

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
CAMPUS DE BOTUCATU
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA

REGULADORES VEGETAIS E POLIAMINAS NA ORGANOGÊNESE *IN VITRO* DE *Piper hispidinervium* CANDOLLE DE CANDOLLE: ANÁLISES BIOMÉTRICAS E BIOQUÍMICAS

LUCIANI MARCIA SCHERER SALVARO

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Botânica) do Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista-UNESP, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Botânica), AC: Fisiologia Vegetal.

BOTUCATU
NOVEMBRO DE 2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
CAMPUS DE BOTUCATU
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA

REGULADORES VEGETAIS E POLIAMINAS NA ORGANOGÊNESE *IN VITRO* DE *Piper hispidinervium* CANDOLLE DE CANDOLLE: ANÁLISES BIOMÉTRICAS E BIOQUÍMICAS

LUCIANI MARCIA SCHERER SALVARO

PROF^a DR^a ELIZABETH ORIKA ONO

Orientadora

PROF^a DR^a GIUSEPPINA PACE PEREIRA LIMA

Co-Orientadora

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Botânica) do Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista-UNESP, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Botânica), AC: Fisiologia Vegetal.

BOTUCATU
NOVEMBRO DE 2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Salvaro, Luciani Márcia Scherer.

Reguladores vegetais e poliaminas na organogênese *in vitro* de *Piper hispidinervium* Candolle de Candolle: análise biométricas e bioquímicas / Luciani Márcia Scherer Salvaro. – Botucatu : [s.n.], 2010.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2010

Orientadora: Elizabeth Orika Ono

Co-orientadora: Giuseppina Pace Pereira Lima

Assunto CAPES: 21005001

1. Plantas medicinais - Uso terapêutico 2. Fisiologia vegetal

CDD 581.6

Palavras-chave: Antioxidantes; BAP; Flavonóides; IBA; Micropropagação; Peroxida-se; Poliaminas

DEDICATÓRIA

"O amor é paciente, o amor é bondoso. Não inveja, não se vangloria, não se orgulha. Não maltrata, não procura seus interesses, não se ira facilmente, não guarda rancor. O amor não se alegra com a injustiça, mas se alegra com a verdade. Tudo sofre, tudo crê, tudo espera, tudo suporta."

I Cor. 13 4:7

Ao meu esposo Alvaro, meu amado, meu
companheiro, por todo apoio e
compreensão nos meus momentos de
ausência

Amo você!

Aos familiares...

Aos meus pais, Egidio e Marli, pelo apoio e incentivo constantes ao longo de toda minha vida.

Ao meu irmão Luciano (o Doutor dos números) e minha cunhada Mariani por acreditarem em mim.

Aos meus familiares (tios e tias) que sempre dão uma forcinha e um incentivo

Aos meus sogros Eleda e Orlando, pelo carinho, confiança e incentivo, mesmo à distância. Também agradeço por todas as acolhidas para um pequeno descanso fora de hora, com direito a vista para o mar!!!

Em especial as minhas queridas cunhadas, Denise e Jussara que tanto me incentivaram e me encorajaram a lutar por mais esta conquista. Vocês fazem parte disso!

Também não posso deixar de lado os sobrinhos adquiridos, que de uma forma ou de outra sempre trouxeram algo de bom ao meu dia-a-dia: Nakita, Jardel e sua esposa Belonir!

Para Gracieli Cristina Weirich, em especial, pelo carinho e amizade ao longo de tantos anos! Já não é somente amiga e sim minha irmã que não tive!

Aos professores...

Uma vez orientador...

Sempre orientador!!!!

Uma dedicatória especial aos queridos Doutores que passaram pela minha vida: Andréa Maria Teixeira Fortes, Vandeir Francisco Guimarães, Elizabeth Orika Ono e Giuseppina Pace Pereira Lima.

Obrigado pela amizade, ajuda, confiança e ensinamentos!

AGRADECIMENTOS

À Deus, que sempre me abençoou com porção dobrada do Santo Espírito.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Elizabeth Orika Ono pela orientação, amizade e, sobretudo, pela confiança.

À minha co-orientadora e amiga, Prof^a Dr^a Giuseppina Pace Pereira Lima pelo carinho, ensinamentos, pela ajuda e tempo a mim dispensados, inclusive nos finais de semana!! Muito obrigada!!!!

Ao professor e amigo Vandeir Francisco Guimarães e sua esposa Márcia pela amizade e ajuda em todos os momentos em que precisei, e não foram poucos!

Aos colegas da Botânica Denise, Tatiana, Paula, Jaqueline, Juliana De Fazio e Valdir pela amizade e companheirismo. E também aos colegas que aqui não foram mencionados, mas que sem dúvidas foram importantes em algum período dessa jornada.

As colegas de laboratório, Suraya, Maria Rosecler e Camila, pelo carinho e apoio no momento das análises bioquímicas.

Aos funcionários do Departamento de Botânica, em especial a Adriana, ao José Eduardo e a Inara e também do Departamento de Química e Bioquímica, lembrando da Lurdes e da Elaine.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Botânica e da Horticultura.

Aos funcionários do FCA/UNESP.

Aos funcionários da seção de Pós-graduação do IB/UNESP, em especial a Luciene, Maria Helena, Sérgio e Herivaldo, pela presteza sempre que necessário.

À CAPES, pela concessão de bolsa de estudos.

E a todos aqueles que de alguma forma colaboraram com este trabalho.

"Tentar e falhar é pelo menos aprender. Não chegar a tentar é sofrer a inestimável perda do que poderia ter sido"

(Geraldo Eustáquio)

SUMÁRIO

RESUMO	2
ABSTRACT	2
1- INTRODUÇÃO	3
2- REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1- A pimenta longa (<i>Piper hispidinervium</i> C.DC.)	5
2.2- Metabolismo secundário	6
2.3- Cultura de células e tecidos vegetais e produção de metabólitos secundários <i>in vitro</i>	9
2.4- Atividade antioxidante	14
2.5- As poliaminas e sua ação nas plantas.....	16
2.6- Peroxidase (POD).....	18
CAPÍTULO I- BENZILAMINOPURINA (BAP) E ÁCIDO INDOLILBUTÍRICO (IBA) NA MICROPROPAGAÇÃO DE PIMENTA LONGA (<i>Piper hispidinervium</i> C.DC.).....	21
RESUMO	22
ABSTRACT	22
1- INTRODUÇÃO	23
2- MATERIAL E MÉTODOS	24
3- RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4- CONCLUSÕES.....	33
5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33
CAPÍTULO II- TEORES DE FLAVONÓIDES TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE PLÂNTULAS DE PIMENTA LONGA (<i>Piper hispidinervium</i> C.DC.) MICROPROPAGADAS COM REGULADORES VEGETAIS.....	36
RESUMO	37
ABSTRACT	37
1- INTRODUÇÃO	38
2- MATERIAL E MÉTODOS	40
2.1- Determinação do teor de flavonóides totais	42

2.2- Determinação da atividade antioxidante (DPPH)	42
2.3- Atividade da peroxidase	44
3- RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
3.1- Teores de flavonóides totais	44
3.2- Determinação da atividade antioxidante (AAO).....	47
3.3- Atividade da enzima peroxidase (POD).....	50
4- CONCLUSÕES.....	53
5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
CAPÍTULO III- POLIAMINAS EXÓGENAS E CITOCININA NA MICROPROPAGAÇÃO DE PIMENTA LONGA (<i>Piper hispidinervium</i> C.DC.) E TEORES ENDÓGENOS DE POLIAMINAS LIVRES.....	57
RESUMO	58
ABSTRACT	58
1- INTRODUÇÃO	59
2- MATERIAL E MÉTODOS	60
2.1- Teor de poliaminas livres	62
3- RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
3.1- Teor de poliaminas livres	68
4- CONCLUSÕES.....	72
5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
CAPÍTULO IV- POLIAMINAS EXÓGENAS E CITOCININA SOBRE O TEOR DE FLAVONÓIDES, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ATIVIDADE DA PEROXIDASE EM PIMENTA LONGA (<i>Piper hispidinervium</i> C.DC.).....	77
RESUMO	78
ABSTRACT	78
1- INTRODUÇÃO	79
2- MATERIAL E MÉTODOS	81
2.1- Determinação de flavonóides totais	82
2.2- Determinação da atividade antioxidante (DPPH)	83
2.3- Atividade da peroxidase	84
3- RESULTADOS E DISCUSSÃO	85
3.1- Teores de flavonóides totais.....	85

	10
3.2- Atividade antioxidante (AAO).....	87
3.3- Atividade da peroxidase (POD)	90
4- CONCLUSÕES.....	91
5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
3- CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	96
4- CONCLUSÃO GERAL	97
5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98
APÊNDICES	106
APÊNDICE I – Índice de atividade antioxidante - tratamentos com BAP e IBA....	107
APÊNDICE II – Índice de atividade antioxidante - tratamentos com poliaminas e BAP.	108

SCHERER-SALVARO, L.M. **Reguladores vegetais e poliaminas na organogênese *in vitro* de *Piper hispidinervium* Candolle De Candolle: análises biométricas e bioquímicas.** 2009. 108 p. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP.

RESUMO - O objetivo deste trabalho foi verificar a eficiência da técnica de micropropagação para a espécie *Piper hispidinervium*, utilizando reguladores vegetais e poliaminas e verificar a influência destes sobre o desenvolvimento dos explantes (número de raízes, número de brotações, formação de calo e altura), bem como verificar a influência da época de avaliação das plântulas sobre os teores de flavonóides totais, atividade antioxidante, atividade da peroxidase e teores endógenos de poliaminas livres. Microestacas obtidas da germinação *in vitro* foram inoculadas nos devidos tratamentos, os quais foram divididos em dois experimentos, o primeiro, utilizando concentrações de benzilaminopurina (BAP) isoladas e combinadas com ácido indolilbutírico (IBA) e o segundo, utilizando poliaminas (espermina- Spm e espermidina-Spd) adicionadas ao meio de cultura, isoladas, combinadas entre si e com BAP. Desta forma, no primeiro experimento os tratamentos foram: BAP (0,25; 0,50; 0,75 e 1,0 mg L⁻¹), isoladas ou combinadas com IBA (0,25 mg L⁻¹), o qual também foi utilizado isolado, totalizando 10 tratamentos, 3 repetições com 6 microestacas por repetição. No segundo experimento os tratamentos foram: T1: MS (testemunha); T2: 1mg L⁻¹ BAP; T3:1mM Spd; T4: 1m M Spd + 1mg L⁻¹ BAP; T5: 1mM Spm; T6: 1mM Spm + 1mg L⁻¹ BAP e T7: 1mM Spd + 1mM Spm. Aos 30 e 60 dias após a inoculação (DAI) foram realizadas as análises biométricas (formação de calo, número de raízes, número de brotações e altura das plântulas). No momento da inoculação (tempo 0), aos 30 e 60 DAI foram coletadas amostras para a realização das análises bioquímicas do teor de flavonóides totais, atividade antioxidante, atividade da peroxidase e teor endógeno de poliaminas livres (experimento 2). Nas condições realizadas no primeiro experimento, o IBA propiciou o maior crescimento das plântulas e induziu maior número de raízes, bem como maior teor de flavonóides. A atividade antioxidante e enzimática foi maior nos tratamentos com BAP e no segundo experimento, a Spm combinada com BAP resultou em plântulas com maior número brotos. O maior teor de flavonóides foi obtido na combinação de Spm e Spd.. A adição de poliaminas ao meio de cultura induziu o aumento no teor endógeno de Putrescina (Put). A atividade antioxidante e enzimática foi elevada na combinação de Spm e Spd.

Palavras-chave: micropropagação, flavonóides, antioxidantes, peroxidase, poliaminas, BAP, IBA

SCHERER-SALVARO, L.M. **Plant growth regulators and polyamines on organogenesis *in vitro* of the *Piper hispidinervium* Candolle De Candolle: biometric and biochemical analysis.** 2009. 108 p. Thesis (PhD) – Biosciences Institute, UNESP – São Paulo State University, Botucatu-SP.

ABSTRACT - The purpose of this paper was to evaluate the efficiency of the technique of micropropagation for the *Piper hispidinervium* species, using plant growth regulators and polyamines and also evaluate their influence on formation of callus, number of roots, number of shootings and height of explants and the influence of cutting time on the tenors of contents of totals flavonoids, antioxidant activity, activity of the peroxidase and endogenous contents of free polyamines. Microcuttings obtained of the germination *in vitro* were inoculated in the proper treatments, they were divided into two experiments, the first experiment, using benzilaminopurine (BAP) isolated and combined with indolilbutiric acid (IBA), and the second one, using polyamines (Espermine- Spm and Espermidine- Spd) added to the culture medium, isolated, combined among them and with BAP. Thus, in the first experiment, the treatments were: BAP (0.25; 0.50; 0.75 and 1.0 mg L⁻¹), isolated or combined with IBA (0.25 mg L⁻¹), and it was also used isolated, totalizing 10 treatments, 3 repetitions with 6 microcuttings for repetition. In the second experiment the treatments were: T1: MS (control); T2: 1 mg L⁻¹ BAP; T3: 1 mM Spd; T4: 1 mM Spd + 1 mg L⁻¹ BAP; T5: 1 mM Spm; T6: 1 mM Spm + 1 mg L⁻¹ BAP and T7: 1 mM Spd + 1 mM Spm. After 30 and 60 days of the inoculation (DAI) analysis were carried out (formation of callus, number of roots, number of shootings and height of explants). At the moment of the inoculation (time 0), at 30 and 60 DAI, samples were collected for the realization of biochemical analyses of contents totals of flavonoids, antioxidant activity, activity of the peroxidase and endogenous contents of free polyamines (only in the experiment 2). In the realized conditions, in the first experiment, the IBA favored the highest growth of the seedlings and induced a higher number of roots, as well as a higher content of flavonoids. The antioxidant activity and enzymatic was higher in the treatments with BAP and, in the second experiment, the Spm combined with BAP resulted in seedlings. A higher content of flavonoids was obtained in combination of Spm and Spd. The addition of polyamines to the culture medium only induced the increase in the endogenous contents of Putrescine (Put). The antioxidant activity and enzymatic was increased in the combination of Spm and Spd.

Key-words: micropropagation, flavonoids, antioxidants, peroxidase, polyamines, BAP, IBA

1- INTRODUÇÃO

A flora brasileira é rica em diversidade de espécies e, muitas delas, com grande valor econômico tanto no mercado nacional quanto no internacional. A Amazônia é o melhor exemplo dessa biodiversidade, embora apresente espécies ainda pouco conhecidas e pesquisadas (SANTIAGO, 2003).

Atualmente, grande demanda das pesquisas concentra-se nas atividades biológicas dos metabólitos secundários de plantas, os quais são utilizados há séculos na medicina popular e nos dias atuais, como medicamentos, cosméticos, matéria-prima para a química fina e, ainda, mais recentemente como nutracêuticos (BIAVATTI *et al.*, 2007; BARBOSA-FILHO *et al.*, 2008).

Nesse contexto insere-se a pimenta longa (*Piper hispidinervium* C.DC.), uma piperácea encontrada em abundância no Estado do Acre e de grande interesse econômico devido ao óleo essencial rico em safrol, presente nas folhas e talos finos. Além disso, vários estudos fitoquímicos têm sido conduzidos com espécies do gênero *Piper* no intuito de obter diversos metabólitos secundários (VALLE, 2003).

Além do interesse pelas plantas aromáticas e seus óleos essenciais, muitas pesquisas têm demonstrado os benefícios de alguns metabólitos secundários para a saúde humana, bem como os aspectos econômicos para sua exploração. Dentre esses metabólitos, podem-se citar os compostos fenólicos, um grupo quimicamente heterogêneo e com amplas funções nos vegetais. Os flavonóides constituem a maior classe de compostos fenólicos vegetais e possuem funções fotoprotetoras contra herbivoria, atividade polinizadora e inclusive atividade antioxidante (TAIZ & ZEIGER, 2009).

Estudos com espécies detentoras de compostos antioxidantes são importantes, pois, estes são capazes de diminuir os danos causados por espécies reativas de oxigênio (ROS), geradas por meio de processos oxidativos das células ou também por fatores externos (MATSINGOU *et al.*, 2003). As espécies reativas de oxigênio (ROS) são compostos que, segundo pesquisas realizadas, parecem estar ligados a doenças como o câncer, aterosclerose, diabetes, artrite e também cardiopatias (DEGASPARI & WASZCZYNSKYJ, 2004).

Vários trabalhos descrevem diferentes compostos com atividade antioxidantes (KOSAR *et al.*, 2005), porém, estudos com plantas cultivadas *in vitro* são escassos e também não se encontram relatados na literatura estudos a respeito destes compostos em

pimenta longa. Além disso, a utilização das técnicas de cultura de células e tecidos vegetais fornece plantas em qualquer época do ano e constitui uma importante ferramenta para estudos bioquímicos, o que tem conduzido os cientistas e biotecnologistas a considerá-las como uma maneira alternativa para produzir os correspondentes metabólitos secundários *in vitro* (FUMAGALI *et al.*, 2008).

Outra vantagem do emprego de tais técnicas se justifica pelo uso dos reguladores vegetais, bem como outros compostos com funções no crescimento e desenvolvimento vegetal, tais como as poliaminas. Mógor *et al.* (2007), utilizando as poliaminas exógenas espermina e espermidina em estudos com *Aloe vera in vitro*, concluíram que a adição destes compostos ao meio de cultura aumentou o teor de flavonóides, além de possuir ação antioxidante.

Trabalhando com *Salvia officinalis in vitro*, Lima *et al.* (2008) relatam que o uso do regulador vegetal benzilaminopurina (BAP) na concentração de 1 mg L^{-1} adicionado ao meio de cultura, induziu aos 60 dias após a inoculação (DAI) maior atividade antioxidante pelo método do DPPH. Além disso, os autores relatam que as plantas cultivadas em meio de cultura contendo BAP contêm maiores teores de fenóis totais solúveis.

Na literatura são encontrados poucos trabalhos com micropropagação de pimenta longa e a maioria dos estudos é direcionada a obtenção do safrol. Outras piperáceas de origem amazônica já têm sido relatadas como detentoras de compostos com atividade antioxidante: *Piper amapense*, *P. baccans*, *P. cyrtopodon*, *P. dilatatum*, *P. erectipilum*, *P. hostmanianum* e *P. tuberculatum* (NUNOMURA *et al.*, 2006).

Dessa forma, frente à importância econômica, bem como a carência de estudos com esta piperácea, o presente trabalho teve por objetivo estudar aspectos biométricos e bioquímicos da organogênese *in vitro*, bem como verificar a presença de compostos antioxidantes nas plântulas micropropagadas de pimenta longa.

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1- A pimenta longa (*Piper hispidinervium* C.DC.)

A família Piperaceae é classificada entre as mais primitivas famílias entre as angiospermas. É constituída de dez a doze gêneros e um grande e incerto número de espécies, que habitam lugares úmidos e sombrios das regiões tropicais (JOLY, 1993).

No Brasil, a família é representada por cinco gêneros: *Piper*, *Peperomia*, *Pothomorphe*, *Ottonia* e *Sarcorhachis* (SILVA, 2006). Dentre estes, destaca-se o gênero *Piper*, ao qual pertence a espécie em estudo, *Piper hispidinervium* e gênero *Peperomia*, por serem os mais representativos na flora brasileira e, também, os mais estudados quimicamente (BARROSO, 1978; MOREIRA *et al.*, 2000).

