

Efeito de poliaminas exógenas no crescimento inicial *in vitro* e nos teores de fenóis, poliaminas e atividade da peroxidase em *Aloe vera* (L.) Burm.

MÓGOR, G.¹; LIMA, G.P.P.²; MÓGOR, A.F.³

¹Universidade Estadual Paulista – UNESP, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Botânica), Instituto de Biociências, CP 510, CEP 18.618-000, Botucatu, SP.; ²Universidade Estadual Paulista – UNESP, Departamento de Química e Bioquímica, Instituto de Biociências, CP 510, CEP 18.618-000, Botucatu, SP. e-mail: gpplima@ibb.unesp.br; ³Prof. Dr. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

RESUMO: Brotações laterais de plantas de *Aloe vera* (L.) Burm. cultivadas *in vitro*, por 90 dias, subcultivadas a cada 30 dias, sem adição de reguladores vegetais, foram inoculadas em meio de cultura MS contendo ou não espermina e/ou espermidina. Após 30 dias de cultivo, as plantas foram submetidas às análises bioquímicas, comparadas entre si e com plantas micropropagadas com 90 dias de cultivo *in vitro* em meio contendo BAP e NAA (denominadas caracterização), bem como com plantas matrizes (*in vivo*). Nas análises bioquímicas foram avaliados os níveis de poliaminas livres, fenóis totais solúveis, flavonóides totais solúveis e atividade da peroxidase. A aplicação exógena de espermina e espermidina promoveu grande número de perfilhos, bem como aumento no teor de putrescina e flavonóides. Putrescina apresentou as alterações mais significativas, podendo ser utilizada como marcadora de morfogênese em *Aloe vera* micropropagada. Tecidos em ativo crescimento apresentaram alta atividade de peroxidase, assim como aqueles com maior taxa de oxidação. Nestes tecidos também ocorreu maior teor de flavonóides totais. A ação conjunta das poliaminas mostrou-se benéfica para o perfilhamento.

Palavras-chave: poliaminas, compostos fenólicos, peroxidase, micropropagação, Aloe

ABSTRACT: Effect of exogenous polyamines in the *in vitro* initial growth, in the contents of phenols and polyamines contents, and peroxidase activity in *Aloe vera* (L.) Burm. Lateral shoots of the *Aloe vera* (L.) Burm. cultivated *in vitro*, without addition vegetal regulators, for 90 days, were inoculated in MS culture-medium, containing or not spermine and/or spermidine. After 30 days of cultivation, the plants were submitted to biochemical analysis together with micropropagated plants – that were under *in vitro* cultivation for 90 days – (denominated as characterization), and matrix plants (*in vivo*). The levels of free polyamines, total phenols, total flavonoids, and the activity of peroxidase were evaluated in the biochemical analyses. The exogenous application of spermidine have promoted large number of shoots. Spermidine and spermine have promoted, when associated, an increase in the number of shoots as well as an increase of the contents of putrescine and and flavonoids. The putrescine has presented the most significant alterations, enabling to be utilized as marker of morphogenesis in the micropropagated *Aloe vera*. Tissues under active growth have presented high activity of peroxidase as well as those with greater rate of oxidation. In these tissues, there were noticed also higher contents of total flavonoids, indicating the need of antioxidative compounds. The action of polyamines jointly tseemed to be benefic for the shooting of micropropagated *Aloe vera*.

Key words: polyamines, phenolic compounds, peroxidase, micropropagation, Aloe

INTRODUÇÃO

Os vegetais têm capacidade quase ilimitada de sintetizar substâncias, que em muitos casos, são utilizadas como defesa contra microrganismos, insetos e herbívoros (Dempsey et al., 1993) e que

servem de modelo para a síntese de inúmeros medicamentos, sendo que grande parte dos compostos secundários já isolados de plantas medicinais ainda está para ser estudado quanto às suas atividades biológicas (Stangarlin et al., 1999).

Recebido para publicação em 06/12/2005

Aceito para publicação em 20/02/2007

Neste sentido, diversos estudos têm sido realizados na tentativa de se obter fármacos em plantas com potencial fitoterápico, acompanhado de um significativo aumento nos investimentos em pesquisa. O problema maior é o material vegetal, o qual, devido à grande procura, pode se tornar escasso e ainda, a dependência da planta do campo pode ser um entrave na produção destes fitoterápicos.

A cultura de tecidos vegetais tem sido freqüentemente usada como um modelo para estudar desenvolvimento, assim como dos metabólitos presentes, devido maior facilidade de obtenção das plantas, quando estabelecido um protocolo (Arnaldos et al., 2001). Substâncias como poliaminas têm sido utilizadas amplamente no cultivo *in vitro*, juntamente com reguladores vegetais, principalmente as auxinas e citocininas. A adição de poliaminas ao meio de cultura tem mostrado efeito estimulador de crescimento em várias plantas (Scott et al., 1998), estando envolvidas na regulação do crescimento, divisão e diferenciação celular (Rajam, 1997). Durante os últimos anos, tem sido relatadas como eficientes antioxidantes em sistemas experimentais, exercendo este efeito através da proteção de componentes celulares, tais como membranas, ácidos nucléicos e ácidos graxos poli-insaturados, de danos oxidativos (Lovaas, 1991; Lovaas, 1996). As poliaminas e outros reguladores vegetais podem modular eventos morfogênicos (Altamura et al., 1993).

A espécie *Aloe vera* (L.) Burm. (Liliaceae), também conhecida como babosa e tendo como sinonímia *A. barbadensis* Mill., apresenta baixo rendimento no campo (Silva et al., 2000) e a micropropagação poderia ser um método eficaz de produção de plantas (Hu et al., 2003). Diversos compostos tem sido identificados em extratos de *Aloe vera*, incluindo polissacarídeos e flavonóides (Lee et al., 2000; Zhang et al., 2001).

Os compostos fenólicos podem participar de reações de manutenção do nível adequado de reguladores, essenciais para os diversos eventos morfogênicos (Cvikrová et al., 1998). O papel dos fenólicos tem sido extensivamente estudado nos últimos anos, estando correlacionando entre as diversas ações, no controle do crescimento, já que a relação crescimento e acúmulo de alguns destes compostos é igualmente inversa (Mader & Hanke, 1997) e podem agir como inibidores. Alguns deles podem promover aumento na taxa de crescimento (Li et al., 1993) e prolongar a ação das auxinas por inibir a ação do ácido 3-indolilacético (IAA) (Krylov et al., 1994). Outra importância relatada aos compostos fenólicos é o estudo da atividade dos flavonóides, os quais desempenham importante papel na saúde humana. As propriedades dos flavonóides são conhecidas nos processos anti-oxidativos, anti-microbianos, anti-mutagênicos e anti-carcinogênicos

(Awad et al., 2000). Levando em consideração esses fatores, tornam-se relevantes os estudos sobre as fontes naturais de flavonóides (Oliveira et al., 1999).

