de um potencial fármaco, fitoterápico ou cosmético. Esses processos são fundamentais para a detecção de possíveis carcinógenos, já que existe uma alta correlação entre os índices de mutagenicidade detectados nesse modelo e o risco relativo de carcinogenicidade de compostos (OECD, 1997; FDA, 2008, 2013).

Observando-se os valores resultados dos experimentos, não foi observada mutagenicidade para nenhum dos óleos, embora tenha sido possível verificar elevada citotoxicidade dos 3 óleos para a TA1535 e alguns pontos de citotoxicidade para TA102.

Como dito anteriormente, a mutação *hisG46* em TA1535 e TA100 ocorre no gen *hisG*, que codifica a primeira enzima da biossíntese de histidina. Esta mutação substitui C-G por A-T. Sendo assim estas cepas detectam mutágenos que causam metilações e substituições de pares de base G-C (Maron e Ames, 1983).

TA1535 possui frequência de reversão consideravelmente mais baixa que a TA100, sendo mais conveniente para a detecção de mutágenos que não reverterem a TA100.

A linhagem TA102 possui uma mutação no locus *hisG428*, ou seja, possui o par de base A-T no local crítico da reversão, identificando mutações por substituição de pares de bases G-C por A-T. Esta linhagem também sofre reversão por mutágenos capazes de induzir dano oxidativo e a manutenção do seu sistema de reparo por excisão de nucleotídeos (gene *uvrB chl bio*) permite a detecção de agentes cross-linking (Maron e Ames, 1983).

Esses dados levam a crer que os 3 óleos possuem um ou mais compostos, que na ausência de um sistema de metabolização, possui caráter citotóxico para a TA1535, e que este(s) composto(s) está em maior quantidade no óleo B, levando em conta suas menores concentrações nos experimentos e, ainda assim, apresentando menores porcentagens de sobrevivência das bactérias.

É importante ressaltar que baixas taxas de sobrevivência podem mascarar uma possível mutagenicidade do composto, devido a morte das bactérias.

Os ensaios indiretos de mensuração da viabilidade celular, através da redução de sais de tetrazólio pela atividade de enzimas desidrogenases mitocondriais evitam o uso de técnicas radioativas, reduzindo riscos durante o decorrer do experimento.

Para os estudos de toxicidade aguda, citotoxicidade órgão-específica e toxicogenômica, podem ser utilizadas culturas primárias de explantes teciduais de animais, mas também são frequentemente utilizadas culturas permanentes, como células CHO-K1 (Ovário de Hamster Chinês), V79 (fibroblastos de pulmão de Hamster Chinês), Células HepG2 (Hepatocarcinoma Humano), e MCL-5 (linhagem linfoblastóide humana) para a avaliação de danos provocados por agentes químicos.

O uso de linhagem de células permanentes é indicado, pois seu comportamento é mais uniforme e a reprodutibilidade dos ensaios é maior. As linhagens CHO-K1 e V79 são amplamente usadas em estudos de genotoxicidade e seus protocolos de testagem foram validados por estudos multicêntricos sob orientação da OECD (Von Der Hude *et al.*, 2000; Aardema *et al.*, 2006).

O uso de células ovarianas pode ser uma importante ferramenta para a detecção de compostos capazes de causar danos ao sistema reprodutor e contaminantes emergentes causadores de atividade desreguladora endócrina.

Os 3 óleos se mostraram tóxicos para CHO-K1 em quase todas as concentrações, exceto nas concentrações mais baixas do experimento.

Apesar da toxicidade *in vitro* vista neste estudo, outro estudo reportou que, quando o óleo de andiroba é utilizado na alimentação de ratas Wistar prenhas (0.375 - 3.0 g/ kg, do 7º ao 14º dia de gestação), não é verificada nenhum tipo de alteração clínica na saúde da rata ou de seus fetos em relação ao grupo controle (Costa-Silva *et al.*, 2007).