As piperáceas possuem importância econômica, ecológica e medicinal, sendo que muitas espécies têm sido utilizadas na alimentação e na medicina popular para o tratamento de muitas patologias, como do trato respiratório (asma, bronquite e tosse), do aparelho digestivo (dores abdominais e diarreias), anti-inflamatório (reumatismo), antimicrobiana (antibacteriana, antifúngica e para o tratamento de feridas) e antileucêmica (LEAL, 2000). Em virtude destas inúmeras indicações terapêuticas, as piperáceas constituem-se numa estimulante fonte para a pesquisa fitoquímica e biológica (MOREIRA *et al.*, 1995; BENEVIDES *et al.*, 1999).

A pimenta longa (*Piper hispidinervium*) é um arbusto de 2 a 7 m de altura, bastante nodoso, com caule geniculado (ROCHA & MING, 2001). Suas folhas são membranáceas ou cartáceas, elípticas, elíptico-ovadas ou elíptico-lanceoladas, com comprimento variando de 5 a 10 cm e largura de 4 a 7 cm, ápice curtamente acuminado, com base assimétrica arredondada ou cordiforme, opacas em ambas as faces, sendo a inferior pouco pubescente. As inflorescências são espigas alongadas, com comprimento de 7 a 14 cm e 2,5 a 3,5 mm de diâmetro, sendo as flores minúsculas e frutos obpiramidais (YUNKER, 1972).

A pimenta longa ocorre tipicamente em ambientes abertos com incidência direta de luz, apresentando sementes com baixa viabilidade em condições de ambiente natural. Áreas de pastagens apresentam bancos de sementes restritos, com dispersão o ano todo, tendo picos de produção de sementes em janeiro/fevereiro e junho/julho na região do Vale do Acre (ALMEIDA, 1999). É uma planta rústica, muito exigente em água e luz e

aparece com frequência em áreas de capoeira (EMBRAPA/Acre, 2001). Dessa forma, a pimenta longa é considerada uma espécie pioneira antrópica, por colonizar áreas abertas fora da floresta.

O óleo essencial obtido da parte aérea da pimenta longa é rico em safrol, sendo este um componente que, embora apresente atividades carcinogênicas *in vitro*, é de grande importância científico-tecnológica como precursor de uma variedade de compostos como fármacos, inseticidas biodegradáveis (piretróides naturais), fixadores de perfume (heliotropina) e, mais recentemente, de drogas antitrombóticas.

Segundo Valle (2003), Lago *et al.* (2004) e Nunomura *et al.* (2006), vários estudos fitoquímicos já vêm sendo conduzidos com outras piperáceas com o intuito de obter outros compostos úteis na fabricação de fármacos, cosméticos e, também, na indústria alimentícia. Desta forma, levando em consideração a importância econômica da pimenta longa face à produção do safrol, justificam-se estudos bioquímicos adicionais das plântulas, que permitam a exploração de compostos úteis para a indústria química, tais como compostos com propriedades antioxidantes.

2.2- Metabolismo secundário

Uma das principais características dos seres vivos é a presença de atividade metabólica, sendo de maneira geral, o metabolismo definido como um conjunto de reações químicas que ocorrem no interior das células. Nas plantas o metabolismo é dividido em dois tipos: o metabolismo primário e o secundário (TAIZ & ZEIGER, 2009).

Os metabólitos primários como os lipídios, as proteínas e carboidratos são de ocorrência universal em todos os seres vivos e estão envolvidos na respiração, assimilação de nutrientes, crescimento e desenvolvimento, sendo por isso, considerados essenciais (KLIEBENSTEIN, 2004). Já os metabólitos secundários são compostos de distribuição restrita e que nas plantas perfazem apenas 1% ou menos, do total de carbono, porém, sua diversidade estrutural entre as espécies vegetais é considerável (PICHESKY & GANG, 2000).

Ao contrário dos animais, as plantas são imóveis e por isso não são capazes de se locomover como resposta ao ataque de insetos e, muito menos, utilizam o sistema imunológico quando infectadas por fungos, bactérias ou vírus. Como alternativa às

plantas, só restou o convívio com micro-organismos e herbívoros e dessa interação surgiram estratégias de sobrevivência que incluíram a produção de defesa química (FUNASAKI, 2006). Dessa forma, pode-se dizer que os metabólitos secundários têm papel importante na adaptação das plantas aos seus ambientes, contribuindo assim, com o aumento da probabilidade de sobrevivência (FUMAGALI *et al.*, 2008).

De acordo com Taiz & Zeiger (2009), os metabólitos secundários são geralmente classificados com base em suas vias biossintéticas e os principais grupos são: compostos nitrogenados, terpenos e compostos fenólicos.

Os terpenos são substâncias sintetizadas a partir de diferentes rotas biossintéticas, entre elas a rota do ácido mevalônico que ocorre no citoplasma das células secretoras dos tricomas peltados. São formados pela fusão de unidades isoprênicas de cinco carbonos, sendo assim classificados pelo número de unidades pentacarbonadas que possuem, por exemplo, os de 10 carbonos que possuem duas unidades de 5C e assim por diante (TAIZ & ZEIGER, 2009).

Para as plantas, a principal importância dos terpenos é a defesa contra a herbivoria e, também, propriedades repelentes e inseticidas. Os óleos essenciais encontrados em muitos vegetais são formados por monoterpenos e sesquiterpenos voláteis, conferindo aromas característicos a certas espécies. Outros terpenos participam do desenvolvimento vegetal, como é o caso das citocininas, giberelinas e ácido abscísico, sendo estes, importantes hormônios vegetais. Os esteróis também são terpenos (triterpenos) essenciais na composição de membranas celulares, as quais são estabilizadas pela interação destes com os fosfolipídios. Os carotenóides de cor vermelha, amarela e laranja são tetraterpenos que agem como pigmentos acessórios na fotossíntese e protegem os tecidos fotossintéticos contra a fotoxidação (TAIZ & ZEIGER, 2009).

Os compostos nitrogenados, como o nome sugere, possuem nitrogênio em sua estrutura e incluem-se nesta categoria, alguns compostos conhecidos como os alcalóides e os glicosídeos cianogênicos. Muitos compostos nitrogenados são sintetizados a partir de aminoácidos comuns (TAIZ & ZEIGER, 2009). Entretanto, os alcalóides não são distribuídos de maneira uniforme no reino vegetal e são mais específicos para alguns gêneros e espécies vegetais. Esta distribuição restrita dos compostos secundários constitui a base da quimiotaxonomia e ecologia química (HARBORNE, 1988). O papel dos alcalóides nas plantas ainda é uma questão difícil de ser respondida, mas de acordo com Croteau *et al.* (2000), algumas respostas estão surgindo amparadas nas funções

ecoquímicas destes compostos. O papel dos alcalóides nas defesas químicas das plantas é sustentado pela grande variedade de efeitos fisiológicos que estes exercem sobre os animais e, também, por suas atividades antimicrobianas. Vários alcalóides são tóxicos aos insetos e atuam como repelentes para herbívoros (TAIZ & ZEIGER, 2009).

Os compostos fenólicos são amplamente distribuídos no reino vegetal (KOSAR *et al.*, 2004), sendo caracterizados por apresentarem um grupo fenol (grupo hidroxila funcional e um anel aromático), o que possibilita atuarem como agentes redutores, exercendo proteção ao organismo contra o estresse oxidativo (SCALBERT & WILLIAMSON, 2000).

Na indústria alimentícia e farmacêutica, os compostos fenólicos vêm atraindo a atenção dos pesquisadores devido ao seu uso potencial como antioxidantes naturais. Estas moléculas atuam como sequestradoras de radicais livres, prevenindo a peroxidação de lipídios (SOKMEN *et al.*, 2005), agindo na prevenção de doenças que envolvam a ação de radicais livres e a oxidação de lipoproteínas, como em problemas cardiovasculares, arteriosclerose e trombose (WANG & ZHANG, 2005), além de agirem modulando respostas fisiológicas em animais, como a vasodilatação e a inflamação (RICE-EVANS & PACKER, 2003).

Nas plantas, as principais propriedades dos compostos fenólicos são: defesa contra a herbivoria, inibição da germinação de sementes, crescimento de fungos e alelopatia, fenômeno onde algumas espécies de planta utilizam os compostos fenólicos para inibir o desenvolvimento de outras plantas nas proximidades. Harborne (1985) também enfatiza a importância dos fenilpropanóides como supressores do apetite de insetos. Além disso, contribuem no sabor, odor e coloração de diversos vegetais sendo muito usados como flavorizantes (aldeído cinâmico e vanilina), corantes na indústria alimentícia e cosmética (PROENÇA DA CUNHA *et al.*, 2003).

Enfatizam-se também, a atividade antioxidante dos derivados fenólicos de *Ilex paraguariensis* (erva-mate), *Camellia sinensis* (chá verde) dentre outros e a atividade antibacteriana, antiviral e antifúngica dos ésteres do ácido caféico (SIMÕES *et al.*, 1999).

Os compostos fenólicos estão agrupados em diversas categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonóides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis e ligninas (NACZK, 2004).

Os flavonóides constituem uma das maiores classes de compostos fenólicos. O esqueleto básico dos flavonóides contém 15 carbonos em um arranjo com dois anéis

aromáticos, ligados por uma cadeia de 3 carbonos aberta ou fechada. Esta estrutura é resultante de duas rotas biossintéticas separadas: a rota do ácido chiquímico, através da fenilalanina e a rota do ácido malônico. Os flavonóides são classificados em diferentes grupos, primeiramente, pelo grau de oxidação da cadeia de três carbonos. Os diferentes flavonóides desempenham funções diversas nos vegetais, incluindo pigmentação, proteção contra radiação ultravioleta (fotoprotetora) e defesa contra herbívoros e patógenos (TAIZ & ZEIGER, 2009).

O interesse pelos flavonóides tem aumentado nos últimos anos e tal fato se deve a crescente preocupação da população pela qualidade de vida, aliada a alimentação saudável. Fato é que os estudos comprovaram os benefícios dos flavonóides, bem como outros compostos fenólicos, para a saúde humana. A principal forma de obtenção destes compostos é através de alimentos considerados nutracêuticos, os quais se baseiam na ideia da cura pela alimentação. No entanto, formulações de produtos naturais também já podem ser adquiridas na forma de cápsulas. Outra forma de utilização desses compostos bioativos é através de formulações cosméticas, onde as empresas estão investindo cada vez mais em pesquisas por novos produtos retirados da própria natureza, fortalecendo a ideia do desenvolvimento sustentável.

2.3- Cultura de células e tecidos vegetais e produção de metabólitos secundários *in vitro*

A grande diversidade de produtos de origem vegetal faz desses uma fonte importante e ainda pouco explorada de recursos naturais. Estima-se que somente 5 a 15% das espécies de plantas superiores têm sido objeto de estudos quanto a sua composição química e atividade biológica dos seus metabólitos (CYSNE, 2006).

Nesse contexto, a cultura de tecidos se destaca como uma importante ferramenta de estudos dessas espécies. O termo cultura de tecido de plantas é definido por George (1993) como a ciência do crescimento de células, tecidos ou órgãos isolados de uma planta em um meio artificial, sob condições controladas de temperatura e luminosidade.

Teoricamente, qualquer tecido pode ser utilizado como explante (propágulo), em vista da totipotência (capacidade do tecido ou células de gerar órgãos e outras estruturas da planta) das células vegetais. Na prática procura-se utilizar explantes que contenham

maior proporção de tecido meristemático ou que tenham maior capacidade de expressar a totipotência (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

A aplicação mais prática da cultura de tecidos é a micropropagação, chamada assim devido ao tamanho dos seus explantes (TORRES *et al.*, 1998). No entanto, a cultura de células e tecidos vegetais também apresenta outras aplicações como na recuperação de plantas isentas de vírus (limpeza clonal), a conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas (conservação de germoplasma), a obtenção de mutantes *in vitro* e melhoramento genético, produção de plantas transgênicas (TORRES *et al.*, 1998) e, também, para obtenção de fitoquímicos de interesse comercial, através da cultura de células em suspensão (VALLE, 2003). No entanto, alguns estudos já demonstram que plântulas propagadas *in vitro* também podem ser interessantes para a obtenção de compostos de interesse econômico.

As técnicas de cultura de tecidos constituem excelente instrumento de trabalho à disposição de pesquisadores das mais diferentes áreas do conhecimento científico. O sucesso de um sistema de micropropagação depende, no entanto, de um grande número de variáveis, uma vez que cada espécie ou clone apresenta características únicas, determinadas por fatores genéticos (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Segundo Caldas *et al.* (1998), um dos fatores essenciais para o sucesso da cultura de tecidos vegetais são as formulações utilizadas no meio de cultura, as quais devem fornecer as substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro*. Além disso, as mesmas vias bioquímicas e metabólicas básicas que funcionam nas plantas são conservadas nas células cultivadas, embora alguns processos, como a fotossíntese, possam ser inativados pelas condições de cultivo e pelo estado de diferenciação das células.

Diversas formulações de meios básicos têm sido muito utilizadas na cultura de tecidos vegetais. Não há uma formulação padrão, mas o meio Murashige e Skoog (1962), com suas modificações e diluições têm apresentado bons resultados para diversas espécies. Sua composição é de macro e micronutrientes, vitaminas, fonte de carboidrato (geralmente, sacarose) e outros compostos orgânicos como aminoácidos (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Aos constituintes básicos do meio de cultura, podem ser adicionados ainda, os reguladores vegetais, os quais têm por finalidade suprir possíveis deficiências endógenas dos explantes, bem como auxiliar no seu desenvolvimento.

Os hormônios vegetais são compostos produzidos pelas plantas em pequenas quantidades, mas que produzem efeitos significativos nos locais de produção ou em outros sítios de ação, sendo responsáveis por muitos, senão todos, os aspectos do crescimento e desenvolvimento vegetal (TAIZ & ZEIGER, 2009). Além dos hormônios que as plantas produzem naturalmente, existem os análogos sintéticos, também conhecidos como reguladores vegetais que possuem vasta aplicação na agricultura e silvicultura moderna. A possibilidade de produção dos reguladores vegetais permitiu a o cultivo tecidos vegetais *in vitro* e definiu o sucesso da micropropagação clonal de plantas (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Entre os reguladores vegetais mais utilizados estão as auxinas, como o ácido indolilbutírico (IBA), ácido naftalenoacético (NAA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido indolilacético (IAA), dentre outros. A principal função das auxinas na cultura de tecidos vegetais é regular a divisão e alongamento celular e, também, induzir a formação do sistema radicial (TAIZ & ZEIGER, 2009). Além das auxinas, as citocininas como o benzilaminopurina (BAP) e cinetina (KT) também são empregadas visando à proliferação de brotações no explante (TOMBOLATO & COSTA, 1998).

Schwertner *et al.* (2008) utilizaram diferentes concentrações de BAP (0,5; 1,5; 3,0 e 5,0 mg L⁻¹) e de IAA (0,5; 1,5 e 3,0 mg L⁻¹) para propagar *in vitro* segmentos foliares de *Pothomorphe peltata*, uma piperácea muito utilizada como anti-inflamatório, vermífugo e contra a malária. Os autores relatam que o melhor tratamento para a proliferação de brotos foi com meio de cultura MS acrescido de 0,5 mg L⁻¹ de BAP. Além disso, os brotos separados, inoculados e mantidos por 30 dias em meio MS, isento de reguladores vegetais, apresentaram 100% de enraizamento.

Moura *et al.* (2008) propagaram ápices caulinares de *Piper nigrum in vitro* com diferentes concentrações de BAP (0,5; 1,5; 3,0 e 4,5 mg L⁻¹) combinadas ou não com carvão ativado a 0,2% adicionado ao meio de cultura. Segundo os autores, a concentração de 0,5 mg L⁻¹ de BAP na ausência de carvão ativado gerou maior número de brotos e explantes e o carvão ativado não se mostrou necessário na fase de proliferação de gemas de *Piper nigrum*. Na cultura de tecidos, o carvão ativado ajuda a controlar a oxidação do meio de cultura, a qual é tóxica para os explantes.

Em seu trabalho com pimenta longa, utilizando a técnica de cultura de tecidos vegetais com diferentes concentrações de BAP (1,0; 2,0 e 3,0 mg L⁻¹) e dois tipos distintos de meio de cultura, o MS de Murashige & Skoog (1962) e WPM de Lloyd & McCown (1986), Silva *et al.* (2006) relataram que nas condições realizadas, ambos os

meios de cultura acrescidos de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP não apresentaram diferença significativa. Porém, segundo os autores, o meio de cultura WPM acrescido de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP produziu maior número de brotações (3,3 brotações por explante). Os autores mencionam que em todas as concentrações utilizadas, o BAP induziu o desenvolvimento anormal das brotações, sugerindo que este regulador vegetal ou as concentrações utilizadas neste trabalho não foram eficientes.

Na literatura são encontrados poucos trabalhos envolvendo a propagação *in vitro* da pimenta longa e a maioria dos trabalhos citados concentra-se na obtenção do safrol em campo ou mesmo através da produção de calos *in vitro*. Santiago (2003) realizou a indução de calo em pimenta longa utilizando $27,135 \text{ } \mu\text{M}$ de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), $2,685 \text{ } \mu\text{M}$ de ácido naftalenoacético (NAA), $8,88 \text{ } \mu\text{M}$ de benzilaminopurina (BAP). Valle (2003) também realizou a indução de calo em pimenta longa, utilizando 5 mg L^{-1} de 2,4-D e $10,18 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP, visando a produção de calos friáveis para obtenção do safrol.

No que concerne à biotecnologia, pela utilização de técnicas de cultura de células e tecidos vegetais pode-se ressaltar que tais técnicas permitem a produção de diversas moléculas de interesse, como flavorizantes, corantes empregados na indústria, compostos bioativos importantes para a fabricação de fármacos e cosméticos (MILLAM *et al.*, 2005). Além disso, a produção de metabólitos secundários *in vitro* apresenta grande potencial para o conhecimento dos processos de biossíntese de tais compostos. Tal fato é compreendido porque a biossíntese dos metabólitos secundários está intimamente relacionada às condições ambientais. Estas condições promovem alterações tanto em rotas de síntese e degradação de compostos quanto na expressão gênica em resposta a algum tipo de estresse, promovendo alterações no crescimento e na quantidade ou qualidade dos compostos secundários produzidos pelos vegetais (BADI *et al.*, 2004; DJILIANOV *et al.*, 2005). Dessa forma, estudos podem ser conduzidos de acordo com os objetivos pretendidos e as culturas podem ser submetidas a distintas condições físicas e químicas, com o uso de precursores, eliciadores, estresses e bloqueadores de vias de síntese, levando a mudanças na produção de um determinado metabólito.

Muitos trabalhos estão sendo desenvolvidos na cultura de tecidos com várias espécies vegetais de interesse comercial. Segundo Staniszewska *et al.* (2003), é possível promover a biossíntese de compostos secundários, como a umbeliferona, em raízes de *Ammi majus* cultivadas *in vitro*.