As peroxidases são enzimas que participam de reações oxidativas e estão relacionadas com o controle da auxina endógena (Pedreño et al., 1990). Peroxidases tem sido usadas por diversos autores, assim como as poliaminas, como marcadoras bioquímicas de eventos morfogênicos em plantas cultivadas *in vitro* (Lima et al., 1999; Lima et al., 2003).

Assim, como as poliaminas podem atuar em diversas rotas metabólicas, este trabalho objetivou estudar a participação da espermidina e espermina nos mecanismos de formação de compostos fenólicos, incluindo os flavonóides e na atividade da peroxidase, além dos teores endógenos de poliaminas.

MATERIAL E MÉTODO

O material vegetal utilizado (brotações laterais de plantas de *Aloe vera* (L.) Burm. cultivadas *in vitro*, sem adição de reguladores vegetais, com 90 dias, foi inoculado em meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de inositol, 1,0 mg L⁻¹ de tiamina e 6,0 g L⁻¹ de ágar, contendo 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido alfa-naftalenoacético (NAA) ou poliaminas espermidina (Spd) e espermina (Spm) e mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2°C, 85% U.R., fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 1000 lux. A solução de poliaminas foi adicionada ao meio de cultura MS, previamente autoclavado e resfriado (aproximadamente 45°C), com o auxílio de seringa descartável e filtros acopláveis MILLEX^R – Millipore, contendo poros de 0,22 µm, sendo este procedimento realizado em câmara de fluxo laminar. Posteriormente, o meio de cultura foi distribuído em frascos de vidro (268 mL de capacidade) previamente esterilizados, com 40 mL de meio em cada frasco. Após o resfriamento completo do meio de cultura foi realizada a inoculação, sendo colocada uma planta por frasco. Após a distribuição das plantas nos quatro tratamentos, contendo 5 repetições (cada repetição composta de 4 explantes), os frascos foram distribuídos em delineamento experimental em blocos casualizados, com fotoperíodo de 16 horas, intensidade luminosa de 1000 lux, por 30 dias. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Posteriormente, as plantas foram submetidas às análises bioquímicas, juntamente com plantas micropropagadas (90 dias de cultivo *in vitro*, denominadas caracterização) e plantas matrizes (*in vivo*), perfazendo 6 tratamentos com 4 repetições, distribuídos em delineamento experimental em blocos

ao acaso, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância (Tabela 1). As plantas referentes aos 90 dias de cultivo *in vitro* (caracterização), foram obtidas através da inoculação de ápices caulinares oriundos de brotações laterais de plantas *in vivo* (cultivadas em condições de campo, no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP). Os ápices caulinares foram inoculados em meio de cultura (MS + 8,88 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de BAP + 5,36 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de NAA), o qual, a partir de experimentos prévios, mostrou ser o melhor meio indutor de organogênese na espécie estudada. Nesta época, essas plantas foram analisadas quanto aos teores de poliaminas endógenas livres, flavonóides totais solúveis, fenóis totais solúveis e atividade da peroxidase.

Para as análises bioquímicas (poliaminas livres, flavonóides totais solúveis, fenóis totais solúveis e atividade da peroxidase), as plantas micropropagadas com 90 dias em meio MS acrescido de BAP e NAA e aquelas com 120 dias (90 dias em meio MS sem adição de reguladores e cultivadas por 30 dias em meio contendo ou não as poliaminas espermidina e espermina), foram separadas em planta-mãe (explante inicial), perfilhos e rizomas, enquanto as plantas matrizes (oriundas do campo) foram separadas em epiderme e rizomas. Nas plantas matrizes o gel (mucilagem) não foi utilizado nas análises, enquanto as micropropagadas foram utilizadas inteiras, ou seja, sem separação da epiderme com o gel, devido a grande dificuldade de separação. As análises realizadas na epiderme da planta matriz (*in vivo*) foram comparadas com a planta-mãe (explante inicial com 90 dias de cultivo) e com as que receberam tratamentos (ausência ou presença de espermidina e/ou espermina por mais 30 dias, 120 dias de cultivo). Essas análises também foram realizadas nos respectivos rizomas. A análise dos perfilhos foram feitas apenas nas plantas micropropagadas, tanto com 90 dias, como com 120 dias de cultivo *in vitro*.

TABELA 1. Tratamentos submetidos às análises bioquímicas.

Tratamentos	
T ₁ (plantas <i>in vivo</i>)	Plantas Matrizes
T ₂ (90 dias <i>in vitro</i>) (caracterização)	MS + 8,88 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de BAP + 5,36 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de NAA
T ₃ (120 dias <i>in vitro</i>)	MS + 8,88 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de BAP + 5,36 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de NAA
T ₄ (120 dias <i>in vitro</i>)	MS + 10,0 mmol L^{-1} Spm
T ₅ (120 dias <i>in vitro</i>)	MS + 10,0 mmol L^{-1} Spd
T ₆ (120 dias <i>in vitro</i>)	MS + 10,0 mmol L^{-1} Spm + 10,0 mmol L^{-1} Spd

Nas análises bioquímicas foram avaliados os níveis de poliaminas, fenóis totais solúveis, flavonóides totais solúveis e atividade da peroxidase, em plantas micropropagadas com 120 dias de cultivo *in vitro* (com adição de auxina e citocinina ou poliaminas exógenas), plantas micropropagadas com 90 dias de cultivo *in vitro* (caracterização) e plantas matrizes (*in vivo*).

Teor de poliaminas livres

A análise foi realizada de acordo com o método de Flores & Galston (1982) modificado por Lima (1994). Amostras de material fresco (planta-mãe, perfilhos e rizomas) de plantas micropropagadas e amostras da planta matriz (epiderme e rizomas) foram pesadas e homogeneizadas em ácido perclórico 5% gelado e centrifugadas durante 20 minutos a 4°C. Alíquotas foram transferidas para tubo de ensaio, juntamente com cloreto de dansila (diaminophthylsulfônico- I)-(5 mg mL⁻¹ de acetona) e de solução de Na₂CO₃ saturado. Foram adicionados 100 μL de prolina e os tubos após agitação foram mantidos por 30 minutos no escuro. Em seguida, 500 μL de benzeno foram adicionados e os tubos novamente agitados. Alíquotas da fase orgânica foram retiradas e submetidas à cromatografia de camada delgada.