Em outro estudo, doses subagudas de óleo de andiroba por um período prolongado (0.375 - 1.50 g/ kg, por 30 dias) causaram alteração nos níveis de alanina aminotranferase (aumento de 30%) e aumento da massa do fígado, indicando possível toxicidade (Costa-Silva *et al.*, 2008). Entretanto, é importante levar em consideração que o óleo utilizado nesse estudo citado foi extraído com n-hexano, podendo haver resquícios do solvente no óleo que causaram as alterações hepáticas.

Compostos como triterpenos, tetraterpenos, alcalóides e limonóides, que são característicos de todos os membros da família Meliaceae, já foram isolados de *Carapa guianensis* (Connolly *et al.*, 1966, Banerji and Nigam, 1984, Pereira *et al.*, 1999, Andrade *et al.*, 2001 and Qi *et al.*, 2004). Apesar das similaridades dos

compostos químicos entre as espécies, o óleo da andiroba não apresentou efeitos tóxicos para as células do sistema reprodutivos estudadas, ao contrário de uma espécie próxima, o Nim, que apresentou problemas embriogênicos em ratas Wistar (Pillai and Santhakumari, 1984 and Srivastava and Raizada, 2001). A andiroba possui grande quantidade de limonóides em suas sementes e parte dos créditos de suas características terapêuticas já citadas se devem a eles (Henriques e Penido, 2014) . Por outro lado, plantas da mesma família que possuem também grandes quantidades de limonóides podem ser letais ao ser humano, como é o caso de *Melia Azedarach*, que possui diversos casos de envenenamento pós ingestão de seus frutos ou infusão de partes da planta (Phua *et al.*, 2008). Apesar de não se saber ao certo qual limonóide é responsável pela toxicidade ao humano, alguns já isolados e testados em porcos se comportaram como toxina (Ahn e Lee, 1994; Takeya *et al.*, 1996).

Seguindo o modelo procarioto, que foi feito na ausência de metabolização, as células CHO-K1 possuem baixa atividade metabólica, ao contrário de células como a HepG2, que possui alta atividade metabólica. Os dados indicam que, na situação de células de baixo metabolismo, os óleos se mostram tóxico. Assim, faz-se necessário investigação sobre como células de taxa metabólica mais elevada se comportariam na presença desses óleos, assim como as bactérias testadas.

6. CONCLUSÃO

- Os três óleos apresentaram perfil oléico e propriedades físicas semelhantes. Apesar disso, houve algumas respostas diferentes entre os óleos.
- Os óleos B e A apresentaram características antioxidantes, enquanto o óleo S apresentou essa característica menos acentuada em relação aos dois primeiros.

- Não foi verificada resposta mutagênicas no teste de Ames sem metabolização exógena. O óleo B apresentou mais pontos de citotoxicidade (TA97, TA102 e TA1535) enquanto os óleos A e S apresentaram citotoxicidade apenas para TA1535, podendo esta citotoxicidade estar mascarando com a morte celular um possível resposta mutagência.

- Os 3 óleos se mostraram citotóxicos no teste de mensuração de viabilidade celular em células CHO-K1 no período 3h e 24h.

Tendo em vista estes resultados, faz-se necessário o aprofundamento da avaliação toxicológica dos óleos de andiroba, afim de verificar qual forma de extração é mais eficiente para as indicações terapêuticas, causando o menor risco possível para a saúde, e a verificação de possíveis efeitos protetores tendo em vista a propriedade antioxidante.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARDEMA, M. J. et al. SFTG international collaborative study on in vitro micronucleus test III. Using CHO cells. *Mutat. Res.* 607, 61–87, 2006.

AIUB, C. A. F. et al. Genotoxic evaluation of a vinifera skin extract that present pharmacological activities. *Food Chem Toxicol.* 42, 969-973, 2004.

AHN, J. CHOI S, LEE C. Cytotoxic limonoids from *Melia azedarach* var. Japonica. *Phytochemistry.* 36:1493–1496, 1994.

AMARAL, L. F. G.; FIERRO, I. M. Profile of medicinal plants utilization through patent documents: the andiroba example. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 23(4):716-719, 2013.

AMERICAN OIL CHEMIST'S SOCIETY - AOCS. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society. Champaign: AOCS press, 2009.