Alguns trabalhos realizados com *Salvia officinalis* permitiram estudar o efeito da concentração de reguladores vegetais (cinetina) na produção de diterpenos fenólicos, principalmente do carnosol, um composto antioxidante (SANTOS-GOMES *et al.*, 2002). Lima *et al.* (2008) também trabalharam com *Salvia officinalis in vitro*. Os autores utilizaram meio de cultura MS, acrescido de concentrações de BAP e IBA e verificaram que a aplicação de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP no meio de cultura induziu aos 60 dias após a inoculação, maior atividade antioxidante nas plântulas e que o uso de BAP no meio de cultura induziu maiores teores de fenóis totais solúveis nesta espécie.

Machado *et al.* (2007) realizaram estudos de quantificação de flavonóides em culturas *in vitro* de *Hipericum perforatum*. Os autores utilizaram reguladores vegetais (auxinas e citocininas) e concentrações distintas, visando quantificar o teor de flavonóides em cultura de massas celulares, em brotações adventícias e em partes aéreas de plântulas. Os resultados demonstraram a presença de diferentes tipos de flavonóides em todos os segmentos testados. No entanto, os resultados chamam a atenção para a presença de rutina na parte aérea das plântulas ($4,70 \text{ mg g}^{-1} \text{ MS}$) em valores bem maiores do que na massa celular ($0,34 \text{ mg g}^{-1} \text{ MS}$) e nas brotações adventícias ($0,10 \text{ mg g}^{-1} \text{ MS}$).

Yepez *et al.* (2008) também utilizaram a cultura de células e tecidos vegetais para verificar o teor de carotenóides em calos e plântulas de *Pothomorphe umbellata*, uma piperácea de grande valor econômico devido suas propriedades medicinais. Os autores relatam que o maior teor de carotenóides foi obtido nas plântulas. Dessa forma, baseado nesses resultados e também nos resultados obtidos por Lima *et al.* (2008), a utilização da parte aérea de plântulas também pode ser estudada para a obtenção de metabólitos secundários, fato este em concordância com Fumagali *et al.* (2008).

Apesar dos grandes avanços na química sintética, a produção de metabólitos secundários de plantas, por muito tempo, vem sendo feita por cultivo das plantas medicinais. Por outro lado, plantas originárias de biótipos específicos podem ter muitas dificuldades para crescer fora de seus ecossistemas locais. Algumas espécies de plantas comuns não podem ser cultivadas em larga escala devido à sua susceptibilidade a patógenos. Isto tem conduzido os cientistas e biotecnologistas a considerarem as culturas de células, tecidos e órgãos como uma maneira alternativa para produzir os correspondentes metabólitos secundários *in vitro* (FUMAGALI *et al.*, 2008).

2.4- Atividade antioxidante

A crescente preocupação com hábitos mais saudáveis têm despertado o interesse da população para os produtos naturais com substâncias bioativas. Os antioxidantes obtidos diretamente das plantas são um bom exemplo da busca por hábitos mais saudáveis (VELLOSA *et al.*, 2007).

Apesar do uso terapêutico de plantas ser tão antigo quanto à própria espécie humana, o conhecimento de suas propriedades antioxidantes é relativamente recente. Observa-se nas últimas décadas o crescimento da investigação científica nessa área, envolvendo o efeito de extratos brutos, de frações purificadas ou de componentes isolados (ZHENG & WANG, 2001; WANG, 2001; PAREJO *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2005), destacando-se os compostos fenólicos que, em muitos estudos, têm demonstrado essa atividade (SKERGET *et al.*, 2005).

A aplicação de tais produtos se dá, principalmente, na área alimentícia, farmacológica e terapêutica, onde há a difusão da idéia de que os produtos naturais são mais seguros do que medicamentos sintéticos e, inclusive, são fontes naturais de substâncias antioxidantes (VELLOSA *et al.*, 2007).

As substâncias antioxidantes são capazes de retardar ou inibir a oxidação de um substrato, podendo bloquear a formação dos radicais livres ou interagir com estes, inativando-os (ARBOS, 2004). Por sua vez, os radicais livres, também chamados de espécies reativas de oxigênio (ROS) são intermediários da redução parcial do oxigênio e são produzidos continuamente nas células como produtos intermediários do metabolismo celular (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; CLARO, 2002). Nas plantas, os radicais livres são produzidos por reações bioquímicas, principalmente durante o processo de fotossíntese e respiração celular, dentre outros (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

O desequilíbrio entre a geração de ROS e os mecanismos de detoxificação destas espécies no organismo, com conseqüente elevação da concentração de radicais livres nas células acarreta o desenvolvimento de um quadro de estresse oxidativo (HALLIWELL, 1996). Muitas evidências têm sugerido o envolvimento do estresse oxidativo na fisiopatologia de várias doenças crônicas, tais como arteriosclerose, câncer e doenças degenerativas (BEAL, 2002; EL SHERBINY *et al.*, 2003; CAI *et al.*, 2004). Dessa forma, a utilização de substâncias com capacidade antioxidante pode ser de grande relevância na prevenção e terapêutica de doenças relacionadas com o

aumento do estresse oxidativo. Também não é novidade o uso de substâncias com potencial antioxidante em formulações cosméticas, com o intuito de combater os sinais de envelhecimento.

Um dos principais grupos de antioxidantes encontrados nas plantas são os compostos fenólicos, com destaque para a classe dos flavonóides. Os flavonóides, além da atividade antioxidante, também demonstram outras atividades biológicas importantes, tais como atividades anti-inflamatória, antialérgica, antimicrobiana, anticarcinogênica e efeitos imunoestimulantes (NIJVELDT *et al.*, 2001). A atividade antioxidante dos compostos fenólicos se deve, principalmente, às suas propriedades redox, permitindo a ação como agentes redutores ou doadores de hidrogênio. Além disso, eles também apresentam potencial quelante de metais (ATOUI *et al.*, 2005).

Vários trabalhos têm demonstrado a atividade antioxidante de algumas plantas utilizando diversos métodos, e um dos mais utilizados é o da redução do radical livre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), o qual tem sido utilizado para avaliar a capacidade de remoção de radicais através de reações com antioxidantes (ZHAO *et al.*, 2005).

Miliauskas *et al.* (2004) estudaram pela reação com DPPH a atividade antioxidante em *Salvia officinalis* e outras plantas e verificaram que a sálvia mostrou maior ação contra radicais livres. Comparando *Salvia miltiorrhiza* e *Panax ginseng*, Zhao *et al.* (2005) também notaram que o potencial antioxidante da sálvia foi maior, usando a mesma reação com DPPH.

Lima *et al.* (2008) trabalhando com sálvia, porém *in vitro*, utilizando o método do DPPH, relatam que a adição de BAP ao meio de cultivo, induziu maior potencial antioxidante nas plântulas aos 60 dias após a inoculação (DAI), e ainda, apresentou teores de flavonóides e fenóis superiores ao das plantas cultivadas em casa-de-vegetação. Os autores atribuem a atividade antioxidante ao elevado teor de fenóis, devido à presença de ácido rosmarínico, principal antioxidante em *Salvia officinalis*.

Em piperáceas, principalmente pimenta longa, as pesquisas por compostos com potencial antioxidante de plântulas obtidas pela propagação *in vitro* ainda são recentes. Entretanto, já existem trabalhos *ex vitro*, com outras piperáceas relatando a presença de compostos antioxidantes, determinados pelo método de DPPH, a saber: *Piper amapense* e *P. cyrtopodon* (NUNOMURA *et al.*, 2006).

De forma geral, estudos químicos realizados com espécies de *Piper* possibilitaram a identificação de uma grande variedade de novos compostos químicos pertencentes a diversas classes químicas, incluindo-se alcalóides, amidas, lignanas,

neolignanas, terpenos, esteróides, chalconas, flavonas e derivados de ácidos benzóicos (LAGO *et al.*, 2004). Muitas dessas são biologicamente ativas e têm apresentado potencial antitumoral, antimicrobiano, antifúngico, antioxidante, inseticida, larvicida entre outros (LAGO *et al.*, 2004).

Dessa forma, estudos com a pimenta longa justificam-se, principalmente, pela importância econômica da espécie e também, pela carência de estudos fitoquímicos, visando obter dados preliminares a respeito da presença de compostos com potencial antioxidante em plântulas micropropagadas.

2.5- As poliaminas e sua ação nas plantas

As poliaminas são aminas de baixo peso molecular, presentes em todas as células, tanto animais quanto vegetais (COLLI, 2008) e com papel importante na estabilização de membranas, proteínas e ácidos nucleicos (KAKKAR & SAWHNEY, 2002), sendo as mais abundantes a diamina putrescina (Put), a tetramina espermidina (Spd) e a triamina espermina (Spm) (COLLI, 2008).

Em dietas, recentemente, a importância das poliaminas têm sido destacada. A necessidade de poliaminas é dependente do estado fisiológico do indivíduo e, desta forma, acredita-se que as poliaminas estejam relacionadas com o crescimento e desenvolvimento (KALAC & KRAUSOVÁ, 2005), agindo possivelmente na proliferação e diferenciação celular (BARDÓCZ *et al.*, 1996), além de relacionarem-se intimamente com o crescimento de tumores (ELIASSEN *et al.*, 2002).

Segundo Colli (2008) em plantas, somente a partir da década de 1980, o papel das poliaminas na atividade metabólica de células vegetais passou a ser investigado. Em muitos estudos com plantas, as poliaminas têm sido descritas como reguladores vegetais; no entanto, o autor supracitado afirma que apesar de as poliaminas estarem envolvidas em vários processos do desenvolvimento vegetal, participando direta ou indiretamente de vias metabólicas essenciais para o funcionamento celular, essas substâncias são necessárias em maiores concentrações do que os hormônios convencionais para a produção de um mesmo efeito.

Ainda segundo Colli (2008), a biossíntese da putrescina ocorre através da L-arginina, através de duas vias metabólicas: na primeira, a putrescina é formada diretamente a partir da descarboxilação da L-ornitina pela enzima ornitina

descarboxilase (ODC), ou na segunda, por descarboxilação da L-arginina pela enzima arginina descarboxilase (ADC), formando a agmatina, que é convertida então a putrescina. A espermidina e a espermina são formadas a partir da putrescina e requerem a adição de grupos aminopropil provenientes da descarboxilação da S-adenosilmetionina (SAM).

Nas plantas, as poliaminas ocorrem na forma solúvel, como bases livres ou conjugadas, associadas com moléculas pequenas, tais como ácidos fenólicos e também, na forma insolúvel, ligada a várias macromoléculas, como proteínas (PAPADAKIS *et al.*, 2005). A relação quantitativa das poliaminas pode estar relacionada a condições externas, tais como luz, temperatura, variáveis químicas e agentes estressantes. A aplicação exógena de poliaminas em plantas ou em parte dela pode produzir efeitos visíveis, tais como formação de primórdios foliares em cultura de tecidos vegetais (ZAIDAN, 1998).

O papel das poliaminas e seu envolvimento em processos morfogênicos têm sido estudado, principalmente, pela aplicação de poliaminas exógenas e por correlação temporal e espacial da variação nos conteúdos destas substâncias associada com as diferentes fases da morfogênese (RIVERO, 2006).

Estudando o metabolismo de poliaminas em discos foliares de *Passiflora sp.*, Desai & Mehta (1985) observaram que entre as três aminas, a putrescina foi aquela que mais aumentou durante o aparecimento de brotos, raízes e indução de calos. O teor de espermidina não aumentou durante estes processos e o teor de espermina não mostrou mudanças significativas. Com base nestas observações, os autores sugerem que as poliaminas estejam envolvidas na organogênese de raízes e indução de calos. De acordo com Li *et al.* (1992), as poliaminas estariam envolvidas também no controle da senescência, uma vez que as vias metabólicas de síntese de poliaminas e etileno são competitivas.

Trabalhando com *Aloe vera in vitro*, Mógor *et al.* (2008) relatam que o maior valor de putrescina foi encontrado no tratamento contendo a mistura das poliaminas espermidina e espermina ($10 \text{ mmol}^{-1} \text{ Spd} + 10 \text{ mmol}^{-1} \text{ Spm}$), os quais apresentaram diferenças significativas dos demais tratamentos. Também segundo os autores, o maior teor de putrescina encontrado nos perfilhos, sugere que esses valores podem estar relacionados com o maior perfilhamento obtido nesse tratamento em relação aos demais. Desta forma, os teores de putrescina aumentam em tecidos em crescimento ativo. 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).

Em *Hemerocallis* sp. *in vitro*, a aplicação de putrescina isolada (10 μ M Put) ou combinada com espermidina (10 μ M Spd + 10 μ M Put) ou espermina (10 μ M Spm + 10 μ M Put), induziu as maiores médias em relação ao número e à altura de brotos diferenciados. Já a combinação das três poliaminas no meio de cultura (10 μ M Spd + 10 μ M Spm + 10 μ M Put) induziu maior porcentagem (60%) de formação de microplantas nos calos (DEBIASI *et al.*, 2007). Desta forma, o estudo das poliaminas vem sendo utilizado para otimizar os processos de desenvolvimento das plantas, tais como as técnicas de cultura de tecidos vegetais em espécies de importância agrônômica e para esclarecer os eventos regulatórios da morfogênese *in vitro* (KAKKAR *et al.*, 2000; SHOEB *et al.*, 2001). Além disso, as poliaminas também exercem efeito protetor e quando usadas exogenamente, tendem a induzir menor taxa de oxidação (LOVAAS, 1996; TANG *et al.*, 2004), agindo como possível antioxidante o que justifica seu uso na propagação *in vitro*.

2.6- Peroxidase (POD)

A iniciação de órgãos e o seu desenvolvimento em explantes vegetais envolvem a promoção da atividade meristemática, sendo esta mantida em algumas regiões e, concomitantemente, suprimida em regiões de maturação. Algumas enzimas podem ser cruciais no desenvolvimento, uma vez que são partes integrantes de uma série de eventos fisiológicos e bioquímicos nas plantas e uma delas é a peroxidase (SOUZA, 2002).

A peroxidase (E.C.1.11.1.7) (POD) é composta por uma única cadeia peptídica contendo um grupo heme, sendo a enzima vegetal (distinta das POD's de animais superiores) composta de aproximadamente 25% de carboidratos e encontrada em praticamente todas as plantas (VIU, 2000). Além disso, é uma enzima capaz de utilizar peróxido de hidrogênio (H₂O₂) para oxidar uma ampla quantidade de doadores de hidrogênio, assim como substâncias fenólicas, ácido ascórbico, nitrito, aminas e alguns íons inorgânicos (SAUNDERS *et al.*, 1964; REGALADO *et al.*, 2004).

Assim, a peroxidase é uma enzima que serve para indicar processos fisiológicos nos vegetais, dentre eles oxidação de compostos fenólicos e biossíntese de etileno e lignina (ASADA, 1992). Alguns eventos morfológicos também podem ser modulados pela enzima peroxidase, inclusive aqueles em resposta a agentes físicos, químicos e aos estresses, bióticos ou abióticos, e morfológicos nos vegetais (LIMA *et al.*, 1999; SOUZA, 2002). Ainda segundo Da Costa *et al.* (1979), a peroxidase está relacionada com a regulação do nível endógeno de IAA, com mecanismos de resistência a doenças, regulação de permeabilidade de membranas e também, com a formação da parede celular.

Tavares (2000) relatou que as plântulas de bromélia, *Aechmea distichantha*, apresentaram aumento na atividade da peroxidase aos 15 dias de cultivo, início da fase de enraizamento e posterior queda aos 30 dias. Dessa forma, o aumento na atividade específica da peroxidase antes da iniciação e crescimento dos primórdios radiculares em plantas micropropagadas pode servir como marcador do desempenho no enraizamento (MATO *et al.*, 1988).

Fráguas *et al.* (2003) relatam que a atividade da peroxidase foi elevada aos 15 dias do cultivo *in vitro* de gemas axilares de abacaxi (*Ananas comosus* L. Merrill) em meio contendo NaCl. Segundo os autores, a maior atividade da peroxidase aos 15 dias, conforme descrito, parece estar relacionada a fatores estressantes, como coleta, preparo e manuseio dos explantes, início da cultura *in vitro* e níveis de salinidade aos quais as gemas foram expostas, causando aumento na atividade da enzima, provavelmente com a finalidade de promover adaptação dos explantes às condições *in vitro*, de modo a permitir o crescimento em meio salino.

Mógor *et al.* (2007) relatam que tecidos em ativo crescimento de *Aloe vera* propagada *in vitro* apresentaram elevada atividade da peroxidase, assim como aqueles com maior taxa de oxidação. Os autores relatam ainda que, o uso de poliaminas exógenas adicionadas ao meio de cultura preveniu a oxidação dos tecidos.

A oxidação de tecidos vegetais cultivados *in vitro* é um fenômeno observado em diversas espécies (TANG *et al.*, 2004). Assim como no trabalho de Mógor *et al.* (2007), os autores Laukkanen *et al.* (2000) também relatam que a peroxidase apresenta alterações na atividade em tecidos que mostram algum tipo de escurecimento.

Lima *et al.* (2002) relatam em seu trabalho com micropropagação de mandioca, que a adição de auxina ao meio de cultura pode ter prevenido a oxidação dos tecidos, resultando em menor atividade enzimática. Fato este confirmado também por Basu *et al.*

(1998) que afirmam que a atividade da peroxidase é significativamente reduzida em tecidos tratados com auxina.

**CAPÍTULO I- BENZILAMINOPURINA (BAP) E ÁCIDO INDOLILBUTÍRICO
(IBA) NA MICROPROPAGAÇÃO DE PIMENTA LONGA (*Piper
hispidinervium* C.DC.)**

BENZILAMINOPURINA (BAP) E ÁCIDO INDOLILBUTÍRICO (IBA) NA MICROPROPAGAÇÃO DE PIMENTA LONGA (*Piper hispidinervium* C.DC.)

Luciani Marcia Scherer Salvaro, Elizabeth Orika Ono, Débora Zanoni do Prado,
Giuseppina Pace Pereira Lima

RESUMO - A pimenta longa (*Piper hispidinervium*) é uma piperácea utilizada como fonte natural de safrol, um óleo essencial de grande importância econômica. Na literatura são escassos os trabalhos com micropropagação envolvendo essa planta. Assim, o objetivo deste trabalho foi verificar a eficiência da técnica de micropropagação no estabelecimento da pimenta longa *in vitro* utilizando benzilaminopurina (BAP) em diferentes concentrações (0,25; 0,50; 0,75 e 1,0 mg L⁻¹), isoladas ou combinadas com ácido indolilbutírico (IBA) na concentração de 0,25 mg L⁻¹. Microestacas de pimenta longa obtidas da germinação *in vitro* foram inoculadas em meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) acrescido dos tratamentos e mantidas em temperatura de 25°C e fotoperíodo de 16 horas/luz. Foram inoculadas três repetições para cada tratamento. Aos 30 dias, os explantes foram avaliados quanto ao número de raízes por explante, número de brotos, altura das plântulas e porcentagem de formação de calo. Nas condições realizadas houve formação de calo em todos os tratamentos contendo BAP e as brotações também apresentaram aspectos anormais. Os tratamentos com BAP apresentaram maior número de brotos. Houve formação de raízes na testemunha e no tratamento com IBA isolado, o qual também resultou em maior altura de plântulas. Os resultados obtidos demonstram que a micropropagação constitui-se numa boa alternativa para a pimenta longa. No entanto, são necessários estudos adicionais com outros reguladores vegetais e concentrações para determinar o melhor tratamento para obtenção de plântulas normais.