As placas empregadas (20 x 20 cm de 500 μm de espessura, recobertas com camada de sílica gel 60G), foram ativadas a 100°C por 2 horas. Os solventes cromatográficos utilizados foram a mistura clorofórmio:trietilamina (5:1), para a separação das poliaminas putrescina, espermidina e espermina. A separação cromatográfica foi realizada por 1 hora a 25°C, sendo todo o processo acompanhado por luz UV. Padrões de poliaminas foram processados da mesma maneira. Após esse processo, as placas foram secas e as poliaminas quantificadas por espectroscopia de emissão de fluorescência em aparelho VDS (VÍdeo Documentation System), através do programa Image Pro-IPW, no Laboratório de Física e Biofísica do Instituto de Biociências (UNESP) - Botucatu. Os teores de poliaminas livres foram expressos em nmol put g mf⁻¹, nmol spd g mf⁻¹ e nmol spm g mf⁻¹.

Teor de fenóis totais solúveis

A análise foi realizada de acordo com o método espectrofotométrico Folin-Denis (Horwitz, 1995). Amostras de material seco e moído de plantas micropropagadas (planta-mãe, perfilhos e rizomas) e amostras da planta matriz (epiderme e rizomas) foram coletadas, pesadas e colocadas em tubos de centrifuga. Em cada tubo foi adicionado acetona 70% e água destilada. Em seguida foram levados para banho ultrassônico e centrifugados a 10.000 rpm. O sobrenadante foi colocado em frascos e mantidos em gelo. Alíquotas de 0,1 mL foram transferidas para tubos

de ensaio e o volume completado com água destilada. Adicionou-se o reagente Folin-Denis e a solução saturada de Na_2CO_3 .

Após agitação dos tubos, estes foram mantidos em repouso por 45 minutos e a leitura da absorbância realizada a 725 nm. Os resultados foram expressos em μg fenóis (ácido tânico) $\text{g}^{-1} \text{ms}^{-1}$.

Teor de flavonóides totais solúveis

A análise foi realizada de acordo com o método espectrofotométrico adaptado de Santos & Blatt (1998) e Awad et al. (2000). Amostras de material fresco foram pesadas e maceradas em 20 mL de solução A (metanol 70% e ácido acético 10%). Posteriormente, foram levados ao banho ultrassônico e após filtragem, centrifugados a 10.000 rpm. Após a transferência do sobrenadante para tubos de ensaio foram acrescentados cloreto de alumínio e ácido acético 10%, sendo em seguida agitados e mantidos em repouso durante 30 minutos. A leitura da absorbância foi realizada a 425 nm e os resultados expressos em μg flavonóides (rutina/quercetina) $\text{g}^{-1} \text{m s}^{-1}$.

Atividade da peroxidase (E C 1.11.1.7)

A análise foi realizada de acordo com o método espectrofotométrico de Allan et al. (1974) modificado por Lima et al. (1999). Amostras de material fresco de plantas micropropagadas e amostras da planta matriz foram pesados e macerados em tampão fosfato 0,2 M, pH 6,7. Após centrifugação, foi adicionada solução de peróxido de hidrogênio e fenol. Os tubos contendo o sistema de reação foram mantidos em banho-maria por 5 minutos, sendo interrompida a reação com adição

de etanol absoluto. A leitura da absorbância foi realizada a 505 nm. A atividade específica da peroxidase foi expressa em μmol de H_2O_2 decomposto $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína.

RESULTADO E DISCUSSÃO

As plantas com 120 dias de cultivo *in vitro* foram submetidas às análises bioquímicas, juntamente com plantas com 90 dias de cultivo *in vitro* (caracterização) e plantas matrizes (*in vivo*).

O maior valor de putrescina (Tabela 2) na planta-mãe (*in vitro*) foi encontrado no tratamento contendo a mistura das poliaminas espermidina e espermina, o qual apresentou diferenças significativas dos demais tratamentos. Resultados semelhantes foram encontrados quando se analisou o teor dessa diamina no número de perfilhos (Tabela 6). Esses valores poderão estar relacionados com o maior perfilhamento obtido nesse tratamento em relação aos demais, sugerindo que os teores de putrescina aumentam em tecidos em crescimento ativo (Rey et al., 1994). Diversos autores, entre eles Galston & Kaur-Sawhney (1995), relatam que a putrescina, assim como as demais poliaminas, é requerida para o crescimento e desenvolvimento ótimo de várias plantas. Esse fato se deve provavelmente a essa amina ser a precursora de espermidina e espermina (Bouchereau et al., 1999). Assim, a partir desses resultados, nota-se que o efeito exógeno das poliaminas, principalmente espermidina e espermina foi positivo no crescimento e perfilhamento. O efeito estimulante no crescimento e formação de brotos por poliaminas exógenas tem sido comprovado e recomendado por diversos autores (Bouchereau et al., 1999).

TABELA 2. Teores de putrescina na epiderme da planta matriz (*in vivo*) e planta-mãe (explante inicial) dos tratamentos *in vitro*; rizoma da planta matriz (*in vivo*) e dos tratamentos *in vitro*; perfilhos (brotações laterais de plantas *in vitro*), expressos em nmol de putrescina grama de matéria fresca⁻¹.

	Planta Matriz	Caract. 90 dias	BAP+NAA 120 dias	Spm 120 dias	Spd 120 dias	Spm+Spd 120 dias	CV%
Epiderme/							
Planta-mãe	31,27 bc	45,50 bc	53,82 b	29,26 c	28,60 c	121,74 a	19,85
Rizoma	14,10 c	22,58 bc	176,31 a	155,45 a	63,82 b	132,85 a	20,97
Perfilho		37,83 c	37,00 c	37,79 c	77,90 b	121,60 a	14,54

As médias seguidas de mesma letra na horizontal não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Quanto aos teores de putrescina nos perfilhos, o tratamento contendo a combinação de espermidina e espermina apresentou valores mais elevados. Esse tratamento induziu maior número de perfilhos (8,50) em relação à aplicação de BAP +

NAA (3,75 perfilhos), espermina (2,12 perfilhos) e espermidina (6,75 perfilhos), conseqüentemente maior atividade meristemática. Tal resultado concorda com os de Maki et al. (1991), sugerindo que a putrescina deve agir no controle do progresso das

fases de mitose nas células, evidenciando aumento dos teores durante esse período. Desai & Metha (1985) também verificaram em explantes foliares de *Passiflora* sp., que os teores de putrescina aumentaram durante a emissão de brotações.