AMES B. N.; YAMASAKI E. The detection of chemical mutagens with enteric bacteria, em *Chemical Mutagens: Principles and Methods for their detection*, Hollander, A, Cap. 9, Ed., New York, Plenum Press. 1971.

ANDRADE, E. H. et al. Volatiles from the leaves and flowers of *Carapa guianensis* Aubl. *Journal of Essential Oil Research*, 13 (6), pp. 436-438, 2001.

ARENCIBIA ARREBOLA, D. F. et al. Potencial genotóxico del extracto oleoso de la semilla de *Carapa guianensis* Aublet para inducir anomalías en la morfología de la cabeza del espermatozoide. *Revista Internacional de Andrologia*. 11(2): 54-59, 2013.

BANERJI, B.; NIGAM, S. K. *Fitoterapia*. 55, pp. 3-36, 1984.

CARPES R. M. et al. Mutagenicity, genotoxicity and scavenging activities of extracts from the soft coral *Chromonephthea braziliensis*: a possibility of new bioactive compounds Toxicological studies of extracts of *C. braziliensis*. *Gen. Mol. Res.* 12: 3575-3587, 2013.

CLAXTON, L. D. The development, validation and analysis of Salmonella mutagenicity the methods for environmental situation em: Microscale testing in aquatic toxicology: advances, techniques and practice. 1997.

CLOUTIER, D. et al. Impact of selective logging on inbreeding and gene dispersal in an Amazonian tree population of *Carapa guianensis* Aubl. *Molecular Ecology*. 16:797–809, 2007.

COMPALATI, E. et al. Systematic review on the efficacy of fexofenadine in seasonal allergic rhinitis: a meta-analysis of randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trials. *Int Arch Allergy Immunol*, 156(1): 1-15, 2011.

CONNOLLY, J. D. et al. Grandifolione: A novel tetranortriterpenoid. *Chemical Communications (London)*, (23), pp. 867-868, 1966.

COSTA-SILVA, J. H. et al. Toxicological reproductive study of *Carapa guianensis* Aublet (Andiroba) in female Wistar rats. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 25 (3), pp. 425-428, 2007.

COSTA-SILVA, J. H. et al. Acute and subacute toxicity of the *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae) seed oil. *J Ethnopharmacol*. 116: 495-500, 2008.

FDA. Guidance on Genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use, 2008.

FDA. Use of International Standard ISSO-10993 “Biological Evaluation of Medical Devices Part 1: Evaluation and Testing”, 2013.

FOURNIER, L. A. Species description *Carapa guianensis*. In: VOZZO, J. A., eds. *Tropical Tree Seed Manual. Agricultural Handbook*, 721. USDA Forest Service, Washington DC. 2003.

FREIRE, D. C. B. et al. Efeito dos óleos vegetais de andiroba (*Carapa* sp.) e copaíba (*Copaifera* sp.) sobre forídeo, pragas de colméias, (Diptera: Phoridae) na amazônia central. *Acta Amazônica* 36:365 – 368, 2006.

HARTMAN, L.; LAGO, R.C.A. A rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Laboratory Practice* 22 (8) p.475-476, 1973.

HENRIQUES, M.; PENIDO, C. The Therapeutic Properties of *Carapa guianensis*. *Current pharmaceutical design*, 20(6): p. 850-856, 2014.

KLAASSEN, C. D. Casarett & Doull's Toxicology – The basic science of poisons. 8 Ed. McGraw-Hill, 2013.

LAVIE, D. et al. The constituents of *Carapa guianensis* Aubl and their biogenetic relationship. *Bioorg. Chem.*, 2: 59–64. 1972.

LIEBENBERG, L. Evaluation of biologically active compounds in *Coleonema album*. Tese de doutorado. University of Johannesburg, South Africa, 2004.

MAIZURA, M. et al. Total phenolic content and antioxidant activity of kesum (*Polygonum minus*), ginger (*Zingiber officinale*) and turmeric (*Curcuma longa*) extract. *International Food Research Journal* 18: 526-531, 2011.