Palavras-chave: diferenciação, brotação, calo, cultivo *in vitro*

BENZYLAMINOPURINE AND INDOLILBUTYRIC ACID ON THE MICROPROPAGATION OF LONG PEPPER (*Piper hispidinervium* C.DC.)

Luciani Marcia Scherer Salvaro, Elizabeth Orika Ono, Débora Zanoni do Prado,
Giuseppina Pace Pereira Lima

ABSTRACT - The long pepper (*Piper hispidinervium* C.DC.) is a piperaceae used as natural fountain of safrol, an essential oil of great economical importance. In the literature, papers about the micropropagation of this plant are scarce. So, the purpose of this paper was to check the efficiency of the technique of micropropagation in the establishment of the long pepper using benzilaminopurina (BAP) in different concentrations (0.25; 0.50; 0.75 and 1.0 mg L⁻¹), isolated or combined with indolilbutyric acid (IBA) (0.25 mg L⁻¹). Microcuttings of long pepper obtained of the germination *in vitro* in MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) culture medium were inoculated in the treatments and they were kept in temperature of 25°C and photoperiod of 16 hours. Three repetitions were inoculated for each treatment and at 30 and 60 DAI

the explants were evaluated on the number of roots for explants, number of shoots, height of explants and percentage of formation of callus. In the realized conditions callus were formed in all the treatments containing BAP and the shoots also presented abnormal aspects. Nevertheless, the treatments with BAP presented a higher number of shoots. The formation of roots occurred in the control and in the treatment with IBA isolated, it also resulted in a bigger height (cm) for explants. The results obtained demonstrate that the micropropagation constitutes in a good alternative for the long pepper, however, additional studies with other plant growth regulators and concentrations are necessary to determine the best treatment to get normal seedlings

Key-words: differentiation, sprout, callus, *in vitro* culture

1- INTRODUÇÃO

A flora brasileira é rica em diversidade de espécies, muitas delas, com grande valor econômico tanto no mercado nacional quanto no internacional. A Amazônia é o melhor exemplo dessa biodiversidade, embora apresente espécies ainda pouco conhecidas e pesquisadas (SANTIAGO, 2003). O Acre, um estado tipicamente florestal, está inserido na porção ocidental da Amazônia Brasileira (WADT, 2001) e também, abriga um número considerável de espécies de interesse econômico.

Com o aumento da população mundial houve uma exploração desenfreada dos recursos naturais, tanto vegetais quanto minerais, pela indústria farmacêutica, química, alimentícia e cosmética. Uma visão imediatista, buscando recursos em curto prazo, levou a uma contínua e progressiva devastação florestal, causando prejuízos incalculáveis ao meio ambiente e inclusive ao homem. Ações como a exploração dos recursos naturais, através do extrativismo tradicional, o qual se baseia na extração indiscriminada, sem nenhuma preocupação com a regeneração e sustentabilidade da produção, contribuiu para a escassez de muitos recursos naturais, ocasionando redução da oferta do produto bruto no mercado industrial (WADT, 2001).

Um exemplo dessa exploração é o caso do óleo de sassafrás, extraído de espécies em risco de extinção como *Ocotea odorifera* Ness (Mez), *Cynamomum petrophilum*, *C. mollissimum* e *Sassafras albidum* Nutt, as quais foram derrubadas para a obtenção do óleo. As folhas e talos finos dessas espécies apresentam alto teor de safrol (cerca de 85 a 95%), uma importante matéria prima para a indústria química e farmacêutica (VALLE, 2003).

Nesse contexto, a descoberta da pimenta longa (*Piper hipidinervium* Candolle, De Candolle), uma piperácea rústica encontrada na América do Sul, em países como

Peru e Bolívia e no Vale do Acre (AC) no Brasil (ROCHA & MING, 2000), tem se caracterizado como uma das maiores promessas brasileiras para a fitoquímica mundial (VALLE, 2003).

A pimenta longa é uma fonte natural de safrol, o qual se concentra na copa (folhas e ramos jovens apresentam mais de 90% de safrol), sendo que a espécie rebrota facilmente após o corte, viabilizando sua implantação e exploração comercial de forma sustentável (SANTIAGO, 2003).

No entanto, durante seu ciclo de vida, é exigente em luz e água, sendo por isso muito comum no Vale do Acre, onde a umidade média anual está em torno de 80 a 90%, crescendo geralmente em áreas de pastagens, sendo até considerada invasora pelos agricultores (PIMENTEL, 2001). Em outras regiões do país são necessários estudos a respeito da sua adaptação para a implantação da cultura e obtenção do safrol, pois conforme Fumagali *et al.* (2008), plantas originárias de ecossistemas específicos podem apresentar deficiências no desenvolvimento em outros locais.

Dessa forma, a micropropagação apresenta-se como uma ferramenta essencial para estudos com espécies como a pimenta longa. As vantagens da utilização de técnicas *in vitro* vão desde a produção de metabólitos secundários de interesse, até a produção em larga escala de mudas em tempo relativamente inferior aos métodos de propagação convencional. Além disso, é possível superar muitos problemas encontrados na produção a campo, como o ataque de pragas, deficiências nutricionais e também, a influência da sazonalidade (VALLE, 2003).

Na literatura são encontrados poucos trabalhos envolvendo a propagação *in vitro* da pimenta longa. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a eficiência da micropropagação para o estabelecimento de plântulas *in vitro* de pimenta longa utilizando os reguladores vegetais, benzilaminopurina (BAP) e ácido indolilbutírico (IBA), uma citocinina e uma auxina, respectivamente.

2- MATERIAL E MÉTODOS

O material vegetal utilizado neste experimento foi coletado no jardim clonal da Faculdade de Ciências Agrônômicas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FCA/UNESP), Campus de Botucatu-SP. A coleta do material vegetal

ocorreu no período de fevereiro a março de 2008 e a condução dos experimentos foi realizada no período de março a dezembro de 2008.

Foram coletadas espiguetas de pimenta longa apresentando coloração verde escura com sementes de coloração preta, indicando seu amadurecimento (PIMENTEL, 2001).

As espiguetas foram transportadas em vidros com tampa plástica até o Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, do Departamento de Química e Bioquímica, IB/UNESP, Campus de Botucatu-SP, onde foi realizado o beneficiamento das sementes de acordo com a metodologia proposta por Pimentel (2001).

Para o beneficiamento as espiguetas contendo as sementes foram deixadas de molho em água destilada por um período de 24 horas, sendo a seguir maceradas para liberarem as sementes. Com o auxílio de um tecido fino, as sementes foram lavadas sucessivamente até que não houvesse mais resíduos. Posteriormente à lavagem, as sementes foram submetidas à secagem em temperatura ambiente, em local ventilado e sobre papel filtro, durante 5 dias.

Após a secagem, as sementes foram inoculadas assepticamente em câmara de fluxo laminar, em frascos de vidro para cultura de tecidos vegetais, com capacidade para 200 mL, contendo 20 mL do meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), isento de reguladores vegetais, acrescido de 3% de sacarose, geleificado com ágar e autoclavado a 121°C, durante 20 minutos.

O processo de assepsia das sementes foi realizado anteriormente à inoculação e dentro da câmara de fluxo laminar. Fora da câmara de fluxo laminar, as sementes foram lavadas em água destilada contendo algumas gotas de detergente e, posteriormente, enxaguadas em água destilada por três vezes. Em seguida, as sementes foram mergulhadas em etanol 70% durante 1 minuto e levadas para a câmara de fluxo laminar, previamente desinfestada com etanol 70%, hipoclorito de sódio 10% e também, com uma solução bactericida (Lysoform®) na concentração de 10%.

Após o primeiro minuto em etanol 70% e já dentro da câmara de fluxo laminar, as sementes foram então mergulhadas em solução de hipoclorito de sódio 10% durante 10 minutos, sendo depois realizada a tríplex lavagem em água destilada e autoclavada.

Em seguida, os frascos contendo as sementes foram mantidos em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas/luz e à temperatura de 26°C ± 2 e intensidade luminosa de 2000 Lux.

As plântulas formadas e com aproximadamente 3 cm de altura (microestacas), com um par de folhas expandidas, inclusive as cotiledonares e desprovidas de raízes foram utilizadas como explantes para a realização deste trabalho.

Desta forma, as microestacas obtidas da germinação *in vitro* foram inoculadas em meio de cultura MS, acrescido de concentrações de BAP e IBA, conforme a tabela 1.

As microestacas foram inoculadas nos devidos tratamentos, assepticamente em câmara de fluxo laminar, em vidros contendo 20 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) acrescido de 30 g de sacarose, sendo o pH ajustado para 5,8. O meio de cultura foi geleificado com ágar e autoclavado a 121°C, durante 20 minutos.

TABELA 1: Tratamentos com diferentes concentrações de benzilaminopurina (BAP), isoladas ou combinadas com ácido indolilbutírico (IBA), em meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) visando a organogênese *in vitro* de *Piper hispidinervium* C.DC., a partir de microestacas oriundas da germinação *in vitro*. UNESP/Botucatu-SP, 2009.

Tratamento	Concentração
T1	MS (testemunha)
T2	MS + 0,25 mg L ⁻¹ BAP
T3	MS + 0,50 mg L ⁻¹ BAP
T4	MS + 0,75 mg L ⁻¹ BAP
T5	MS + 1,0 mg L ⁻¹ BAP
T6	MS + 0,25 mg L ⁻¹ BAP + 0,25 mg L ⁻¹ IBA
T7	MS + 0,50 mg L ⁻¹ BAP + 0,25 mg L ⁻¹ IBA
T8	MS + 0,75 mg L ⁻¹ BAP + 0,25 mg L ⁻¹ IBA
T9	MS + 1,0 mg L ⁻¹ BAP + 0,25 mg L ⁻¹ IBA
T10	MS + 0,25 mg L ⁻¹ IBA

Após a inoculação, os vidros contendo as microestacas de pimenta longa foram mantidos em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas/luz, à temperatura de 26°C±2 e sob intensidade luminosa de 2000 Lux.

As análises biométricas foram realizadas aos 30 e 60 dias após a inoculação (DAI), onde foram avaliadas: a porcentagem de formação de calo, o número de raízes e brotos (adventícios) por explante e altura (cm) das plântulas.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, sendo 10 tratamentos, 3 repetições e 6 microestacas por repetição. Os dados foram submetidos à análise de variância (teste F) e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a tabela 2 observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos para as características biométricas (número de raízes e brotações e altura dos explantes). Quanto à porcentagem de formação de calo verificou-se que somente a testemunha e o tratamento com 0,25 mg L⁻¹ de IBA não apresentaram calo. Os demais tratamentos, do 2 ao 9 (T2 0,25 mg L⁻¹ BAP; T3 0,50 mg L⁻¹ BAP; T4 0,75 mg L⁻¹ BAP; T5 1,0 mg L⁻¹ BAP; T6 0,25 mg L⁻¹ BAP + 0,25 mg L⁻¹ IBA; T7 0,50 mg L⁻¹ BAP + 0,25 mg L⁻¹ IBA; T8 0,75 mg L⁻¹ BAP + 0,25 mg L⁻¹ IBA e T9 1,0 mg L⁻¹ BAP+0,25 mg L⁻¹ IBA) apresentaram 100% de formação de calo na base dos explantes. Como não houve variação entre as repetições dentro dos tratamentos, os dados não estão apresentados em tabelas.

TABELA 2: Análise de variância do número de raiz, brotos e altura de plântulas de *Piper hispidinervium* C.DC. obtidas da micropropagação em meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) acrescido de ácido indolilbutírico (IBA) isolado e combinado com diferentes concentrações de benzilaminopurina (BAP), com avaliação aos 30 e 60 dias após a inoculação (DAI). UNESP/Botucatu-SP, 2009.

Quadrado médio (30 DAI)				
Fonte de variação (F.V.)	GL	Raiz	Brotos	Altura
Tratamento	9	303,411*	548,018*	1240,625*
Repetição	2	0,533	38,633	16,3
Resíduo	18			
C.V. (%)		10,52	26,09	14,27
Quadrado médio (60 DAI)				
Tratamento	9	341,170*	40121,588*	2887,277*
Repetição	2	613,3	135485,2	2,5
Resíduo	18			
C.V. (%)		15,43	14,80	6,28

* significativo a 5% de probabilidade pelo teste F

Em relação ao número de raízes por explantes, observa-se na tabela 3 que, aos 30 DAI somente a testemunha e o tratamento 10 (0,25 mg L⁻¹ de IBA) apresentaram formação de raízes e não diferiram significativamente entre si. Já aos 60 DAI, o tratamento com IBA isolado apresentou maior número de raízes por explante (11,27), demonstrando a participação da auxina no desenvolvimento vegetal, inclusive, na formação de raízes (TAIZ & ZEIGER, 2009). Apesar disso, ressalta-se que a testemunha possivelmente apresenta balanço hormonal endógeno favorável, visto que também apresentou enraizamento (LIMA *et al.*, 2008). Schwertner *et al.* (2008) também relatam o enraizamento de caapeba [*Pothomorphe peltata* (L.) Miq], uma piperácea, em meio MS isento de reguladores vegetais.

Os demais tratamentos não apresentaram enraizamento, o que pode ser justificado pelo balanço hormonal favorável a citocinina (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

TABELA 3: Número de raízes em plântulas de *Piper hispidinervium* C.DC. obtidas da micropropagação em meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) acrescido de ácido indolilbutírico (IBA) isolado e combinado com diferentes concentrações de benzilaminopurina (BAP), com avaliação aos 30 e 60 dias após a inoculação (DAI). UNESP/Botucatu-SP, 2009.

Tratamentos	Número de raízes em plântulas micropropagadas de <i>P. hispidinervium</i>	
	30 DAI	60 DAI
T1- MS Testemunha	8,61 A	8,61 B
T2- 0,25 mg L ⁻¹ BAP	0,00 D	0,00 D
T3- 0,50 mg L ⁻¹ BAP	0,00 D	0,00 D
T4- 0,75 mg L ⁻¹ BAP	0,00 D	0,00 D
T5- 1,0 mg L ⁻¹ BAP	0,00 D	0,00 D
T6- 0,25 mg L ⁻¹ BAP+0,25 mg L ⁻¹ IBA	0,00 D	3,06 C
T7- 0,50 mg L ⁻¹ BAP+0,25 mg L ⁻¹ IBA	0,00 D	0,00 D
T8- 0,75 mg L ⁻¹ BAP+0,25 mg L ⁻¹ IBA	0,00 D	0,00 D
T9- 1,0 mg L ⁻¹ BAP+0,25 mg L ⁻¹ IBA	0,00 D	0,00 D
T10- 0,25 mg L ⁻¹ IBA	9,56 A	11,27 A
C.V. (%)	10,52	15,43

Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Aos 60 DAI, mesmo com a presença de calo na base dos explantes, o tratamento com 0,25 mg L⁻¹ de BAP + 0,25 mg L⁻¹ de IBA apresentou formação de raízes (3,06 raízes por explante). Segundo Tombolato e Costa (1998), o balanço hormonal equilibrado entre auxina e citocinina resulta em formação de calo, o qual pode prejudicar o enraizamento, não sendo desejável na cultura de tecidos vegetais (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998), exceto quando o objetivo da cultura é a produção e obtenção de metabólitos secundários *in vitro* (VENTURIERI & VENTURIERI, 2004).

No entanto, verificou-se neste trabalho que a formação de calo ocorreu em todos os tratamentos (exceto na testemunha e no T10), independentemente do balanço hormonal adicionado ao meio de cultura. Silva *et al.* (2003) relataram a formação de calo na micropropagação de ápices caulinares de *Baccharis trimera* (carqueja) utilizando concentrações isoladas de BAP e cinetina e também na combinação destes com ácido naftalenoacético (NAA). Tal resultado concorda com o obtido neste trabalho,

onde os tratamentos com citocinina isolada e combinada com auxina apresentaram formação de calo. Qui-Guang *et al.* (1986) também relatam o efeito do BAP na formação de calo em *Castanea mollissima* e sugerem que tal efeito seja decorrente do excesso deste regulador vegetal no meio de cultura. Tal fato também é relatado por Grattapaglia e Machado (1998).

Quanto ao número de brotos por explante, observa-se na tabela 4 que a testemunha e o tratamento com IBA isolado não apresentaram formação de brotos. Aos 30 DAI, observa-se que não houve diferença significativa entre os tratamentos (T2 ao T9), mas, apesar disso, o tratamento com 1,0 mg L⁻¹ de BAP apresentou maior número de brotos por explante (20,83). Aos 60 DAI, o tratamento contendo 0,25 mg L⁻¹ de BAP + 0,25 mg L⁻¹ IBA apresentou maior número de brotos por explante (31,89), no entanto, este não diferiu significativamente dos tratamentos contendo o BAP isolado.

TABELA 4: Número de brotos em plântulas de *Piper hispidinervium* C.DC. obtidas da micropropagação em meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) acrescido de ácido indolilbutírico (IBA) isolado e combinado com diferentes concentrações de benzilaminopurina (BAP), com avaliação aos 30 e 60 dias após a inoculação (DAI).UNESP/Botucatu-SP, 2009.

Tratamentos	Número de brotos em plântulas micropropagadas de <i>P. hispidinervium</i>	
	30 DAI	60 DAI
T1- MS Testemunha	0,00 B	0,00 D
T2- 0,25 mg L ⁻¹ BAP	15,55 A	26,00 A
T3- 0,50 mg L ⁻¹ BAP	19,40 A	27,76 A
T4- 0,75 mg L ⁻¹ BAP	17,66 A	26,36 A
T5- 1,0 mg L ⁻¹ BAP	20,83 A	28,72 A
T6- 0,25 mg L ⁻¹ BAP+0,25 mg L ⁻¹ IBA	10,16 A	31,89 A
T7- 0,50 mg L ⁻¹ BAP+0,25 mg L ⁻¹ IBA	13,36 A	23,11 B
T8- 0,75 mg L ⁻¹ BAP+0,25 mg L ⁻¹ IBA	9,70 A	17,55 C
T9- 1,0 mg L ⁻¹ BAP+0,25 mg L ⁻¹ IBA	10,06 A	23,55 B
T10- 0,25 mg L ⁻¹ IBA	0,00 B	0,00 D
C.V (%)	26,09	14,80

Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott 5%

Considerando-se que neste trabalho as microestacas foram inoculadas com a gema apical intacta, sugere-se que os resultados obtidos quanto ao número de brotos são

atribuídos à quebra da dominância apical, e indução de proliferação de gemas axilares promovido pela citocinina (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). A micropropagação de *Pothomorphe peltata* (L.) Miq. também produziu maior número de brotações em meio de cultura MS acrescido de 0,5 mg L⁻¹ de BAP, isoladamente (SCHWERTNER *et al.*, 2008).