Geralmente os teores de poliaminas estão associados com crescimento ativo dos tecidos, Meijer & Simmonds (1988) relataram que os teores de putrescina estão relacionados com as mudanças ocorridas em função do processo de diferenciação. Neste trabalho, na associação de espermina e espermidina ocorreu maior número de perfilhos, diferindo estatisticamente quanto ao teor de putrescina dos demais tratamentos, apresentando valor superior. Assim, o maior valor encontrado de putrescina no tratamento contendo as duas poliaminas pode estar relacionado com a maior emissão de perfilhos. Quanto aos teores de putrescina no rizoma aos 120 dias, os tratamentos contendo BAP + NAA, espermina e a combinação de espermina + espermidina apresentaram os maiores valores, não ocorrendo diferenças significativas entre estes tratamentos.

Verifica-se que há aumento dos teores de espermina na planta-mãe (Tabela 3) aos 90 dias de cultivo *in vitro* em relação ao encontrado na epiderme da planta matriz. Resultado inverso é observado no rizoma. Os teores, nos órgãos analisados, foram

maiores que os encontrados para putrescina. Provavelmente, este resultado se deve ao meio de cultivo, propício ao crescimento e desenvolvimento, onde putrescina poderia estar sendo convertida em espermidina e espermina (Marton & Morris, 1987; Galston & Kaur-Sawhney, 1995). Nota-se que a aplicação das poliaminas isoladas ou em combinação não induziram aumento no teor de espermina quando comparado com o tratamento contendo BAP e NAA, tanto nas folhas (epiderme/planta-mãe) como no rizoma. Resultado inverso pode ser observado nos perfilhos, que por estarem provavelmente em ativo desenvolvimento, apresentaram maiores níveis dessa poliamina.

Scott et al. (1998) citam que as poliaminas, apesar de desempenharem papéis positivos em vários sistemas de cultura, em alguns casos mostram-se ineficientes. Segundo Rugini et al. (1992), os diferentes efeitos que as poliaminas apresentam para um mesmo evento podem estar relacionados com a aplicação de uma concentração inadequada à espécie, ou à altas concentrações endógenas já existentes no tecido, o que poderia explicar os resultados encontrados neste trabalho, podendo ocorrer ação das poliaminas oxidases, gerando peróxidos (Smith, 1985) ou mesmo à reconversão à putrescina (Tassoni et al. 2000).

TABELA 3. Teores de espermina na epiderme da planta matriz (*in vivo*) e planta-mãe (explante inicial) dos tratamentos *in vitro*; rizoma da planta matriz (*in vivo*) e dos tratamentos *in vitro*; perfilhos (brotações laterais de plantas *in vitro*), expressos em nmol de espermina. grama de matéria fresca⁻¹.

	Planta Matriz	Caract. 90 dias	BAP+NAA 120 dias	Spm 120 dias	Spd 120 dias	Spm+Spd 120 dias	CV%
Epiderme/							
Planta-mãe	41,73 b	79,48 a	80,07 a	38,54 b	30,93 b	63,19 a	16,36
Rizoma	46,22 bc	31,53 c	122,15 a	71,61 b	60,48 bc	50,15 bc	21,29
Perfilho		53,69 b	53,90 b	92,73 a	98,59 a	85,90 a	12,92

As médias seguidas de mesma letra na horizontal não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

TABELA 4. Teores de espermidina na epiderme da planta matriz (*in vivo*) e planta-mãe (explante inicial) dos tratamentos *in vitro*; rizoma da planta matriz (*in vivo*) e dos tratamentos *in vitro*; perfilhos (brotações laterais de plantas *in vitro*), expressos em nmol de espermidina. grama de matéria fresca⁻¹.

	Planta Matriz	Caract. 90 dias	BAP+NAA 30 dias	Spm 30 dias	Spd 30 dias	Spm+Spd 30 dias	CV%
Epiderme/							
Planta-mãe	33,94 b	50,48 a	20,82 c	23,59 c	13,77 c	33,72 b	14,80
Rizoma	32,72 cd	24,19 d	77,40 b	45,21 cd	47,54 c	113,22 a	17,30
Perfilho		20,64 c	12,01 c	48,98 b	26,91 c	74,08 a	19,06

As médias seguidas de mesma letra na horizontal não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

A Tabela 4 evidencia que o teor de espermidina na planta aos 90 dias de cultivo foi maior e difere significativamente dos demais valores encontrados na epiderme/planta-mãe. A aplicação exógena de espermidina não induziu o teor endógeno ao aumento. Esse resultado, assim como do encontrado para espermina, pode ter sido devido à época analisada, já que essas substâncias poderiam ter sido metabolizadas, ou através de enzimas de interconversão (Tassoni et al., 2000) ou através de enzimas oxidativas, que promovem a degradação dessas substâncias (Smith, 1985).

O uso de poliaminas exógenas no meio de cultura, de acordo Takeda et al., 2002 é uma maneira simples de elevar os níveis endógenos de poliaminas e algumas vezes, induzir regeneração.

Poliaminas exógenas (putrescina, espermidina, espermina) isoladas ou em combinação, resultaram num aumento de crescimento de calos, os quais apresentaram formação de brotações e raízes com maior frequência que o controle em *Pinus virginiana* Mill. e putrescina ou espermidina isoladas foram os melhores tratamentos para crescimento de calos, formação de brotos e enraizamento desta espécie (Tang et al., 2004). Neste trabalho, o uso de espermidina foi também o melhor tratamento tanto para produção de massa (fresca/seca), como para indução de brotação (perfilhos), aplicada tanto isolada, quanto em combinação com espermina.

Mader & Hanke (1997) afirmaram que os níveis de putrescina livre aumentaram em cultivo *in vitro* de soja, especialmente no período inicial, antes do crescimento se tornar restrito para a expansão celular e a diminuição no teor de putrescina foi associada com o final da divisão celular. Neste trabalho, a putrescina causou as alterações mais significativas, podendo, neste caso, ser utilizada como marcador bioquímico para o aumento do número de plantas.

O teor de fenóis (Tabela 5) em plantas cultivadas *in vitro* com 90 dias (caracterização) foram maiores na folha da planta-mãe, quando comparados com os demais tratamentos e a aplicação exógena de espermina induziu valores semelhantes significativamente. Quando se utilizou espermina combinada com espermidina, os tecidos analisados mostraram os menores teores de fenóis totais solúveis. Quanto ao rizoma, a mesma tendência pode ser observada, porém os menores teores são verificados na planta matriz. Em relação aos perfilhos, aqueles cultivados em meio contendo espermina e espermidina combinadas e aplicadas exógenamente, mostraram valores altos, menores apenas que a planta cultivada *in vitro* com 90 dias. Nota-se que ocorreu correlação inversa entre os teores de fenóis, aplicação de poliaminas exógenas e crescimento (massa seca e número de perfilhos – Tabelas 6 e 7).