MAHAN, B. M. & MYERS, R. J. QUÍMICA um curso universitário, 4ª edição 2011.

MARCELLE, B. G.; MOTO, B. S. Tetranortriterpenoids from the heartwood of *Carapa guianensis*. *Phytochemistry*, 14: 2717–2718. 1975.

MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the Salmonella mutagenity test. *Mutat. Res.* 113:173-215, 1983.

MARZOLINI, C. et al. Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther* 75 p 13-33, 2004.

MATHIEU, P. et al. Obesity, Inflammation, and Cardiovascular Risk. . *Clin Pharmacol Ther*, 4, 87, 407-416, 2010.

MAZIASZ, T. et al. Predictive Toxicology Approaches for Small Molecule Oncology Drugs. *Toxicol. Pathology*. 38: 148-164, 2010.

MCCANN, J. et al. Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test. Assay of 300 chemicals. *Proc. Natl. Acad. Scie.* 72 p. 5135-5139, 1975.

MCFARLANE S.I. et al. Pleiotropic effects of statins: lipid reduction and beyond. *Clin Endocrinol Metab* 2002;87:1451-8

MCHARGUE, L. A.; HARTSHORN, G. S. Seed and seedling ecology of *Carapa guianensis*. *Turrialba* 33:39-404, 1983.

MENDONÇA, A. P.; FERRAZ, I. D. K. Óleo de andiroba: processo tradicional da extração, uso e aspectos sociais no estado do Amazonas, Brasil. *Acta Amazonica* 37:353-364. 2007

MERRER, D. C. et al. Experimental and theoretical ultraviolet spectra of haloindoles. *Tetrahedron Letters* 45, 25, 4899–4902, 2004.

MERSCH-SUNDERMANN, V. et al. Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents. *Toxicology* 198(1-3) p. 329-40, 2004.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutat. Res.* 450, p. 29-60, 2000.

MOSESSO, P. et al. Cytogenetic analyses of Azadirachtin reveal absence of genotoxicity but marked antiproliferative effects in human lymphocytes and CHO cells in vitro. *Tox. Letters*, 3, 361–366, 2012.

MOURA, M. D. et al. Natural Products Reported as Potential Inhibitors of Uterine Cervical Neoplasia. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 21: 67-74. 2002.

NIKI, E. Antioxidant capacity: Which capacity and how to assess it? *Journal of Berry Research*, 1, pp. 169–176, 2011.

OECD. Guideline 471 for testing chemicals by Bacterial Reverse Mutation Test, 1997.

PATTERSON, D. In: PUCK, T. T. Biographical Memoirs, vol 91, p. 258-283, 9 Ed. 2009.

PHUA D. H. et al. Human *Melia azedarach* poisoning. *Clinical Toxicology* **46**, 1067–1070, 2008.

NAYAK, B. S. et al. Experimental evaluation of ethanolic extract of *Carapa guianensis* L. leaf for its wound healing activity using three wound models. *Evid Based Complement Alternat Med*: 1-6, 2011.

NAYAK, B. S. et al. Investigation of the wound healing activity of *Carapa guianensis* L. (Meliaceae) bark extract in rats using excision, incision, and dead space wound models. *J Med Food* 13: 1141-1146. 2010.

PENIDO, C. et al. Anti-allergic effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet on allergen-induced vascular permeability and hyperalgesia. *Inflamm Res.* 54(7): 295-303, 2005.

PENNINGTON, T. D. Meliaceae. *Flora Neotropica*, Monograph No. 28. New York Botanical Garden Pr. Department, New York, 470 pp. 1981.

PROPHIRO, J. S. et al. Evaluation of time toxicity, residual effect, and growth-inhibiting property of *Carapa guianensis* and *Copaifera* sp. in *Aedes aegypti*. *Parasitol. Res.* 110: 713-719. 2012.

RAINHO, C. R. et al. Ability of *Allium cepa* L. root tips and *Tradescantia pallida* var. *purpurea* in N-nitrosodiethylamine genotoxicity and mutagenicity evaluation. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences* 84 (4): 1-8, 2010.

ROCHE. Cell proliferation reagent WST-1 protocol, 2006.