Apesar dos resultados obtidos em relação ao número de brotações, pode-se também verificar visualmente o efeito tóxico do excesso de BAP no meio de cultura, principalmente no tratamento com 1,0 mg L⁻¹ de BAP. Diversos autores relatam o efeito tóxico do BAP no meio de cultura (QI-GUANG *et al.*, 1986; LESHEM *et al.*, 1988; ERIG *et al.*, 2002) e tais efeitos incluem entufamento e falta de alongamento das culturas, encurtamento dos entrenós, engrossamento exagerado do caule e hiperhidricidade, o que pode dificultar o enraizamento. Silva *et al.* (2006) também relatam o efeito tóxico do BAP na micropropagação de pimenta longa utilizando a concentração de 1,0 mg L⁻¹ BAP, os autores também concluíram que microestacas de pimenta longa cultivadas em meio desprovido de BAP apresentam maior altura média de explantes, fato este que concorda com o presente trabalho.

Além do exposto no parágrafo supracitado, alguns aspectos qualitativos devem ser considerados. Não basta conseguir altas taxas de multiplicação nos explantes e sim obter uma média satisfatória com o mínimo de variação de explante para explante e, ainda mais importante, é a qualidade das partes aéreas produzidas, pois isso determina o sucesso na fase de enraizamento e, posteriormente, aclimatação das plântulas.

A oxidação dos explantes também é um fator limitante para o desenvolvimento das culturas e tem sido observada com frequência em calos (TANG *et al.*, 2004). Neste trabalho observou-se que todos os tratamentos, com exceção da testemunha e do T10 (0,25 mg L⁻¹ IBA), apresentaram oxidação.

Em relação à altura das plântulas (tabela 5), observa-se que o tratamento T10 apresentou plântulas com maiores alturas, seguido pela testemunha. No tratamento T10 (0,25 mg L⁻¹ IBA) fica evidenciada a participação da auxina no processo de expansão e alongamento celular, resultando em maior altura (MERCIER, 2008). Tal relação se mantém aos 60 DAI, onde o tratamento T10 (0,25 mg L⁻¹ IBA) apresenta maior altura (11,7 cm), seguido pela testemunha (7,66 cm). Tavares *et al.* (2007) encontraram resultados semelhantes na micropropagação de *Cyphomandra betacea* (tamarilo). Os autores utilizaram diferentes auxinas e a citocinina benziladenina (BA) para auxiliar no desenvolvimento dos segmentos caulinares e concluíram que a maior altura dos

explantes ocorreu no tratamento 0,50 mg L⁻¹ de IBA, isolado, com altura média de 1,46 cm.

TABELA 5: Altura de plântulas de *Piper hispidinervium* C.DC. obtidas da micropropagação em meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) acrescido de ácido indolilbutírico (IBA) isolado e combinado com diferentes concentrações de benzilaminopurina (BAP), com avaliação aos 30 e 60 dias após a inoculação (DAI). UNESP/Botucatu-SP, 2009.

Tratamentos	Altura (cm) de plântulas micropropagadas de <i>P. hispidinervium</i>	
	30 DAI	60 DAI
T1- MS Testemunha	6,20 B	7,66 B
T2- 0,25 mg L ⁻¹ BAP	2,73 C	2,90 C
T3- 0,50 mg L ⁻¹ BAP	2,80 C	3,23 C
T4- 0,75 mg L ⁻¹ BAP	2,30 C	2,70 D
T5- 1,0 mg L ⁻¹ BAP	2,83 C	3,13 C
T6- 0,25 mg L ⁻¹ BAP+0,25 mg L ⁻¹ IBA	2,36 C	2,66 D
T7- 0,50 mg L ⁻¹ BAP+0,25 mg L ⁻¹ IBA	2,50 C	2,70 D
T8- 0,75 mg L ⁻¹ BAP+0,25 mg L ⁻¹ IBA	2,00 C	2,50 D
T9- 1,0 mg L ⁻¹ BAP+0,25 mg L ⁻¹ IBA	1,96 C	2,23 D
T10- 0,25 mg L ⁻¹ IBA	8,00 A	11,76 A
C.V. (%)	14,27	6,28

Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Na testemunha também fica evidenciada a satisfatória concentração endógena de IBA nas plântulas. Provavelmente, a concentração endógena de auxina foi favorável devido ao estado fisiológico das plantas doadoras de explantes (plântulas jovens com um par de folhas expandidas e gemas), que germinaram *in vitro* e estavam sob condições ideais de temperatura e luminosidade. Além disso, segundo Taiz & Zeiger (2009) e Mercier (2008) as auxinas são sintetizadas em locais de divisão celular rápida, como meristemas apicais, folhas jovens, frutos em desenvolvimento e sementes.

Quanto aos tratamentos acrescidos de BAP, para várias espécies são relatados resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho. Pereira *et al.* (2000) concluíram que para a micropropagação de *Echinodorus* sp., concentrações de BAP maiores do que 1,0 mg L⁻¹ (indicada pelos autores como ideal para a espécie) induziram maior número

de brotações, porém resultaram em menores alturas. Tal fato se deve aos efeitos fisiológicos das citocininas, como a quebra da dominância apical e a indução do crescimento de gemas laterais (MERCIER, 2008), resultando em mais brotações com altura reduzida.

4- CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos e nas condições em que foi realizado o experimento, pode-se concluir que a técnica de micropropagação é eficiente para a espécie *Piper hispidinerviium*. A adição de BAP ao meio de cultura é necessária para a formação de brotos. Já a adição de IBA ao meio de cultura é benéfica para o enraizamento e crescimento em altura das plântulas de pimenta longa. Ainda são necessários ajustes nas concentrações e combinações de ambos os reguladores vegetais adicionados ao meio de cultura.

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ERIG, A.C.; DE ROSSI, A.; FORTES, G.R.L. 6-Benzylaminopurine and indol butyric acid on the in vitro multiplication of blackberry (*Rubus idaeus*), cv. Tupy. **Ciência Rural**, v.32, p.765-70, 2002.

FUMAGALI, E.; GONÇALVES, R.A.C.; MACHADO, M. de F.P.S.; VIDOTI, G.J.; OLIVEIRA, A.B de, Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista brasileira de farmacognosia**, vol.18, n.4 p. 627-641, 2008.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. **Micropropagação**. In: TORRES, A. *et al.* (Ed.). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília-DF: Embrapa, 1998. V.1, p.183-260.

LESHEM, B.; WERKER, E.; SHALER, D.P. The effect of cytokinins on vitrification in melon and carnation. **Annals of Botany**, v.62, p.271-6, 1988.

LIMA, G.P.P.; ZIGIOTTO, D.C.; TAKAKI, M. Micropropagação de *Salvia officinalis* L. com avaliação do teor de fenóis totais e atividade antioxidante. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.10, n.2, 2008.

MERCIER, H. **Auxinas**. In: KERBAUY, G.B. *Fisiologia Vegetal* 2ª ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2008.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

PEREIRA, F.D; PINTO, J.E.B.P.; CARDOSO, M.G; LAMEIRA, O.A. Propagação *in vitro* de chapéu-de-couro (*Echinodorus cf. scaber* RATAJ.), uma planta medicinal. *Ciência e agrotecnologia* v.24 (edição especial), p.74-80, dez. 2000.

PIMENTEL, F.A. **Técnicas para colheita, beneficiamento e armazenamento de sementes de pimenta longa (*Piper hispidinervium*)**. Acre: EMBRAPA/ACRE, n. 147, dez/2001 (Comunicado Técnico).

QI-GUANG, Y.; READ, P.E.; FELLMAN, C.D.; HOSIER, M.A. Effect of cytokinin, IBA, and rooting regime on chinese chestnut cultured *in vitro*. **Horticultural Science**, v.21, p.133-134, 1986.

ROCHA, S. F. R.; MING, L. C. *Piper hispidinervium*: a sustainable source of safrole. p. 479-481. In: JANICK, J. (Ed.). **Perspectives on new crops and new uses**. Alexandria: ASHS Press, 2000.

SANTIAGO, E.J.A. de. **Caracterização morfológica e bioquímica de calos de pimenta longa (*Piper hispidinervium* Candolle, De Candolle)**. Universidade Federal de Lavras, 2003. Tese (Doutorado em Agronomia). Lavras-MG.

SCHWERTNER, A.B.S.; NAGAO, E.O.; HIDALGO, A.F.; ZAFFARI, G.R. Efeito do 6-benzilaminopurina (BAP) e do ácido indolacético (AIA) na propagação *in vitro* da caapeba [*Pothomorphe peltata* (L.) Miq.]. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.10, n.1, p.76-81, 2008.

SILVA, F.G.; PINTO, J.E.B.P.; SALES, J.F.; DIVINO, S. de P.; BERTOLUCCI, S.K.V. Efeito da concentração de sais e fitorreguladores na indução de calos em carqueja **Ciência e agrotecnologia**, Lavras. v.27, n.3, p.541-547, maio/jun., 2003.

SILVA, T.L. da ; Rodrigo da Silva GUEDES, R. da S.; COSTA, F.H. da S.; PEREIRA, J.E.S. Multiplicação *in vitro* da pimenta longa (*Piper hispidinervium*). In: 46º Congresso Brasileiro de Olericultura, 2006, Goiânia-GO. **Anais...** 46º Congresso Brasileiro de Oleicultura, 2006.

Disponível em: <http://www.abhorticultura.com.br/Biblioteca/Default.asp>. Acesso em 20 de fevereiro de 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4ª ed. Artmed, Porto Alegre, 2009.

TANG, W.; NEWTON, R.J.; OUTHAVONG, V. Exogenously added polyamines recover browning tissues into normal callus cultures and improve plant regeneration in pine. **Physiologia Plantarum**, 122, 386–395, 2004.

TAVARES, V. de L.; ANDRADE, L.B.; ECHEVERRIGARAY, S. Quebra de dormência de sementes e cultivo *in vitro* de *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.5, supl.2, p.1161-1163, jul. 2007.

TOMBOLATO, A.F.C.; COSTA, A.M.M. **Micropropagação de plantas ornamentais**. Boletim técnico n. 174. Campinas, Instituto Agrônomo, 1998. 72p.

VALLE, R. de C.S.C. **Estratégias de cultivo de células de pimenta longa e determinação de parâmetros cinéticos**. Universidade Federal de Santa Catarina, 2003. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Florianópolis-SC.

VENTURIERI, G.A.; VENTURIERI, G.C. Calogênese do híbrido *Theobroma grandiflorum* x *T.obovatum* (Sterculiaceae). *Acta Amazônica*, v.34, n.4, p. 507-511, 2004.

WADT, L. H. O. de. **Estrutura genética de populações naturais de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) visando seu uso e conservação**. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2001. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas). Piracicaba-SP.

**CAPÍTULO II- TEORES DE FLAVONÓIDES TOTAIS E ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE DE PLÂNTULAS DE PIMENTA LONGA
(*Piper hispidinervium* C.DC.) MICROPROPAGADAS COM
REGULADORES VEGETAIS**

**TEORES DE FLAVONÓIDES TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE
PLÂNTULAS DE PIMENTA LONGA (*Piper hispidinervium* C.DC.)
MICROPROPAGADAS COM REGULADORES VEGETAIS**

Luciani Marcia Scherer Salvaro, Elizabeth Orika Ono, Débora Zanoni do Prado,
Giuseppina Pace Pereira Lima

RESUMO - A pimenta longa (*Piper hispidinervium* C.DC.) é uma piperácea que têm despertado grande interesse na indústria cosmética e farmacêutica. A espécie é uma fonte natural de safrol, óleo essencial de grande importância econômica. Além disso, muito se fala na literatura a respeito da atividade antioxidante em espécies da família Piperaceae; no entanto, não há relatos dessa atividade em pimenta longa. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi verificar o efeito de reguladores vegetais (BAP e IBA) e da época de avaliação das plântulas, nos teores de flavonóides totais, na atividade antioxidante e na atividade da enzima peroxidase em plântulas de *Piper hispidinervium* C.DC, provenientes do cultivo *in vitro*. As plântulas foram obtidas pela propagação *in vitro*, em meio de cultura MS, acrescido de benzilaminopurina (BAP) nas concentrações de 0,25, 0,50, 0,75 e 1,0 mg L⁻¹, isoladas e combinadas com ácido indolilbutírico (IBA) na concentração de 0,25 mg L⁻¹, o qual também foi avaliado isoladamente. Também foi avaliada uma testemunha, cultivada em meio de cultura MS sem reguladores vegetais. As plântulas foram cultivadas nos tratamentos sob temperatura de 26°C e fotoperíodo de 16 horas/luz durante 60 dias. No momento da inoculação *in vitro*, aos 30 e 60 dias após a inoculação (DAI), as plântulas foram coletadas para a realização das análises bioquímicas. Nas condições realizadas, verificou-se que as plântulas de pimenta longa apresentaram maior teor de flavonóides totais aos 60 DAI, em meio de cultura acrescido de IBA. A atividade antioxidante também foi elevada no tratamento acrescido de 0,25 mg L⁻¹ BAP + 0,25 mg L⁻¹ IBA aos 60 DAI. Já a atividade da peroxidase foi elevada no tratamento com 1,0 mg L⁻¹ de BAP aos 30 DAI e também, no tratamento com 0,50 mg L⁻¹ de BAP aos 60 DAI. A pimenta longa possui atividade antioxidante que varia entre moderada a muito forte, dependendo do tratamento utilizado.

Palavras-chave: *Piper hispidinervium*, BAP, IBA, atividade peroxidase.

**CONTENTS OF TOTALS FLAVONOIDS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY IN
PLANTLETS OF LONG PEPPER (*Piper hispidinervium* C.DC.)
MICROPROPAGATED WITH PLANT GROWTH REGULATORS**

Luciani Marcia Scherer Salvaro, Elizabeth Orika Ono, Débora Zanoni do Prado
Giuseppina Pace Pereira Lima

ABSTRACT - The long pepper (*Piper hispidinervium* C.DC) is a piperaceae that has been aroused great interest in the cosmetic and pharmaceutical industry. The species is a natural fountain of safrol, an essential oil of great economical importance. Besides, much is said in the literature about the antioxidant activity in species of the family Piperaceae, however, there are no reports of this activity in long pepper. In this way, the

purpose of this paper was to check the effect of plant growth regulators (benzilaminopurine - BAP and indolilbuyric acid -IBA) and cutting time about the contents of totals flavonoids, antioxidant activity and in the activity of the enzyme peroxidase in seedlings of *Piper hispidinervium* C.DC, originating from the cultivation *in vitro*. The seedlings were obtained through the propagation *in vitro*, in environment of MS medium, added to BAP in concentrations of 0.25, 0.50, 0.75 and 1.0 mg L⁻¹ isolated and combined with IBA (0.25 mg L⁻¹), which one was evaluate alone too. Also a control cultivated in MS medium was evaluated. The seedlings were cultivated in the treatments under temperature of 26°C and photoperiod of 16 hours/clear and 8 hours/darkness during 60 days. At the moment of the inoculation *in vitro*, at 30 and 60 days after the inoculation, the seedlings were collected for the realization of the biochemical analysis. In the realized conditions, it was that the plantlets of long pepper presented a higher content of totals flavonoids at 60 DAI in culture medium added of IBA. The antioxidant activity was increased in treatment with 0.25 mg L⁻¹ BAP + 0.25 mg L⁻¹ IBA at 60 DAI. The activity of the peroxidase was increased in the treatment with 1.0 mg L⁻¹ of BAP at 30 DAI and, also, in the treatment with 0.50 mg L⁻¹ of BAP at 60 DAI. The long pepper has antioxidant activity that varies between moderated to very strong depending on the treatment used.

Key-words: *Piper hispidinervium*, BAP, IBA, peroxidase activity

1- INTRODUÇÃO

Há décadas os pesquisadores vêm se dedicando ao estudo fitoquímico de diversas espécies vegetais, visando, principalmente, isolamento e determinação estrutural de substâncias pertencentes as mais diversas classes químicas (SILVA, 2006), que são amplamente utilizadas na indústria química. Atualmente, grande parte das pesquisas são direcionadas, principalmente, aos compostos antioxidantes, os quais ganharam destaque na sociedade moderna devido ao incentivo pelo consumo de produtos naturais (MELO & GUERRA, 2002).

Hostettman *et al.* (2003) relatam que mais de 200 mil tipos de produtos naturais já foram descritos. Considerando-se que aproximadamente 25% dos medicamentos prescritos em países industrializados têm sua origem em princípios ativos de plantas, os metabólitos secundários representam um mundo a ser explorado.

Segundo Mógor *et al.* (2007), a grande dificuldade de estudar esses compostos do metabolismo secundário se concentra no material vegetal, o qual, devido à grande procura, pode se tornar escasso. Um exemplo é o safrol, um óleo essencial muito apreciado pela indústria química, o qual era obtido do caule da canela sassafrás (*Ocotea odorifera*), levando quase a extinção da espécie e culminando com o decreto do IBAMA nº 1557/91, proibindo o corte da canela sassafrás (VALLE, 2003).

Nesse contexto insere-se a pimenta longa, uma piperácea rústica e muito frequente em campos abertos no Estado do Acre (SANTIAGO, 2003). A espécie vem ganhando destaque na economia mundial devido ao alto teor de safrol, aproximadamente 95%, encontrado na parte aérea. Além disso, representa uma alternativa viável e sustentável para a obtenção do óleo, pois rebrota facilmente após o corte (VALLE, 2003).

Segundo Silva (2006), a família Piperaceae, especialmente as espécies do gênero *Piper*, vem sendo muito pesquisadas devido ao acúmulo de metabólitos fixos e voláteis de grande utilidade para a indústria cosmética, alimentícia, farmacêutica e agrícola. Nunomura *et al.* (2006) destacam que muitas espécies do gênero *Piper* sintetizam metabólitos secundários com potencial antioxidante e tais substâncias são capazes de combater o efeito oxidativo e deletério das espécies reativas de oxigênio (ROS). Segundo os autores, vários estudos vêm demonstrando a importância das substâncias antioxidantes na prevenção ou diminuição da incidência de doenças.

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são moléculas derivadas do oxigênio e geradas através do metabolismo dos organismos vivos. Estas moléculas possuem um elétron livre para se ligar a qualquer outro elétron e, por isso, são extremamente reativas. O acúmulo de radicais livres em sistemas biológicos pode causar danos em estruturas celulares, principalmente porque reagem com moléculas como carboidratos, lipídios, proteínas e DNA, causando alteração na permeabilidade das membranas celulares e até mesmo a morte celular (ZHAO *et al.*, 2005). Além de resultar do metabolismo, os radicais livres também podem ser gerados por fontes exógenas, como tabaco, poluição do ar, solventes orgânicos, anestésicos, pesticidas e radiações (SOARES, 2002). Os danos oxidativos causados pelas espécies reativas de oxigênio têm sido frequentemente associados à patogênese e problemas de saúde, como envelhecimento, artrite, câncer, inflamação e doenças cardíacas em humanos (VELLOSA *et al.*, 2007).

Lago *et al.* (2004) relatam que estudos realizados com espécies de *Piper* possibilitaram a identificação de diversos metabólitos secundários, incluindo lignanas, terpenóides, esteróides, chalconas, derivados de ácidos benzóicos e flavonóides. Muitos desses compostos são ativos biologicamente e tem apresentado potencial antitumoral, antimicrobiano, antifúngico, antioxidante, inseticida, larvicida, entre outros. Os flavonóides são compostos fenólicos que possuem propriedades antioxidantes,

fotoprotetora, proteção contra patógenos, dentre outras, e têm sido bastante pesquisados devido a sua importância econômica (LIMA *et al.*, 2008).