Uma das funções dos fenóis está relacionada com a modulação do desenvolvimento vegetal, pela regulação do catabolismo do ácido indolacético (IAA) e outra função importante está relacionada com o aumento da rigidez da parede celular e conseqüentemente, a formação das ligações fenólicas com compostos da parede e a perda da extensibilidade, diminuindo o crescimento celular (Volpert et al., 1995; Kroon & Williamson, 1999; Arnaldos et al., 2001). O teor de fenóis encontrado nos tratamentos contendo poliaminas exógenas está de acordo com o papel dos fenóis descrito na literatura, isto é, há uma relação inversa com o potencial de crescimento (Nakamura et al., 1998) e as poliaminas como são compostos relacionados com o crescimento de células e tecidos, promoveram o resultado esperado. Plantas cultivadas em meio contendo BAP e NAA aos 120 dias apresentaram menor índice de massa e número de perfilhos, se comparadas com as cultivadas em meio contendo espermidina combinada ou não com espermina, apresentando o maior teor de fenóis totais. Este teor encontrado pode também ser devido à presença da auxina no meio de cultura, já que os fenóis estão relacionados com este regulador (Arnaldos et al., 2001).

A associação de espermina e espermidina exógenas promoveu o maior número de perfilhos (8,50) e apresentou também baixo teor de fenóis totais, além do maior teor de putrescina.

Os compostos fenólicos são substratos principais de peroxidases, enzimas relacionadas com o crescimento e organogênese (De Klerk, 1996; Kanmegne & Omokolo, 2003).

As maiores atividades da enzima peroxidase (Tabela 8) ocorreram na epiderme da planta matriz, na caracterização e no uso exógeno da combinação das poliaminas espermidina e espermina. Entre as funções atribuídas às peroxidases em plantas, estão aquelas relacionadas ao estresse (Castillo, 1992). Em relação à planta matriz (cultivada em condições de campo e analisada 6 horas após a coleta, devido ao transporte do material vegetal, mesmo que em condições de temperatura baixa), a alta atividade observada tanto nas folhas como no rizoma poderia ser atribuída ao possível estresse causado pelos fatores externos. Já em relação ao aumento verificado na caracterização, este fato poderia ser devido às sucessivas subculturas ou manipulação. Aumento de atividade da peroxidase durante a subcultura de tecidos *in vitro* também foi noticiada por Laukkanen et al. (1999) em *Pinus sylvestris*, onde observaram que durante a transferência de meios, os tecidos apresentaram maior atividade da peroxidase e os autores ainda atribuem que esse aumento poderia estar relacionado com a lignificação das células.

TABELA 5. Teores de fenóis totais na epiderme da planta matriz (*in vivo*) e planta-mãe (explante inicial) dos tratamentos *in vitro*; rizoma da planta matriz (*in vivo*) e dos tratamentos *in vitro*; perfilhos (brotações laterais de plantas *in vitro*), expressos em μg fenóis (ácido tânico). grama de matéria seca⁻¹.

	Planta Matriz	Caract. 90 dias	BAP+NAA 120 dias	Spm 120 dias	Spd 120 dias	Spm+Spd 120 dias	CV%
Epiderme/Planta-mãe	97,25 b	173,10 a	117,60 b	137,62 ab	101,75 b	119,87 b	15,03
Rizoma	32,10 c	119,37 a	88,60 b	128,25 a	92,60 b	79,62 b	12,77
Perfilho		139,37 a	79,37 b	85,92 b	98,50 ab	107,50 ab	20,85

As médias seguidas de mesma letra na horizontal não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

TABELA 6. Número médio de perfilhos nos tratamentos, aos 30, 60 e 90 dias da instalação do experimento.

Tratamentos	n ^o perfilhos	n ^o perfilhos	n ^o perfilhos
	30 dias	60 dias	90 dias
T1 (MS)	2,39 b	2,85 d	3,34 c
T2 (MS+ 4,44 $\mu\text{mol L}^{-1}$ BAP + 2,68 $\mu\text{mol L}^{-1}$ NAA)	2,44 b	3,12 c	4,31 b
T3 (MS + 8,88 $\mu\text{mol L}^{-1}$ BAP + 2,68 $\mu\text{mol L}^{-1}$ NAA)	2,46 b	3,52 b	4,35 b
T4 (MS + 8,88 $\mu\text{mol L}^{-1}$ BAP + 5,36 $\mu\text{mol L}^{-1}$ NAA)	3,35 a	4,35 a	5,35 a
CV%	7,54	2,77	4,15

As médias seguidas de mesma letra na horizontal não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Nos rizomas, nota-se os maiores valores para atividade da peroxidase em todas as plantas *in vitro*. Foi verificada a presença de oxidação em todos os rizomas testados (escurecimento), tanto na caracterização, provenientes de 90 dias de cultivo *in vitro*, como nos tratamentos contendo BAP + NAA e aqueles contendo espermina e/ou espermidina exógena.

Devido a taxa de oxidação observada, não foi retirado o rizoma durante os subcultivos referentes à caracterização, pois em experimentos prévios foi observado que a retirada dos rizomas acentuavam a oxidação. A atividade da peroxidase apresenta alterações em tecidos com oxidação e/ou necrosados. A atividade desta enzima, assim como da polifenoloxidase (capazes de catalisar a formação e polimerização de quinonas de compostos fenólicos) muda significativamente durante o cultivo *in vitro*. Tal polimerização pode causar o escurecimento dos tecidos, pela conversão dos precursores coloridos em polímeros marrons e a atividade de enzimas oxidativas aumenta durante esse processo (Laukkamen et al., 1999). Provavelmente, neste trabalho, a alta atividade da peroxidase em rizomas está relacionada com a formação de compostos oxidados, que tornariam o rizoma escurecido, sendo também exsudado para o meio de cultura.