RUFINO, M. S. M. et al. Metodologia Científica: detecção da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical DPPH. *Comunicado Técnico Online*. EMBRAPA, 2007.

SALVADORI, D. M. F. Mutagênese Ambiental, 1ª Ed. Canoas: Ed. ULBRA, 2003, 355p.

SOUZA, W. O cultivo de células e seu impacto na medicina. *Jornal da Ciência*, São Paulo, 5, agosto, 2008.

STANKEVICINS, L. et al. Genotoxic and antigenotoxic evaluation of extracts from *Arenosclera brasiliensis*, a Brazilian marine sponge. *Toxicol. In Vitro*. 22, 1869–1877, 2008.

TAKEY, K. et al. Cytotoxic azadirachtin-type limonoids from *Melia azedarach*. *Phytochemistry* 42:709–712, 1996.

TKACHYK, S. J. New treatments for allergic rhinitis. *Can Fam Physician*. 45: 1255-60, 1999.

THOMAS, P. B. et al. Identification of estrogen receptor beta expression in Chinese hamster ovary (CHO) cells and comparison of estrogen-responsive gene transcription in cells adapted to serum-free media. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 86(1):41-55, 2003.

TONINI, H. et al. Crescimento de espécies nativas da Amazônia submetidas ao plantio no estado de Roraima. *Ciência Florestal* 18:151-158 2008a

TONINI, H. et al. Estrutura populacional e produção de Castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) e andiroba (*Carapa* sp.) no Sul do Estado de Roraima. In: *Anais/1º. Seminário do Projeto Kamukaia Manejo Sustentável de produtos florestais não-madeireiros na Amazônia* – Rio Branco, AC: Embrapa Acre. 182p. WADT, L.H.O. Editora. Embrapa Acre. 2008b.

UMBUZEIRO, G. A. & VARGAS, V. M. F. Teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames) como indicador de carcinogenicidade em potencial para mamíferos. In: SALVADORI, D. M. F. et al. *Mutagênese Ambiental*, 1 Ed. Canoas: Ed. ULBRA, p. 81-112, 2003.

VON DER HUDE, W. et al. In vitro micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells - results of a collaborative study with in situ exposure to 26 chemical substances. *Mutat Res.* 468(2):137-6, 2000.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÃO GERAL

- Foi obtida a indução de calos no cultivo *in vitro* de explantes foliares de *Carapa guianensis* com o fitorregulador 2,4D, mas não houve produção de embriões somáticos ou organogênese a partir destes. Também houve o desenvolvimento de brotos a partir de explantes de gemas apicais.

- O estudo sobre germinação e desenvolvimento *ex vitro* de sementes de *Carapa guianensis* concluiu que temperaturas mais altas (30 e 40 °C) e substrato com retenção de umidade são os mais favoráveis ao desenvolvimento inicial dessa espécie.

- Apesar de os três óleos de *Carapa guianensis* obtidos de formas diferentes terem apresentado perfil oléico e propriedades físicas semelhantes, houve diferenças entre eles quanto a atividade antioxidante, sendo os óleos B e A mais expressivos nesse caráter, e quanto a atividade citotóxica em bactérias, onde o óleo B apresentou mais pontos de citotoxicidade para bactérias. Para células CHO-K1, todos os 3 óleos se mostraram tóxicos nas condições apresentadas.

CAPÍTULO 6

PERSPECTIVAS

Aprimoramento do cultivo *in vitro*, buscando a rizogênese do broto regenerado a partir da gema apical; aclimatização de plântulas geradas *in vitro* e novos testes para avaliar surgimento de embriões somáticos a partir dos calos obtidos.

Tendo em vista estes resultados de toxicologia, faz-se necessário o aprofundamento da avaliação das 3 amostras, afim de verificar quais compostos estão em cada uma; executar o Teste de Ames com metabolização (+S9); avaliar a sobrevivência e proliferação celular em células de mamíferos com metabolismo mais alto do que as utilizadas no presente trabalho, como hepatócitos, e os efeitos mutagênicos nessas células através do teste de micronúcleo.