A cultura de tecidos vegetais tem sido frequentemente usada como um modelo para estudar o desenvolvimento vegetal, assim como dos metabólitos presentes, devido a maior facilidade de obtenção das plântulas, quando estabelecido um protocolo (ARNALDOS *et al.*, 2001).

Valle (2003) concentrou seus estudos na produção de safról utilizando técnicas da cultura de células e tecidos vegetais. O autor relata a formação de massa celular de pimenta longa utilizando reguladores vegetais e com balanço hormonal pró-citocinina.

Os reguladores vegetais, principalmente, as auxinas e citocininas são muito utilizados na cultura de tecidos vegetais para auxiliar no desenvolvimento de diversas espécies. As concentrações de cada regulador vegetal dependem do objetivo da cultura, sendo que para induzir a formação de parte aérea, o balanço hormonal deve ser pró-citocinina e para o enraizamento, a concentração deve ser favorável à auxina (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Há carência de informações no que se refere ao estudo das técnicas de cultura de tecidos vegetais para a produção de metabólitos secundários, atividade antioxidante e enzimática de plantas medicinais e aromáticas, especialmente a pimenta longa. Assim, a busca por técnicas mais produtivas para obtenção de compostos naturais em espécies de interesse econômico é de grande importância.

Portanto, o objetivo do presente trabalho foi verificar o efeito de reguladores vegetais benzilaminopurina (BAP) em concentrações isoladas e combinadas com ácido indolilbutírico (IBA) e da época de avaliação, nos teores de flavonóides totais, na atividade antioxidante e na atividade da enzima peroxidase em plântulas de *Piper hispidinervium* C.DC., provenientes do cultivo *in vitro*.

2- MATERIAL E MÉTODOS

O material vegetal utilizado neste experimento foi coletado no jardim clonal da Faculdade de Ciências Agronômicas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FCA/UNESP), Campus de Botucatu-SP. A coleta do material vegetal ocorreu no período de fevereiro a março de 2008 e a condução dos experimentos foi realizada no período de março a dezembro de 2008.

Foram coletadas espiguetas de pimenta longa, apresentando coloração verde escura com sementes de coloração preta, indicando seu amadurecimento (PIMENTEL, 2001).

As espiguetas foram transportadas em vidros com tampa plástica até o Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, do Departamento de Química e Bioquímica, IB/UNESP, Campus de Botucatu-SP, onde foi realizado o beneficiamento das sementes de acordo com a metodologia proposta por Pimentel (2001).

Para o beneficiamento as espiguetas contendo as sementes foram deixadas de molho em água destilada por um período de 24 horas, sendo depois maceradas para liberar as sementes. Com o auxílio de um tecido fino, as sementes foram lavadas sucessivamente até que não houvesse mais resíduos. Posteriormente à lavagem, as sementes foram submetidas à secagem em temperatura ambiente, em local ventilado sobre papel filtro, durante 5 dias.

Após a secagem, as sementes de pimenta longa foram inoculadas assepticamente em câmara de fluxo laminar, em frascos de vidro para cultura de tecidos vegetais, com capacidade para 200 mL, contendo 20 mL do meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), isento de reguladores vegetais, acrescido de 3% de sacarose, geleificado com ágar e autoclavado a 121°C, durante 20 minutos. Após a inoculação, os frascos contendo as sementes permaneceram em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas/luz e à temperatura de 26°C ± 2 e intensidade luminosa de 2000 Lux.

As plântulas germinadas e com aproximadamente 3 cm de altura (microestacas), com um par de folhas expandidas, inclusive as cotiledonares e desprovidas de raízes foram utilizadas como explantes para a realização do trabalho.

Desta forma, as microestacas obtidas da germinação *in vitro* foram inoculadas assepticamente em meio de cultura MS, acrescido de concentrações de BAP (0,25, 0,50, 0,75 e 1,0 mg L⁻¹) e IBA (0,25 mg L⁻¹), isoladas, ou combinadas entre si, além de uma testemunha, isenta de reguladores vegetais.

Após a inoculação, os vidros contendo as microestacas de pimenta longa permaneceram em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas/luz, à temperatura de 26°C±2 e sob intensidade luminosa de 2000 Lux.

As coletas para realização das análises do teor de flavonóides totais, atividade antioxidante e atividade da enzima peroxidase foram realizadas no momento da inoculação (tempo 0), aos 30 e 60 dias após a inoculação (DAI). Todas as análises foram realizadas com amostras frescas. Desta forma, no momento em que foram

coletadas, as amostras foram acondicionadas em papel alumínio devidamente identificado, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer até o momento de realização das análises.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 10 x 3 (10 tratamentos e 3 épocas de avaliação), com três repetições por tratamento. Os dados foram submetidos à análise de variância (teste F) e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

2.1- Determinação do teor de flavonóides totais

A análise foi realizada de acordo com o método espectrofotométrico adaptado de Santos & Blatt (1998) e Awad *et al.* (2000). Amostras frescas (50 mg) obtidas da micropropagação foram pulverizadas e maceradas em nitrogênio líquido e, em seguida, foram adicionados 4 mL da mistura metanol 70% (v/v) e ácido acético 10% (v/v). Os extratos foram levados para banho de ultrassom por 30 minutos e centrifugados por 20 minutos a 10.000 rpm. Ao sobrenadante foi acrescentado 0,2 mL de $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ 10% e o volume completado com ácido acético 10 % (v/v). A mistura foi homogeneizada e após 30 minutos, filtrada e a absorbância verificada a 425 nm usando espectrofotômetro UV-Vis (Pharmacia Biotech – Ultrospec 2000).

O teor de flavonóides totais foi determinado em comparação com uma curva de referência (quercetina) ($y = 0,0832x + 0,01$ $R^2 = 0,9999$) e expressos em μg de flavonóides (equivalente quercetina) $\mu g g^{-1}$ M.F. (matéria fresca).

2.2- Determinação da atividade antioxidante (DPPH)

O método de determinação da atividade antioxidante usando DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) é um dos mais usados e consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical livre DPPH.

A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres e/ou a porcentagem de DPPH remanescente no meio reacional (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995; SÁNCHEZ-MORENO *et al.*, 1998). A porcentagem de atividade antioxidante (%AAO) corresponde

à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante, sendo que a quantidade necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH é denominada concentração eficiente (CE_{50}), também chamada de concentração inibitória (CI_{50}). Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será sua CE_{50} e maior será sua atividade antioxidante (SOUZA *et al.*, 2007).

O procedimento para a análise foi descrito por Mensor *et al.* (2001). Para a obtenção do extrato etanólico, foram pesados 50 mg de amostra fresca. As amostras foram colocadas em béqueres juntamente com 10 mL de etanol P.A. e mantidas sobre chapa aquecedora até a evaporação completa do etanol. As amostras foram ressuspendidas em 10 mL de etanol, filtradas e armazenada em vidros com tampa. O extrato foi mantido em freezer até o momento da análise da atividade antioxidante.

Para a análise, os extratos etanólicos foram pipetados em tubos de ensaio nas concentrações de 1250, 625, 500 e 375 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A essas concentrações foi adicionado etanol para que o volume total fosse de 2,5 mL (extrato etanólico + etanol). Em seguida foi adicionado 1 mL de solução de DPPH (0,3 mM) em cada tubo de ensaio. O controle foi obtido com 2,5 mL de etanol e 1 mL da solução de DPPH e também foi obtido um branco com as devidas concentrações do extrato etanólico juntamente com 2,5 mL de etanol, para todas as concentrações. Após o tempo de reação de 30 minutos, a absorbância foi verificada a 518nm (espectrofotômetro UV/VIS – Pharmacia Biotech – Ultrospec 2000) e convertida em porcentagem de atividade antioxidante (AAO) usando a seguinte fórmula:

$$\text{AAO}\% = 100 - \{[(\text{Abs amostra} - \text{Abs branco}) \times 100] / \text{Abs controle}\}$$

A concentração eficiente, isto é, a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% (CE_{50}) foi determinada usando Microsoft Excel®, a partir de uma curva de regressão, plotando-se na abscissa as concentrações da amostra (1250, 624, 500 e 375 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e na ordenada, a proporção da atividade antioxidante (AAO%), obtendo-se a equação da reta. A resolução desta equação resultou no valor de CE_{50} (MENSOR, 2001). Já o IAA (índice de atividade antioxidante) é calculado a partir da concentração final de DPPH e do valor calculado para CE_{50} , conforme a fórmula sugerida por Scherer & Godoy (2009):

$$\text{IAA} = \frac{\text{Concentração final de DPPH } (\mu\text{g mL}^{-1})}{\text{CE}_{50} (\mu\text{g mL}^{-1})}$$

A partir do resultado obtido considera-se que o extrato apresenta atividade antioxidante pobre quando o IAA é menor do que 0,5, moderada quando o IAA do extrato se concentra entre 0,5 e 1,0, forte quando o IAA do extrato se concentra entre 1,0 e 2,0 e muito forte quando o IAA é maior do que 2,0 (SCHERER & GODOY, 2009).

2.3- Atividade da peroxidase

A análise da atividade da peroxidase foi realizada de acordo com método descrito por Lima *et al.* (1999). Amostras de 0,2 g de plântulas de *Piper hispidinervium* (massa fresca) foram pesadas e homogeneizadas em 3 mL de tampão fosfato de potássio 0,2 M e pH= 6,7. Em seguida, foram centrifugadas a 10.000 rpm, por 10 minutos a 4°C obtendo-se dessa maneira o extrato bruto.

O sobrenadante foi utilizado como fonte da enzima peroxidase pelo método espectrofotométrico proposto por Lima (1994). O sistema de reação continha 1,0 mL do extrato enzimático (extrato bruto), 0,5 mL de solução de H₂O₂, 30%, 0,5 mL de solução de diclorofenol e aminoantipirina. Os tubos foram mantidos em banho-maria a 30°C por 5 minutos, sendo a reação interrompida pela adição de 2 mL de etanol absoluto. Procedeu-se a leitura imediatamente em espectrofotômetro a 505 nm sendo os resultados expressos em mol de H₂O₂ decomposto min⁻¹ g⁻¹ proteína

3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1- Teores de flavonóides totais

Os resultados do teor de flavonóides totais apresentados nas Tabelas 1 e 2 revelam que plantas de *Piper hispidinervium* C.DC, tratadas com reguladores vegetais, assim como a época de coleta influenciaram no teor flavonóides totais, bem como a interação dos dois fatores.

TABELA 1: Análise de variância do teor de flavonóides totais (μg de flavonóides g^{-1} M.F.) em plântulas de *Piper hispidinervium* C.DC provenientes da micropropagação em meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) acrescido de benzilaminopurina (BAP) em diferentes concentrações isoladas e combinadas com ácido indolilbutírico (IBA), com avaliação no momento da inoculação (tempo 0), aos 30 e 60 dias após a inoculação (DAI). UNESP/Botucatu-SP, 2009.

Fontes de variação (F.V.)	GL	Quadrado médio
Tratamento (T)	9	4,3670*
Coleta (C)	2	2,3089*
T x C	18	1,78161*
Resíduo	60	
C.V. (%)	15,68	

* significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Na tabela 2, observa-se que para a primeira avaliação (tempo 0) do teor de flavonóides totais nas plântulas de pimenta longa, não foi considerado o efeito dos tratamentos e, portanto, na tabela, os dados são os mesmos, mas, necessitam serem ilustrados para fins de comparação com as demais avaliações das plântulas (30 e 60 DAI).

TABELA 2: Teor de flavonóides totais (μg de flavonóides g^{-1} M.F.) em plântulas de *Piper hispidinervium* C.DC provenientes da micropropagação em meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) acrescido de benzilaminopurina (BAP) em diferentes concentrações isoladas e combinadas com ácido indolilbutírico (IBA), com avaliação no momento da inoculação (tempo 0), aos 30 e 60 dias após a inoculação (DAI). UNESP/Botucatu-SP, 2009.

Teor de flavonóides totais (μg de flavonóides g^{-1} M.F.) em plântulas de <i>P. hispidinervium</i>			
Tratamentos	Épocas de avaliação das plântulas (DAI)		
	0 DAI	30 DAI	60 DAI
T1-Testemunha (MS)	357,17 Ac	716,44 Aa	491,13 Bb
T2-0,25 mg L⁻¹ BAP	357,17 Ab	483,50 Ba	404,26 Ba
T3-0,50 mg L⁻¹ BAP	357,17 Ab	480,45 Ba	451,35 Ba
T4-0,75 mg L⁻¹ BAP	357,17 Ab	410,56 Ca	406,07 Ba
T5-1,0 mg L⁻¹ BAP	357,17 Ab	548,47 Ba	519,54 Ba
T6-0,25 mg L⁻¹ BAP+0,25 mg L⁻¹ IBA	357,17 Ab	375,33 Ca	441,92 Ba
T7-0,50 mg L⁻¹ BAP+0,25 mg L⁻¹ IBA	357,17 Ab	484,35 Ba	480,58 Ba
T8-0,75 mg L⁻¹ BAP+0,25 mg L⁻¹ IBA	357,17 Ab	525,33 Ba	444,75 Ba
T9-1,0 mg L⁻¹ BAP+0,25 mg L⁻¹ IBA	357,17 Ab	496,93 Ba	568,12 Ba
T10-0,25 mg L⁻¹ IBA	357,17 Ac	697,77 Ab	818,20 Aa
Média	357,17	521,91	510,33

Médias seguidas de mesma letra, maiúscula nas colunas e minúscula nas linhas, não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. C.V.= 15,68

Ao observar a tabela 2, aos 30 DAI, percebe-se que as plântulas de pimenta longa cultivadas *in vitro* e sem reguladores vegetais possuem elevado teor de flavonóides e, conseqüentemente, possui elevada atividade antioxidante, devido à função removedora de radicais livres dos flavonóides. Tal fato também pode ser confirmado pela elevada atividade antioxidante encontrada na testemunha aos 30 DAI, na tabela 4 deste capítulo. Lima *et al.* (2008) relatam resultados semelhantes em plântulas de *Salvia officinallis* micropropagadas.

Aos 30 DAI, o tratamento com IBA também foi significativo, apesar de apresentar teor de flavonóides totais com valor inferior ao encontrado na testemunha. Em relação à testemunha, os demais tratamentos (T2 ao T9) não foram significativos. Apesar disso, observa-se que os teores de flavonóides nestes tratamentos apresentaram-se elevados. Concomitante a isso, a atividade antioxidante (tabela 4) também foi elevada em tais tratamentos. Benevides (1999) relata que as espécies da família Piperaceae são

ricas em compostos antioxidantes naturais e dentre eles, pode-se citar os flavonóides (BENEVIDES, 1999)

Diversos autores relacionam o teor de compostos fenólicos com a atividade antioxidante, entre eles, pode-se destacar Dias *et al.* (2006) que atribuem a significativa atividade antioxidante obtida em folhas e galhos de *Eugenia umbelliflora* à maior concentração de substâncias fenólicas, entre eles os flavonóides conhecidos por sua eficiente ação sequestradora de radicais livres frente ao DPPH.

Aos 60 DAI, o tratamento com IBA destacou-se significativamente em relação aos demais tratamentos, apresentando maior acúmulo de flavonóides totais nas plântulas e tal resultado também foi alcançado por Povh (2008) com *Salvia officinallis*.

Na tabela 2, observa-se que com exceção da testemunha e do tratamento com IBA, as médias gerais dos tratamentos aos 30 e 60 DAI para os teores de flavonóides totais não apresentaram diferenças consideráveis, sendo os valores elevados (521,91 e 510,33 μg de flavonóides g^{-1} M.F., respectivamente). Os resultados obtidos da análise do teor de flavonóides no tempo 0, demonstra que houve aumento no acúmulo de flavonóides totais em relação as demais épocas de avaliação das plântulas.

A transferência das microestacas (fonte de explantes) que germinaram em meio de cultura MS desprovidos de reguladores vegetais para os devidos tratamentos com BAP e IBA pode ter danificado o tecido, provocando respostas fisiológicas nos plântulas, concordando com Lima *et al.* (2008) e, sugerindo que tais resultados sejam consequência dos mecanismos de defesa e adaptação das plântulas ao ambiente. Além disso, Taiz e Zeiger (2009) relatam que a produção de metabólitos secundários está relacionada com processos de defesa dos vegetais.

3.2- Determinação da atividade antioxidante (AAO)

A atividade antioxidante pode ser definida como uma propriedade da célula em remover radicais livres formados por processos oxidantes. Os agentes oxidantes formam as ROS (espécies reativas de oxigênio), que causam danos oxidativos ao tecido, afetando a integridade e função das células (ZHAO *et al.*, 2005). Em contrapartida, os antioxidantes são compostos que inibem ou atrasam a oxidação de outras moléculas pela inibição da iniciação ou propagação em cadeia de reação de oxidação e diversas

moléculas podem ser consideradas antioxidantes, como vitamina C, carotenóides, compostos fenólicos, dentre eles os flavonóides (TEPE *et al.*, 2007).

De acordo com a tabela 3, houve efeito significativo para adição de reguladores vegetais ao meio de cultura e para a época de avaliação das plântulas, bem como a interação entre os dois fatores. O índice de atividade antioxidante (SCHERER & GODOY, 2009) obtidos neste trabalho variou de moderado a muito forte (APÊNDICE D).

TABELA 3: Análise de variância da atividade antioxidante (CE_{50} $\mu\text{g.mL}^{-1}$) em plântulas de *Piper hispidinervium* C.DC., obtidas da micropropagação em meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) acrescido de benzilaminopurina (BAP) em diferentes concentrações isoladas e combinadas com ácido indolilbutírico (IBA), com avaliação momento da inoculação (tempo 0), aos 30 e 60 dias após a inoculação (DAI). UNESP/Botucatu-SP, 2009.

Fontes de variação (F.V.)	GL	Quadrado médio
Tratamento (T)	9	2316,615*
Coleta (C)	2	35779,346*
T x C	18	2257,510*
Resíduo	60	
C.V. (%)	18,58	

* significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Na tabela 4, observa-se que para a primeira avaliação (tempo 0) da atividade antioxidante (CE_{50} $\mu\text{g.mL}^{-1}$) nas plântulas de pimenta longa, não foi considerado o efeito dos tratamentos e, portanto, na tabela, os dados são os mesmos, mas, necessitam serem ilustrados para fins de comparação com as demais avaliações das plântulas (30 e 60 DAI).

De acordo com Souza *et al.* (2007), quanto menor o valor de CE_{50} , maior é a atividade antioxidante. Deste modo, observa-se na tabela 4 que a média da atividade antioxidante para os tratamentos em cada época de avaliação das plântulas, sofreu variações. Do momento da inoculação as plântulas até os 30 DAI houve aumento da atividade antioxidante, sendo que aos 30 DAI foi observada a maior média geral para a atividade antioxidante (CE_{50} 58,09 $\mu\text{g mL}^{-1}$), havendo um decréscimo da mesma aos 60 DAI (CE_{50} 89,56 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

TABELA 4: Atividade antioxidante (CE_{50} $\mu\text{g mL}^{-1}$) em plântulas de *Piper hispidinervium* C.DC., obtidos da micropropagação em meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) acrescido de benzilaminopurina (BAP) em diferentes concentrações isoladas e combinadas com ácido indolilbutírico (IBA), com avaliação momento da inoculação (tempo 0), aos 30 e 60 dias após a inoculação (DAI). UNESP/Botucatu-SP, 2009.