As poliaminas são descritas como substâncias que podem prevenir ou diminuir a oxidação, agindo como possível antioxidante (Lovaas,

1996) e provavelmente, poderiam interferir na atividade da peroxidase. Nas folhas de *Aloe vera*, verifica-se que na aplicação de espermina ou espermidina isoladas não ocorreu diferenças, o mesmo para o tratamento contendo BAP + NAA, porém apresentaram atividade menor em relação a aplicação da mistura das duas poliaminas. A alta atividade observada neste tratamento poderia ser relacionada com o ativo crescimento observado neste tratamento, tanto para folhas, como para os perfilhos, pois a peroxidase tem sido descrita na literatura como possível marcador de organogênese (Kanmegne & Omokolo, 2003; Bonfill et al., 2003; De Klerk, 1996), apresentando alterações na atividade antes dos eventos morfogênicos se manifestarem (Gaspar et al., 1985; Anderson et al., 1986) e no caso específico de perfilhos, o tratamento com espermina e espermidina foi o que induziu maior número de perfilhos, maior teor de putrescina e apresentou alta atividade da enzima, podendo neste caso a enzima peroxidase ser também tomada como indicador de crescimento ativo em *Aloe vera*. Por outro lado, como descrito em Kanmegne & Omokolo (2003), parece que cada evento morfogenético que ocorre (calogênese, rizogênese, formação de brotos, etc.) estaria caracterizado por um padrão de isoperoxidase específico, necessitando neste caso de estudos mais aprofundados sobre o papel bioquímico de peroxidases ácidas e básicas.

Os teores de flavonóides encontrados no

presente estudo (Tabelas 9 e 10), principalmente nos rizomas de plantas tratadas com espermidina e a associação de espermina e espermidina foram maiores que o relatado em maçã por Awad et al. (2000), fruto que apresenta grandes níveis dessas

substâncias. Tanto com base em quercetina ou rutina, nota-se que a aplicação de espermidina e a associação de espermina e espermidina induziram teores elevados de flavonóides nas folhas da planta-mãe.

TABELA 7. Massa seca da planta-mãe, perfilhos e rizomas das plantas de *Aloe vera* (L.) Burm., aos 120 dias do início do experimento.

	T1	T2	T3	T4	CV %
	BAP + NAA	Spm	Spd	Spm + Spd	
Massa seca da planta-mãe	0,15 ab	0,12 b	0,15 ab	0,18 a	20,80
Massa seca do rizoma	0,11 b	0,08 b	0,16 a	0,16 a	7,86
Massa seca dos perfilhos	0,06 b	0,05 b	0,10 a	0,11 a	22,18

As médias seguidas de mesma letra na horizontal não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

TABELA 8. Atividade de peroxidase na folha (epiderme) da planta matriz (*in vivo*) e planta-mãe (explante inicial) dos tratamentos *in vitro*; rizoma da planta matriz (*in vivo*) e dos tratamentos *in vitro*; perfilhos (brotações laterais de plantas *in vitro*), expressos em $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2$ decomposto. $\text{min}^{-1}\text{mg. de proteína}^{-1}$.

	Planta Matriz	Caract. 90 dias	BAP+NAA 120 dias	Spm 120 dias	Spd 120 dias	Spm+Spd 120 dias	CV%
Epiderme/planta-mãe	0,166 a	0,144 a	0,040 c	0,080 bc	0,069 c	0,122 ab	21,38
Rizoma	0,123 d	0,395 bc	0,751 a	0,516 b	0,269 cd	0,471 bc	21,35
Perfilho		0,030 c	0,047 c	0,064 c	0,461 a	0,138 b	15,95

As médias seguidas de mesma letra na horizontal não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

TABELA 9. Teores de quercetina na folha (epiderme) da planta matriz (*in vivo*) e planta-mãe (explante inicial) dos tratamentos *in vitro*; rizoma da planta matriz (*in vivo*) e dos tratamentos *in vitro*; perfilhos (brotações laterais de plantas *in vitro*), expressos em $\mu\text{g fenóis (ácido tânico) grama de matéria seca}^{-1}$.

	Planta Matriz	Caract. 90 dias	BAP+NAA 120 dias	Spm 120 dias	Spd 120 dias	Spm+Spd 120 dias	CV%
Epiderme/Planta-mãe	1,99 ab	1,56 bc	1,70 bc	1,16 c	1,94 ab	2,28 a	16,42
Rizoma	1,66 c	3,49 b	3,28 b	4,70 ab	6,06 a	5,68 a	14,87
Perfilho		1,46 bc	1,98 ab	1,22 c	1,35 bc	2,59 a	14,54

As médias seguidas de mesma letra na horizontal não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Resultados semelhantes são observados no rizoma, enquanto que nos perfilhos apenas a associação das duas poliaminas promoveu os maiores valores. Nos rizomas, onde foi também observada alta atividade da peroxidase, por provavelmente estarem relacionadas com estresse, os níveis de flavonóides podem ter sido maior devido à alta taxa de oxidação observada no tecido, causando o escurecimento. O aumento poderia estar

relacionado com o possível papel antioxidante dessas substâncias. Esse efeito pode ser devido principalmente às espécies reativas de oxigênio (ERO), envolvendo radical superóxido (O_2^-), radical hidroxila (OH^\cdot) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), sendo o peróxido o maior contribuinte para as ERO (Apel & Hirt, 2004). Starzyinsk & Mareczek (2003) encontraram correlação positiva entre o conteúdo de flavonóides em brócolis e a atividade antiradical livre, medida via

DPPH (1,1-difenil-2-picridrazil), indicando que os fenóis solúveis analisados tem um papel importante como componente do sistema antioxidante. Possivelmente, os teores encontrados neste trabalho estejam relacionados com a proteção aos tecidos do rizoma, órgão que apresentou maior nível de oxidação nestas plantas estudadas.

Nos perfilhos, os maiores teores de flavonóides foram observados nos tratamentos que usaram a combinação das duas poliaminas e que apresentaram maior perfilhamento, assim como maior teor de putrescina. Provavelmente essa combinação e os teores usados das poliaminas tenham proporcionado um sistema conveniente de crescimento, além da possível proteção dos tecidos contra danos oxidativos gerados por exudatos do rizoma, podendo ter promovido aumento dos flavonóides.

Outra relação que poderia ser citada é a dos flavonóides e IAA, já que os flavonóides parecem proteger esse regulador (Wagner et al., 1988). Diversos trabalhos mostram a ação de flavonóides específicos (quercetina e rutina) inibindo IAA oxidase em altas concentrações, mas que podem acelerar a catálise

do IAA em baixas concentrações (Mathesius, 2001). Os flavonóides que inibem a atividade da IAA oxidase poderiam agir como um substrato alternativo para a peroxidase, protegendo o IAA de oxidação (Kefeli & Dashek, 1984), favorecendo o crescimento. Os flavonóides também podem inibir a oxidação do IAA pela remoção de peróxido de hidrogênio, o qual é produzido na ação oxidativa que precede a atividade da peroxidase e é necessário para oxidação do IAA (Galston et al., 1950).