Atividade antioxidante (CE_{50} $\mu\text{g mL}^{-1}$) em plântulas de <i>P. hispidinervium</i>			
Tratamentos	Épocas de avaliação das plântulas (DAI)		
	0 DAI	30 DAI	60 DAI
T1-Testemunha MS	127,07 Ac	26,31 Aa	83,66 Cb
T2- 0,25 mg L ⁻¹ BAP	127,07 Ab	48,64 Ba	115,00 Db
T3- 0,50 mg L ⁻¹ BAP	127,07 Ac	24,18 Aa	60,33 Bb
T4- 0,75 mg L ⁻¹ BAP	127,07 Ab	12,08 Aa	134,00 Db
T5- 1,0 mg L ⁻¹ BAP	127,07 Ac	49,33 Ba	96,00 Cb
T6- 0,25 mg L ⁻¹ BAP+0,25 mg L ⁻¹ IBA	127,07 Ac	65,00 Cb	10,00 Aa
T7- 0,50 mg L ⁻¹ BAP+0,25 mg L ⁻¹ IBA	127,07 Ab	86,19 Da	88,00 Ca
T8- 0,75 mg L ⁻¹ BAP+0,25 mg L ⁻¹ IBA	127,07 Ab	64,00 Ca	87,33 Ca
T9- 1,0 mg L ⁻¹ BAP+0,25 mg L ⁻¹ IBA	127,07 Ab	100,0 Da	98,00 Ca
T10- 0,25 mg L ⁻¹ IBA	127,07 Aa	105,66 Da	123,33 Ca
Média	127,07	58,09	89,56

Médias seguidas de mesma letra, maiúscula nas colunas e minúscula nas linhas, não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. C.V.= 18,58

Os tratamentos com BAP isolado, T3 e T4 (0,25 mg L⁻¹ BAP; 0,50 mg L⁻¹ BAP e 0,75 mg L⁻¹ BAP, respectivamente) resultaram em atividade antioxidante semelhante à testemunha (T1). Apesar disso, é importante destacar que o valor conferido a atividade antioxidante no T4 é superior a ao valor da testemunha. Já aos 60 DAI, o tratamento T6 (0,25 mg L⁻¹ BAP + 0,25 mg L⁻¹ IBA) apresentou maior atividade antioxidante.

Em relação à atividade antioxidante média obtida para a pimenta longa aos 30 DAI, pode-se sugerir que o valor elevado nesta coleta seja resultante do período de adaptação das plântulas ao meio de cultivo contendo os tratamentos, bem como resposta à manipulação durante a inoculação (LIMA *et al.*, 2008).

Grattapaglia & Machado (1998) relatam que um dos grandes entraves à micropropagação é a manipulação dos explantes, pois a ventilação da câmara de fluxo laminar e a manipulação com instrumentos ainda quentes devido as sucessivas flambagens, causam o ressecamento dos tecidos e, ainda, danificam as células,

estimulando respostas fisiológicas por parte da planta, como por exemplo, a produção de substâncias relacionadas à defesa (metabólitos secundários). Tais compostos podem se apresentar biologicamente ativos e possuir atividade antioxidante, dentre outras propriedades. Em espécies do gênero *Piper*, são relatados diversos compostos com atividade antioxidante (LAGO *et al.*, 2004).

Nunomura *et al.* (2006) relatam a atividade antioxidante de folhas de algumas espécies do gênero *Piper*, coletadas na região da Amazônia Ocidental, utilizando o método do DPPH, o qual avalia a atividade sequestradora do radical livre 2,2 difenil-1-picrilhidrazila: *Piper amapense* (CE₅₀ 100 µg mL⁻¹) e *P. cyrtopodon* (CE₅₀ 100 µg mL⁻¹).

Neste trabalho, com a técnica de propagação *in vitro*, os valores encontrados para atividade antioxidante foi superior aos valores mencionados para as espécies citadas por Nunomura *et al.* (2006), e pode ser relacionada, em parte, com o elevado teor de flavonóides já discutido anteriormente e também à possível presença de outros compostos não analisados e com atividade antioxidante. Dias *et al.* (2006) relatam que a atividade antioxidante verificada através do método com DPPH está relacionada com a ação sequestradora de radicais livres e a presença de substâncias fenólicas em quantidade apreciável contribui para a atividade destas frações. Maillard & Berset (1995) também relataram a interrelação entre a atividade antioxidante de extratos vegetais e conteúdo de substâncias fenólicas.

Assim, com base nos resultados obtidos neste trabalho para a atividade antioxidante e também, devido à carência de informações fitoquímicas a respeito da espécie *Piper hispidinervium* são viáveis os estudos fitoquímicos no intuito de se identificar compostos que sejam úteis para a fabricação de medicamentos, cosméticos e também, na indústria alimentícia.

3.3- Atividade da enzima peroxidase (POD)

A POD é uma enzima que utiliza o peróxido de hidrogênio para oxidar uma gama de doadores de hidrogênio, assim como substâncias fenólicas, ácido ascórbico, dentre outros (SAUNDERS *et al.*, 1964). O peróxido de hidrogênio, por sua vez, participa dos processos de defesa da planta, bem como na indução gênica e síntese protéica (BURDON *et al.*, 1995). Assim, a POD é uma enzima que serve para indicar

processos fisiológicos, dentre eles a oxidação de compostos fenólicos, biossíntese de etileno e lignina (ASADA, 1992) e morfológicos nos vegetais (SOUZA, 2002).

Os resultados da atividade da enzima peroxidase apresentados nas tabelas 5 e 6 revelam que as plantas de *Piper hispidinervium*, tratadas com reguladores vegetais, assim como a época de avaliação das plântulas influenciaram na atividade da enzima.

TABELA 5: Análise de variância da atividade da enzima peroxidase (μmol de H_2O_2 decomposto $\text{min}^{-1}\text{g}^{-1}$ proteína) em plântulas de *Piper hispidinervium* C.DC., obtidas da micropropagação em meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) acrescido de benzilaminopurina (BAP) em diferentes concentrações isoladas e combinadas com ácido indolilbutírico (IBA), com avaliação momento da inoculação (tempo 0), aos 30 e 60 dias após a inoculação (DAI). UNESP/Botucatu-SP, 2009.

Fontes de variação (F.V)	GL	Quadrado médio
Tratamento (T)	9	1066031,1*
Coleta (C)	2	0161002,7*
T x C	18	65093,2*
Resíduo	60	
C.V. (%)	16,55	

* significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Na tabela 6, observa-se que para a primeira avaliação (tempo 0) da atividade da enzima peroxidase (μmol de H_2O_2 decomposto $\text{g}^{-1}\text{min}^{-1}$) nas plântulas de pimenta longa, não foi considerado o efeito dos tratamentos e, portanto, na tabela, os dados são os mesmos, mas, necessitam serem ilustrados para fins de comparação com as demais avaliações das plântulas (30 e 60 DAI).

Ainda na tabela 6 estão dispostas as médias gerais dos tratamentos em cada época de avaliação das plântulas. Observa-se que a média geral para a atividade da enzima peroxidase no momento da inoculação dos explantes (tempo 0), aos 30 e 60 DAI, apresenta variações, onde é possível observar o aumento na atividade da peroxidase entre as coletas, sendo que a atividade inicial da enzima era de $0,095 \mu\text{mol}$ de H_2O_2 decomposto $\text{g}^{-1}\text{min}^{-1}$ de matéria fresca, aos 30 DAI a atividade era de $0,354 \mu\text{mol}$ de H_2O_2 decomposto $\text{g}^{-1}\text{min}^{-1}$ de matéria fresca e, na última análise, aos 60 DAI, apresentou média superior as demais coletas com média de $0,461 \mu\text{mol}$ de H_2O_2 decomposto $\text{g}^{-1}\text{min}^{-1}$ de matéria fresca. Assim, os resultados obtidos indicam que houve

acúmulo crescente de peróxido de hidrogênio (substrato para a enzima peroxidase) ao longo das épocas de avaliação das plântulas.

TABELA 6: Atividade da enzima peroxidase (μmol de H_2O_2 decomposto $\text{g}^{-1} \text{min}^{-1}$) em plântulas de *Piper hispidinervium* C.DC., obtidas da micropropagação em meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) acrescido de benzilaminopurina (BAP) em diferentes concentrações isoladas e combinadas com ácido indolilbutírico (IBA), com avaliação momento da inoculação (tempo 0), aos 30 e 60 dias após a inoculação (DAI). UNESP/Botucatu-SP, 2009.

Atividade da enzima peroxidase (μmol de H_2O_2 decomposto $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ proteína) em plântulas de <i>P. hispidinervium</i>			
Tratamentos	Épocas de avaliação das plântulas (DAI)		
	0 DAI	30 DAI	60 DAI
T1- Testemunha MS	0,095 Ab	0,355 Ca	0,294 Ea
T2- 0,25 mg L ⁻¹ BAP	0,095 Ab	0,284 Ca	0,177 Fb
T3-0,50 mg L ⁻¹ BAP	0,095 Ac	0,386 Cb	0,794 Aa
T4-0,75 mg L ⁻¹ BAP	0,095 Ac	0,330 Cb	0,669 Ba
T5-1,0 mg L ⁻¹ BAP	0,095 Ab	0,747 Aa	0,671 Ba
T6-0,25 mg L ⁻¹ BAP+0,25 mg L ⁻¹ IBA	0,095 Ac	0,348 Cb	0,630 Ca
T7-0,50 mg L ⁻¹ BAP+0,25 mg L ⁻¹ IBA	0,095 Ac	0,367 Cb	0,517 Da
T8-0,75 mg L ⁻¹ BAP+0,25 mg L ⁻¹ IBA	0,095 Ab	0,516 Ba	0,586 Ca
T9-1,0 mg L ⁻¹ BAP+0,25 mg L ⁻¹ IBA	0,095 Aa	0,133 Da	0,141 Fa
T10-0,25 mg L ⁻¹ IBA	0,095 Aa	0,079 Da	0,137 Fa
Média	0,095	0,354	0,461

Médias seguidas de mesma letra, maiúscula nas colunas e minúscula nas linhas, não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. C.V.=16,55

Segundo Burdon *et al.* (1995), o peróxido de hidrogênio atua na indução da expressão gênica e na síntese protéica e, portanto, é possível considerar que a atividade meristemática, em órgãos iniciais de desenvolvimento das plantas, tem sido relacionada com a atividade da POD. Kay & Basile (1987) descrevem que as POD's estão presentes em todos os meristemas organizados, locais de iniciação de órgãos ou que possuam atividades metabólicas, fazendo ainda uma relação entre estes pontos com o aumento na atividade da enzima peroxidase.

Neste trabalho, os resultados obtidos revelam ainda, que houve influência dos reguladores vegetais na atividade da enzima peroxidase, com maior atividade aos 60 DAI para todos os tratamentos, com exceção do tratamento 2, podendo estar relacionado com o

período de máxima divisão celular durante o desenvolvimento dos brotos de *P. hispidinervium*

Além disso, o peróxido de hidrogênio também pode ser acumulado em resposta ao estresse, causado por luminosidade, temperatura, danos mecânicos nos tecidos, nutrientes e, inclusive, reguladores vegetais (SIEGEL, 1993), o que poderia explicar a atividade enzimática elevada em grande parte dos tratamentos.

4- CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir que as plântulas de pimenta longa cultivadas *in vitro* apresentam elevados teores de flavonóides totais independente da adição de reguladores vegetais e, conseqüentemente também apresentam elevada atividade antioxidante. Por outro lado, aos 60 DAI a adição de IBA resultou em maior teor de flavonóides. Já a atividade enzimática foi elevada em plântulas submetidas a tratamentos com reguladores vegetais.

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARNALDOS, T.L.; MUNOZ. R.; FERRER, M.A; CALDERON, A.A. Changes in phenol content during strawberry (*Fragaria X ananassa*, c.v. Chandler) callus culture. **Physiologia Plantarum**, v.113, p.315-22, 2001.

ASADA, K. Ascorbate peroxidase – a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. **Physiology Plantarum**, v.85, p.235-241, 1992.

AWAD, A.M.; JAGER, A.; Van WESTING, L.M. Flavonoid and chlorogenic acid levels in apple fruit: characterization of variation. **Scientia Horticulturae**, v.83, p.249-63, 2000.

BENEVIDES, P.J.C; SARTORELLI, P.; KATO, M.J. Phenylpropanoids and Neolignans from *Piper regnellii*. **Phytochemistry**, v.52, p.339 – 343, 1999.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v.28, p.25-30, 1995.

BURDON, R.H.; ALLIANGANA, D.; GILL, V. Hydrogen peroxide and the proliferation of BHK – 21 cell. **Free Radical Research**, v. 23, p. 470-486, 1995.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. *et al.* (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília-DF: Embrapa, 1998. V.1, p.183-260.

HOSTETTMAN, K.; QUEIROZ, E.F.; VIEIRA, P.C. **Princípios ativos de plantas superiores**. São Carlos: Ed UFSCar, p.59-100, 2003.

KAY, L.E.; BASILE, D.V. Specific peroxidase isoenzymes are correlated with organogenesis. **Plant Physiology**, v. 84, p. 99-105, 1987.

LAGO, J.H.G., RAMOS, C.S.; CASANOVA, D.; MORANDIM, A.A.; BERGAMO, D.C.; CAVALHEIRO, A.; BOLZANI, V.; FURLAN, M., GUIMARÃES, E.; YOUNG, M.; KATO, M.J. Benzoic acid derivatives from Piper species and their fungitoxic activity against *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum*. **Journal Product Natural**. 67:1783-1788, 2004.

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 Agrícola**, v.56, n.1, p.21-5, 1999.

LIMA, G.P.P.; ZIGIOTTO, D.C.; TAKAKI, M. Micropropagação de *Salvia officinalis* L. com avaliação do teor de fenóis totais e atividade antioxidante. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.10, n.2, 2008.

MELO, A.E.; GUERRA, N.B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presente em alimentos. **Boletim SBCTA**, v.36, n.1, p.1-11, 2002.

MENSOR, L.L. et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v.15, p.127-30, 2001.

MÓGOR, G.; LIMA, G.P.P.; MÓGOR, A.F. Efeito de poliaminas exógenas no crescimento inicial *in vitro* e nos teores de fenóis, poliaminas e atividade da peroxidase em *Aloe vera* (L.) Burm. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.9, n.3, p.37-47, 2007.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

NUNOMURA, S.M.; GARCIA, G dos S.; TORRES, Z. E. dos S. Prospecção da atividade antioxidante em piperáceas amazônicas. In: 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia-SP, 2007. **Anais...** 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007.

PIMENTEL, F.A. **Técnicas para colheita, beneficiamento e armazenamento de sementes de pimenta longa (*Piper hispidinervium*)**. Acre: EMBRAPA/ACRE, n. 147, dez/2001 (Comunicado Técnico).

POVH, J.A. **Reguladores Vegetais e Bioestimulantes no desenvolvimento de *Salvia officinalis* L.: avaliações fisiológicas, bioquímicas e fitoquímicas**. Universidade Estadual Paulista, 2008. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas-Botânica). Botucatu-SP.

SANCHEZ-MORENO C.; LARRAURI, J.A.; SAURACALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.76, p.270-6, 1998.

SANTIAGO, E.J.A. de. **Caracterização morfológica e bioquímica de calos de pimenta longa (*Piper hispidinervium* Candolle, De Candolle)**. Universidade Federal de Lavras, 2003. Tese (Doutorado em Agronomia). Lavras-MG.

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.

SAUNDERS, B.C.; HOLMES-SIEDLE, AG.; STARK, B.P. **Peroxidase**. London: Butterworths, p.271, 1964.

SCHERER, R.; GODOY, H.T. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. **Food Chemistry**, v.112, p.654–658, 2009.

SIEGEL, B.Z. Plant peroxidases: na organismic perspective. **Plan Growth Regulation**. Oxford, v.12, p.303-312, 1993.

SILVA, R.F. da, **Metabólitos secundários das raízes de *Piper crassinervium* Kunth (*Piperaceae*)**. Universidade de São Paulo, 2006, 92p. Dissertação (Mestrado em Química) São Paulo-SP.

SOARES, Sergio Eduardo. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista Nutrição**, Campinas, v. 15, n.1, jan. 2002

SOUZA, C.C. **Influência de poliaminas no desenvolvimento de plantas de inhame (*Dioscorea* sp) cultivadas *in vitro***. Botucatu, 2002. 86p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Instituto de Biociências. Universidade Estadual Paulista

SOUZA, C.M.M.; ROCHA, H.; VIEIRA-JR, G.M.; AYRES, M.C.; COSTA, C.L. da; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.; BARROS, E.D.; ARAÚJO, P.B. de M.; BRANDÃO, M.S.; CHAVES, M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante em cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v.30, p.351-5, 2007

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4ª ed. Artmed, Porto Alegre, 820p., 2009.

TEPE, B. EMINAGAOGU, O.; AKPULAT, H.A.; AYDIN, E.; Antioxidant potentials and rosmarinic acid levels of the methanolic extracts of *Salvia verticillata*

(L.) subsp. *verticillata* and *S. verticillata* (L.) subsp. *Amasiaca* (Freyn & Bornm.) Bornm. **Food Chemistry**, v.100, p.985- 9, 2007.

VELLOSA, J.C.R.; BARBOSA, V. de F.; OLIVEIRA, O.M.M. de, Pesquisa de produtos naturais: plantas e radicais livres. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.4, n.2, p. 119-130, 2007.

VALLE, R. de C.S.C. **Estratégias de cultivo de células de pimenta longa e determinação de parâmetros cinéticos**. Universidade Federal de Santa Catarina, 2003. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Florianópolis-SC

ZHAO, G.R. et al. Antioxidant activities of *Salvia miltiorrhiza* and *Panax notoginseng*. **Food Chemistry**, v.99, p.767- 74, 2005.

**CAPÍTULO III- POLIAMINAS EXÓGENAS E CITOCININA NA
MICROPROPAGAÇÃO DE PIMENTA LONGA (*Piper
hispidinervium* C.DC.) E TEORES ENDÓGENOS DE
POLIAMINAS LIVRES**

POLIAMINAS EXÓGENAS E CITOCININA NA MICROPROPAGAÇÃO DE PIMENTA LONGA (*Piper hispidinervium* C.DC.) E TEORES ENDÓGENOS DE POLIAMINAS LIVRES

Luciani Marcia Scherer Salvaro¹, Elizabeth Orika Ono¹, Débora Zanoni do Prado²,
Giuseppina Pace Pereira Lima¹

RESUMO - O presente trabalho teve como objetivo verificar a eficiência da técnica de micropropagação, utilizando as poliaminas espermina (Spm) e espermidina (Spd) e a citocinina benzilaminopurina (BAP), isolados ou combinados entre si, bem como verificar o teor endógeno de poliaminas livres em plântulas de *Piper hispidinervium*. Os tratamentos utilizados foram: T1: MS (testemunha), T2: 1 mg L⁻¹ BAP, T3: 1 mM Spd, T4: 1 mM Spd + 1 mg L⁻¹ BAP, T5: 1 mM Spm, T6: 1 mM Spm + 1 mg L⁻¹ BAP e T7: 1 mM Spd + 1 mM Spm. Foram inoculadas 3 repetições para cada tratamento, sendo 6 microestacas para cada repetição. As análises biométricas de porcentagem de formação de calo, número de raízes, número de brotações e altura das plântulas foram realizadas aos 30 e 60 dias após a inoculação (DAI). Não houve diferença significativa para o enraizamento e altura das plântulas. A formação de brotos ocorreu somente no tratamento acrescido de BAP e Spd. O tratamento com Spm + BAP resultou em maior teor endógeno de putrescina (Put) aos 30 DAI. A adição de poliaminas exógenas e citocinina não induziu aumento nos teores endógenos de Spd e Spm.