Assim, os maiores teores de flavonóides encontrados no rizoma poderiam estar relacionados com os danos oxidativos, tentando preservar o tecido, pois o mesmo apresentava-se escurecido externamente, porém internamente, no local onde cresciam os perfilhos, o tecido estava sem sinais de oxidação.

Os valores observados nos perfilhos no tratamento contendo a associação de espermidina e espermina, poderia estar relacionado ao ativo crescimento encontrado, além da possibilidade da ação conjunta ter sido benéfica para o perfilhamento de *Aloe vera* micropropagada.

TABELA 10. Teores de rutina na folha (epiderme) da planta matriz (*in vivo*) e planta-mãe (explante inicial) dos tratamentos *in vitro*; rizoma da planta matriz (*in vivo*) e dos tratamentos *in vitro*; perfilhos (brotações laterais de plantas *in vitro*), expressos em μg fenóis (ácido tânico) grama de matéria seca¹.

	Planta Matriz	Caract. 90 dias	BAP+NAA 120 dias	Spm 120 dias	Spd 120 dias	Spm+Spd 120 dias	CV%
Epiderme/Planta-mãe	3,10 ab	2,52 ab	2,54 ab	2,12 b	3,59 a	3,57 a	20,53
Rizoma	2,92 c	5,18 bc	4,79 c	5,40 bc	8,43 a	7,90 ab	21,10
Perfilho		2,55 bc	3,35 ab	1,95 c	2,46 bc	4,47 a	17,57

As médias seguidas de mesma letra na horizontal não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

CONCLUSÃO

Ocorreu correlação inversa entre teores de fenóis e aplicação de poliaminas em plantas de *Aloe vera* (L.) Burm. *in vitro*. A ação conjunta das poliaminas mostrou-se benéfica para o perfilhamento.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ALLAN, C.C. et al. Enzymatic determination of total serum cholesterol. **Clinical Chemistry**, v.20, p.470-5, 1974.
 ALTAMURA, M.M. et al. Morpho-functional gradients in superficial and deep tissues along tobacco stem: polyamine levels, biosynthesis and oxidation and organogenesis *in vitro*. **Journal of Plant Physiology**, v.142, p.543-55, 1993.
 ANDERSON, J.M. et al. Plant peroxidases related to differentiation *in vitro* cultures. In: GREPPIN, H.; PENEL, C.; GASPAR, T.H. (Eds). **Peroxidases**. Suíça: University of Geneve, 1986. p.353-9

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v.55, p.373-99, 2004.
 ARNALDOS, T.L. et al. Changes in phenol content during strawberry (*Fragaria X ananassa*, c.v. Chandler) callus culture. **Physiologia Plantarum**, v.113, p.315-22, 2001.
 AWAD, A.M.; JAGER, A.; Van WESTING, L.M. Flavonoid and chlorogenic acid levels in apple fruit: characterisation of variation. **Scientia Horticulturae**, v.83, p.249-63, 2000.
 BONFILL, M. et al. Relationship between peroxidase activity and organogenesis in *Panax ginseng* calluses. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.73, p.37-41, 2003.
 BOUCHEREAU, A. et al. Polyamines and environmental challenges: recent development. **Plant Science**, v.140, p.103-25, 1999.
 CASTILLO, F.J. Peroxidase and stress. In: PENEL, C.; GASPAR, T.H.; GREPPIN, H. (Eds). **Plant Peroxidases 1980-1990, topics and detailed literature on molecular, biochemical and physiological aspects**. Suíça:

- University of Geneva, 1992. p.187-203
- CVIKROVÁ, M. et al. Abscisic acid, polyamines and phenolic acids in sessile oak somatic embryos in relation to their conversion on potential. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.36, p.247-55, 1998.
- DE KLERK, G. J. Markers of adventitious root formation. **Agronomie**, v.16, p.609-16, 1996.
- DEMPSEY, D.A.; SILVA, H.; KLESSIG, D.F. Engineering disease and pest resistance in plants. **Trends Microbiology**, v.6, p.54-61, 1993.
- DESAI, H.V.; METHA, A.R. Changes in polyamine levels during shoot formation, root formation, and callus induction in cultured *Passiflora* leaf discs. **Journal of Plant Physiology**, v.119, p.45-53, 1985.
- FLORES, H.E.; GALSTON, A.W. Analysis of polyamines in higher plants by high performance liquid chromatography. **Plant Physiology**, v.69, p.701-6, 1982.
- GALSTON, A.W.; BONNER, J.; BAKER, R.S. Flavoprotein and peroxidase as constituents of the indolacetic oxidase of peas. **American Journal of Botany**, v.37, p.677-78, 1950.
- GALSTON, A.W.; KAUR-SAWHNEY, R. Polyamines as endogenous growth regulators. In: DAVIES, P.J. (Ed). **Plant Hormones: Physiology, Biochemistry & Molecular Biology**. Dordrecht: Kluwer, p.158-78, 1995.
- GASPAR, T. et al. A two-step control of basic and acidic peroxidases and its significance for growth and development. **Plant Physiology**, v.37, p.165-86, 1985.
- HORWITZ, H. **Official method of analysis of the association of official agricultural chemists**. 8.ed. Washington: Association of Agricultural Chemists, 1995. p.844.
- HU, Y.; XU, J.; HU, Q. Evaluation of antioxidant potential of *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) extracts. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.51, p.7788-91, 2003.
- KANMEGNE, G.; OMOKOLO, N.D. Changes in phenol content and peroxidase activity during *in vitro* organogenesis in *Xanthosoma sagittifolium* L. **Plant Growth Regulation**, v.40, p.53-7, 2003.
- KEFELI, V.I.; DASHEK, W.V. Non-hormonal stimulations and inhibitors of plant growth development. **Biological Reviews**, v.59, p.273-88, 1984.
- KROON, P.A.; WILLIAMSON, G. Hydroxycinnamates in plants and foods: current and future perspectives. **Journal of Science Food Agricultural**, v.79, p.355-61, 1999.
- KRYLOV, S.N. et al. Inhibition of enzymatic indole-3-acetic acid oxidation by phenols. **Phytochemistry**, v.36, p.263-7, 1994.
- LAUKKANEN, H. et al. Tissue browning of *in vitro* cultures of scots pine: role of peroxidase and polyphenol oxidase. **Physiologia Plantarum**, v.106, p.337-43, 1999.
- LAUKKANEN, H. et al. A mycobacterium isolated from tissue cultures of native *Pinus sylvestris* interferes with growth of Scots pine seedlings. **Tree Physiology**, v.20, p.915-20, 2000.
- LEE, K.Y.; WEINTRAUB, S.T.; YU, B.P. Isolation and identification of a phenolic antioxidant from *Aloe barbadensis*. **Free Radical Biology & Medicine**, v.28, n.2, p.261-5, 2000.
- LI, H.H. et al. Interactions of trans-cinnamic acid in seedling growth and seed germination of lettuce. **Journal of Chemical Ecology**, v.19, p.1175-87, 1993.
- LIMA, G.P.P. **Efeito do cálcio sobre o teor de poliaminas e atividade da peroxidase e redutase de nitrato em calos de arroz (*Oryza sativa* L. cv. IAC 4440)**. Botucatu, 1994. 85p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.
- LIMA, G.P.P.; BRASIL, O.G.; OLIVEIRA, A.M. Poliaminas e atividade da peroxidase em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivado sob estresse salino. **Scientia Agricola**, v.56, n.1, p.21-5, 1999.
- LIMA, G.P.P.; PIZA, I.M.T.; HENRIQUE, A.; TAKAKI, M. Polyamines on salinity biochemical marker in callus of *Eucalyptus urograndis*. **Ciência Florestal**, v.13, p.43-8, 2003.
- LOVAAS, E. Antioxidative effects of polyamines. **Journal of the American Oil Chemical Society**, v. 68, p.353-8, 1991.
- LOVAAS, E. Antioxidante and metal-chelating effects of polyamines. In: H. SIES (Ed.). **Advances in pharmacology antioxidants in disease mechanisms and therapy**. New York: Academic Press, 1996. v.38, p.119-49.
- MADER, J.C.; HANKE, D.E. Polyamine sparing may be involved in the prolongation of cell division due to inhibition of phenyl propanoid synthesis in cytokinin-starved soybean cells. **Journal of Plant Growth Regulation**, v.16, p.89-93, 1997.
- MAKI, H. et al. Polyamines and the cell cycle of *Cantharus roseus* cells in culture. **Plant Physiology**, v.96, p.1008-13, 1991.
- MARTON, L.J.; MORRIS, D.R. Molecular and cellular functions of the polyamines In: MEGANN, P.P.; PEGG, A.E.; SJOERDSMA, A. (Eds.). **Inhibition of polyamine metabolism. Biological significance and Basis of therapies**. New York: Academic Press, 1987. p.79-105.
- MATHESIUS, U. Flavonoids induced in cells undergoing nodule organogenesis in white clover are regulators of auxin breakdown by peroxidases. **Journal of Experimental Botany**, v.52, p.419-26, 2001.
- MEIJER, E.G.; SIMMONDS, J. Polyamine levels in relation to growth and somatic embryogenesis in tissue cultures of *Medicago sativa* L. **Journal of Experimental Botany**, v.38, p.787-94, 1988.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473 - 97, 1962.
- NAKAMURA, M.; SEIKI, M.; FURUSAKI, S. Enhanced anthocyanin methylation by growth limitation in strawberry suspension culture. **Enzyme and Microbial Technology**, v.22, p.404-8, 1998.
- OLIVEIRA, M.C.C. et al. Flavonóides das flores de *Stiffitia chrysantha Mikn*. **Química Nova**, v.22, n.2, p.182-4, 1999.
- PEDREÑO, M.A. et al. Oxidation of dihydroxyfumaric acid in the absence of H₂O₂ by cell-wall bound peroxidases from lupin: A possible general model. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.28, p.37-42, 1990.
- RAJAM, M.V. Polyamines. In: PRASAD, M.N.V. (Ed.). **Plant Ecophysiology**. New York: J.Wiley, 1997. p.343-74.
- REY, M. et al. Endogenous polyamine concentrations in juvenile, adult and *in vitro* reinvigorated hazel. **Tree Physiology**, v.14, n.2, p.191-200, 1994.
- RUGINI, E. et al. Endogenous polyamine and root morphogenesis variations under different treatment in cutting and *in vitro* explants of olive. **Acta Horticulturae**, v.300, p.225-32, 1992.
- SANTOS, M.D.; BLATT, C.T.T. Teor de flavonóides e fenóis totais em folhas de *Pyrostegia venusta* Miers. de mata e

- de cerrado. **Revista Brasileira de Botânica**, v.21, n.2, p.135-40, 1998.
- SCOTT, E. A.; DHUNDY, R.B.; SUBHASH, C.M. Metabolism of polyamines in transgenic cells of carrot expressing a mouse ornithine decarboxylase cDna. **Plant Physiology**, v.116, p.299-307, 1998.
- SILVA, J.M.O.D. et al. Micropropagação de babosa. In: **Anais Farmápolis**. Florianópolis: Sindfar, 2000. v.1, p.26.
- SMITH, T.A. Polyamines. **Annual Review of Plant Physiology**, v.36, p.117-43, 1985.
- STANGARLIN, R.J. et al. Plantas Mediciniais e controle alternativos de fitopatógenos. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v.11, p.16-21, 1999.
- STARZYNSKI, A.; MARECZEK, A. Physiological changes in the antioxidant system of broccoli flower buds senescing during short-term storage, related to temperature and packaging. **Plant Science**, v.165, p.1387-95, 2003.
- TAKEDA, T. et al. Effect of exogenous polyamines on embryogenic carrot cells. **Biochemical Engineering Journal**, v.12, p.21-8, 2002.
- TANG, W.; NEWYON, R.J.; OUTHAVONG, V. Exogenously added polyamines recover browning tissues into normal callus cultures and improve plant regeneration in pine. **Physiologia Plantarum**, v.122, p.386-95, 2004.
- TASSONI, A. et al. Polyamine content and metabolin in *Arabidopsis thaliana* and effect of spermidine on plant development. **Plant Physiology Biochemistry**, v.36, p.383-93, 2000.
- VOLPERT, R.; OSSWALD, W.; ETYSNER, E.F. Effects of cinnamic acids derivatives in indole acetic acid oxidation by peroxidase. **Phytochemistry**, v.38, p.19-32, 1995.
- WAGNER, G.R.; YOUNGMAN, R.Y.; ESTNER, E.F. Inhibitors of chloroplast photo-oxidation by flavonoids and mechanism of the antioxidative action. **Journal of Phytochemistry and Photobiology**, v. B 1, p.451-60, 1988.
- ZHANG, Z.T. et al. Determination of the antioxidative effect of *Aloe vera*. **Nature Products Research Development**, v.13, p.45-6, 2001.