Palavras-chave: BAP, espermidina, espermina, putrescina.

EXOGENOUS POLYAMINES AND CYTOKININ ON MICROPROPAGATION OF LONG PEPPER (*Piper hispidinervium* C.DC) AND ENDOGENOUS CONTENTS OF FREE POLYAMINES

Luciani Marcia Scherer Salvaro, Elizabeth Orika Ono,
Giuseppina Pace Pereira Lima

ABSTRACT - The aim of this present paper was to check the efficiency of micropropagation techniques using polyamines exogenous spermine (Spm), spermidine (Spd) and cytokinin benzilaminopurine (BAP) isolated or combined among them, and also check the endogenous contents of free polyamines in *Piper hispidinervium* seedlings. The treatments used were: T1: MS (control), T2: 1 mg L⁻¹ BAP, T3: 1 mM Spd, T4: 1 mM Spd + 1 mg L⁻¹ BAP, T5: 1 mM Spm, T6: 1 mM Spm + 1 mg L⁻¹ BAP and T7: 1 mM Spd + 1 mM Spm. Three repetitions were inoculated for each treatment with six microcuttings for each repetition. The analysis of percentage of callus formation, number of roots, number of shoots and height (cm) of each explants were realized at 30 and 60 DAI. It doesn't significant results to rooting and higher of seedlings. The formation of shoots occurred only in the added treatments of BAP, combined with Spd. The treatment with Spm + BAP turned in a higher content endogenous of Putrescine (Put) at 30 DAI. The addition of exogenous polyamines and cytokinin doesn't induced a higher content of endogenous Spd and Spm.

Key words: BAP, spermidine, spermine, putrescine

1- INTRODUÇÃO

A pimenta longa (*Piper hispidinervium* C.DC) é uma piperácea rústica, abundantemente encontrada no estado do Acre, em campos abandonados e áreas de pastagens (PIMENTEL, 2001).

As piperáceas têm sido muito estudadas nos últimos anos, pois, possuem importância econômica, ecológica e medicinal, sendo que muitas espécies são utilizadas na alimentação e na medicina popular para o tratamento de muitas patologias, como asma, bronquite, tosse, dores abdominais, diarreias, reumatismo, feridas, tendo efeitos antibacterianos, antifúngicos, antileucêmico (LEAL, 2000). Em virtude disso, as piperáceas se apresentam como uma importante fonte para a pesquisa fitoquímica e biológica (MOREIRA *et al.*, 1995; BENEVIDES *et al.*, 1999).

A importância econômica da pimenta longa concentra-se na extração do safrol, um importante constituinte químico do óleo essencial, encontrado na parte aérea da espécie. Durante muito tempo o safrol era obtido da canela sassafrás (*Ocotea odorifera*), uma espécie abundante na Mata Atlântica do Sul do Brasil. Porém, com a extração desenfreada deste recurso natural obtido do caule da planta, houve um decréscimo na população da espécie, levando quase a sua extinção. Tal fato culminou com a publicação do decreto do IBAMA, nº1557/91, proibindo a exploração da canela sassafrás para obtenção do safrol (VALLE, 2003). A partir daí, os estudos se voltaram para a pimenta longa, a qual permite a exploração do safrol de forma sustentável, pois a espécie rebrota facilmente após o corte.

No entanto, ainda há falta de informações básicas sobre a germinação e propagação desta espécie em outras regiões do Brasil, o que gera dúvidas sobre a possibilidade de cultivo da espécie em clima diferente do seu ambiente natural. Fumagali *et al.* (2008) afirmam que plantas originárias de biótipos específicos podem apresentar dificuldades para se desenvolver fora de seu ecossistema específico. Isso tem levado os cientistas e biotecnologistas a considerar a cultura de células, tecidos e órgãos vegetais como alternativa para produzir os metabólitos secundários *in vitro*, bem como a obtenção da plântula inteira, visando a propagação massal. Além disso, com a demanda pela utilização de plantas medicinais e aromáticas, o cultivo dessas espécies torna-se uma alternativa cada vez mais importante na agricultura nacional (CORRÊA JÚNIOR *et al.*, 1994).

A cultura de tecidos vegetais tem sido frequentemente usada como modelo para estudar o desenvolvimento, bem como os metabólitos presentes, devido à maior facilidade de obtenção das plantas, quando estabelecido um protocolo (ARNALDOS *et al.*, 2001). Substâncias como as poliaminas têm sido utilizadas amplamente no cultivo *in vitro*, juntamente com outros 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).

Em cultura de tecidos, as poliaminas vêm sendo muito utilizadas, buscando-se sempre obter diversos tipos de respostas, tais como embriogênese, enraizamento (RUGINI, 1991), perfilhamento (MÓGOR *et al.*, 2007), entre outros.

Desta forma, levando em consideração a importância econômica da pimenta longa, bem como a carência de estudos básicos a respeito de sua propagação, o presente estudo tem como objetivo verificar a eficiência de um protocolo de micropropagação, utilizando combinações de poliaminas e citocinina, visando o estabelecimento de microestacas, oriundas da germinação *in vitro*, bem como verificar os teores endógenos de poliaminas livres nos tecidos das plântulas obtidas.

2- MATERIAL E MÉTODOS

O material vegetal utilizado neste experimento foi coletado no jardim clonal da Faculdade de Ciências Agronômicas da Universidade Estadual Paulista (FCA/UNESP), Campus de Botucatu-SP. A coleta do material vegetal ocorreu no período de fevereiro a março de 2008 e a condução dos experimentos foi realizada no período de março a dezembro de 2008.

Foram coletadas espiguetas de pimenta longa, apresentando coloração verde escura com sementes de coloração preta (PIMENTEL, 2001).

As espiguetas foram transportadas em vidros com tampa plástica até o Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, do Departamento de Química e Bioquímica, IB/UNESP, Campus de Botucatu-SP, onde foi realizado o beneficiamento das sementes de acordo com a metodologia proposta por Pimentel (2001).

Para o beneficiamento, as espiguetas contendo as sementes foram deixadas de molho em água destilada por um período de 24 horas, sendo após maceradas para

liberar as sementes. Com o auxílio de um tecido fino, as sementes foram lavadas sucessivamente até que não houvesse mais resíduos. Posteriormente à lavagem, as sementes foram submetidas à secagem em temperatura ambiente, em local ventilado e sobre papel filtro, durante 5 dias.

Após a secagem, as sementes de pimenta longa foram inoculadas assepticamente em câmara de fluxo laminar, em frascos de vidro para cultura de tecidos vegetais, com capacidade para 200 mL, contendo 20 mL do meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), isento de reguladores vegetais, acrescido de 3% de sacarose, geleificado com ágar e autoclavado a 121°C, durante 20 minutos. Após a inoculação, os frascos contendo as sementes foram mantidos em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas/luz e à temperatura de 26°C ± 2 e intensidade luminosa de 2000 Lux.

As plântulas germinadas e com aproximadamente 3 cm de altura (microestacas), com um par de folhas expandidas, inclusive as cotiledonares e desprovidas de raízes foram utilizadas como explantes para a realização deste trabalho.

O meio de cultura contendo as poliaminas e a citocinina foram preparados da mesma maneira que o meio utilizado para a germinação *in vitro*. No entanto, a citocinina foi adicionada antes da autoclavagem e as poliaminas foram adicionadas depois da autoclavagem, pois são substâncias termolábeis. O procedimento para adição das poliaminas ao meio de cultura foi realizado assepticamente em câmara de fluxo laminar, com auxílio de uma membrana (0,22 µm) estéril, acoplada a uma seringa descartável. As poliaminas foram adicionadas ao meio de cultura ainda quente e homogeneizadas com auxílio de bastão de vidro, sendo, posteriormente, os vidros vedados com papel alumínio.

Desta forma, foram utilizados os tratamentos apresentados na tabela 1.

TABELA 1: Tratamentos com diferentes combinações das poliaminas espermidina (Spd), espermina (Spm) e da citocinina benzilaminopurina (BAP) para a organogênese *in vitro* de *Piper hispidinervium* C.DC., a partir de microestacas oriundas da germinação *in vitro*.

Tratamentos	Concentrações
T1	MS (Testemunha)
T2	MS + 1,0mg L ⁻¹ BAP
T3	MS + 1,0mg L ⁻¹ BAP + 0,1 mM Spm
T4	MS + 0,1 mM Spm
T5	MS + 0,1 mM Spd
T6	MS + 1,0mg L ⁻¹ BAP + 0,1 mM Spd
T7	MS + 0,1 mM Spm + 0,1 mM Spd

Após a inoculação das microestacas nos devidos tratamentos, os frascos contendo os explantes foram mantidos em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas/luz, à temperatura de 26°C±2 e sob intensidade luminosa de 2000 Lux.

Aos 30 e 60 DAI foram realizadas as análises biométricas de porcentagem de formação de calo, número de raízes por explante, número de brotações por explante e altura das plântulas.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo 7 tratamentos, 3 repetições com 6 microestacas para cada repetição. Os dados foram submetidos à análise de variância (teste F) e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

2.1- Teor de poliaminas livres

O teor de poliaminas livres foi determinado de acordo com o método proposto por Flores & Galston (1982), modificado por Lima *et al.* (1999). As amostras foram coletadas no momento da inoculação, aos 30 e 60 DAI e armazenadas em freezer até a realização da análise de poliaminas livres. Para a realização das análises, as amostras foram pesadas e homogeneizadas em HClO₄ (5%) gelado, sendo após centrifugadas a 10.000 rpm durante 20 minutos. Alíquotas de 200 µL do sobrenadante foram adicionadas a 200 µL de carbonato de cálcio saturado e a 400 µL de cloreto de dansil e

deixadas durante 16 horas no escuro a temperatura ambiente. Após esse período, foram adicionados à mistura 100 μL de prolina, as quais ficaram em repouso por mais 30 minutos no escuro. Foram utilizados 500 μL de benzeno para retirar as poliaminas livres, obtendo-se então, o extrato dansilado, o qual foi aplicado com o auxílio de microseringa em placas de vidro recobertas por sílica gel 60-G e cromatografadas. O solvente utilizado foi clorofórmio-trietilamina (20:1 v/v). A separação foi acompanhada mediante luz UV. Após aproximadamente uma hora, as placas foram retiradas da solução de solvente e mantidas dentro da capela, com circulação de ar, até que estivessem secas. Posteriormente foram levadas para quantificação das poliaminas em densitômetro. Os padrões (controle, contendo putrescina, espermina e espermidina) foram dansilados e cromatografados da mesma maneira descrita. Os resultados foram expressos em μmol de poliaminas (espermidina, espermina e putrescina) g^{-1} de matéria fresca (M.F.).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 7 x 3 (7 tratamentos e 3 épocas de avaliação das plântulas), com três repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a tabela 2 observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos para os parâmetros biométricos número de raízes, número de brotações e altura das plântulas. Quanto a porcentagem de formação de calo, verificou-se que os tratamentos 2 (1,0 mg L^{-1} BAP), 4 (0,1 mM Spm) e 6 (1,0 mg L^{-1} BAP + 0,1 mM Spd) apresentaram 100% de formação de calo na base dos explantes, em todas as repetições. Como não houve variação entre as repetições dentro dos tratamentos, os dados não estão apresentados em tabelas

TABELA 2: Análise de variância para o número de raízes, brotos e altura em plântulas de *Piper hispidinervium* C.DC., obtidas da micropropagação em meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) acrescido de diferentes combinações de espermidina (Spd), espermina (Spm) e benzilaminopurina (BAP), com avaliação aos 30 e 60 dias após a inoculação (DAI). UNESP/Botucatu-SP, 2009

Quadrado médio (30 DAI)				
Fonte de variação (F.V.)	GL	Raízes	Brotos	Altura
Tratamento	6	29314,82*	18782,523*	5227,634*
Repetição	2	213,19	72,19	2152,428
Resíduo	12			
C.V. (%)		20,51	15,48	12,08

Quadrado médio (60 DAI)				
Fonte de variação (F.V.)	GL	Raízes	Brotos	Altura
Tratamento	6	31320,444*	36013,539*	243367,492*
Repetição	2	6377,19	190,285	5377,00
Resíduo	12			
C.V. (%)		21,51	11,68	15,94

* significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Conforme a tabela 3 observa-se aos 30 DAI que houve formação de raízes em todos os tratamentos. Os tratamentos com 1,0mg L⁻¹ BAP + 0,1 mM Spm (T3), 0,1 mM Spd (T5) e 0,1 mM Spm + 0,1 mM Spd (T7) apresentaram as melhores médias, com 7,77, 4,22 e 6,61 raízes por explante, respectivamente. No entanto, tais tratamentos não diferiram significativamente da testemunha, a qual ainda apresentou maior número de raízes por explante (8,5) em plântulas micropropagadas de pimenta longa.

TABELA 3: Número de raízes por explante em plântulas de *Piper hispidinervium* C.DC., obtidas da micropropagação em meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) acrescido de diferentes combinações de espermidina (Spd), espermina (Spm) e benzilaminopurina (BAP), com avaliação aos 30 e 60 dias após a inoculação (DAI). UNESP/Botucatu-SP, 2009.

Tratamentos	Número de raízes por explante em plântulas micropropagadas de <i>P. hispidinervium</i>	
	30 DAI	60 DAI
T1-Testemunha MS	8,50 A	18,33 A
T2-1,0 mg L ⁻¹ BAP	0,16 B	2,11 B
T3- 1,0mg L ⁻¹ BAP + 0,1 mM Spm	7,77 A	20,28 A
T4- 0,1 mM Spm	0,55 B	13,11 A
T5- 0,1 mM Spd	4,22 A	11,67 A
T6- 1,0mg L ⁻¹ BAP + 0,1 mM Spd	0,22 B	12,77 A
T7- 0,1 mM Spm + 0,1 mM Spd	6,61 A	13,44 A
C.V. (%)	20,51	21,51

Médias seguidas de mesma letra nas colunas, não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Aos 60 DAI, todos o tratamentos, com exceção do tratamento 2 (1,0 mg L⁻¹ BAP) apresentaram resultados semelhantes à testemunha quanto ao número de raízes por explante em plântulas micropropagadas de pimenta longa. O tratamento 2 apresentou diferença significativa dos demais tratamentos, com 2,11 raízes por explante. De acordo com o resultado do tratamento 2 pode-se presumir que a adição de BAP tenha favorecido o balanço hormonal endógeno à citocinina, resultando na formação de calo, o que prejudica a rizogênese (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Trabalhando com poliaminas exógenas adicionadas ao meio de cultura na micropropagação de *Hemerocallis* sp., Debiasi *et al.* (2007) relatam que não houve enraizamento nos tratamentos contendo Spd e Spm isoladas ou ainda cominadas entre si, ou com Put. No presente trabalho, mesmo não havendo diferença significativa dos tratamentos em relação à testemunha, ocorreu formação de raízes em todos os tratamentos, inclusive naqueles onde houve a formação de calo na base dos explantes (tratamentos 2, 4 e 6). O surgimento das raízes ocorreu principalmente no caule das plântulas. A adição de isolada de BAP ao meio de cultura foi prejudicial ao enraizamento e, quando o BAP foi adicionado junto com as poliaminas houve formação de considerável número de raízes. Ainda deve-se observar que a adição de poliaminas

isoladas ou combinadas entre si também resultaram em considerável número de raízes, embora significativamente semelhantes à testemunha.

Neste trabalho, a adição de poliaminas não influenciou na formação de raízes, porém muitos autores relatam os efeitos benéficos desses compostos não só no enraizamento, mas em outros processos. Tarengi *et al.* (1995) também relatam a importância das poliaminas para o enraizamento de explantes de morango e Tiburcio *et al.* (1999) confirmam a importância das poliaminas no enraizamento de explantes de tabaco. Os autores relatam que ao adicionar difluorometilornitina (DFMO) e difluorometilarginina (DFMA), inibidor da síntese de putrescina, o enraizamento era inibido e, ao transferir os explantes para um meio de cultura contendo poliaminas, o desenvolvimento acontecia normalmente.

Em relação ao número de brotos por explante, observa-se na tabela 4 que tratamento com $1,0\text{mg L}^{-1}$ BAP + $0,1\text{ mM Spd}$ (T6), contendo citocinina e espermidina, resultou em maior número de brotos aos 30 DAI (7,72), sendo significativamente superior aos demais tratamentos que apresentaram formação de brotos (tratamentos 2 e 4). Tal tendência de formação de brotos foi mantida, e aos 60 DAI, os explantes apresentaram 10,39 brotos por explante.

TABELA 4: Número de brotos por explante em plântulas de *Piper hispidinervium* C.DC., obtidas da micropropagação em meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) acrescido de diferentes combinações de espermidina (Spd), espermina (Spm) e benzilaminopurina (BAP), com avaliação aos 30 e 60 dias após a inoculação (DAI). UNESP/Botucatu-SP, 2009.

Tratamentos	Número de brotos por explante em plântulas micropropagadas de <i>P. hispidinervium</i>	
	30 DAI	60 DAI
T1-Testemunha MS	0,00 C	0,00 C
T2- $1,0\text{ mg L}^{-1}$ BAP	1,78 B	6,33 B
T3- $1,0\text{mg L}^{-1}$ BAP + $0,1\text{ mM Spm}$	0,00 C	0,00 C
T4- $0,1\text{ mM Spm}$	2,94 B	4,89 B
T5- $0,1\text{ mM Spd}$	0,00 C	0,00 C
T6- $1,0\text{mg L}^{-1}$ BAP + $0,1\text{ mM Spd}$	7,72 A	10,39 A
T7- $0,1\text{ mM Spm}$ + $0,1\text{ mM Spd}$	0,00 C	0,00 C
C.V. (%)	15,48	11,68

Médias seguidas de mesma letra nas colunas, não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Em geral, muitos autores relatam a influência das poliaminas na formação de brotações. Mógor *et al.* (2007) relatam que a aplicação exógena de poliaminas foi positiva em relação ao perfilhamento de explantes de *Aloe vera*. Bouchereau *et al.* (1999) também relatam o efeito estimulante da aplicação exógena de poliaminas em explantes de diversas espécies.

Quanto à altura dos explantes é possível observar na tabela 5, que aos 30 DAI, não houve diferença significativa entre os tratamentos. Aos 60 DAI o tratamento com 1,0mg L⁻¹ BAP + 0,1 mM Spm (T3) apresentou altura significativamente semelhante à testemunha, 9,52 e 9,60 cm, respectivamente. Os demais tratamentos não diferiram entre si e foram significativamente inferiores à testemunha.

TABELA 5: Altura (cm) de plântulas de *Piper hispidinervium* C.DC., obtidas da micropropagação em meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) acrescido de diferentes combinações de espermidina (Spd), espermina (Spm) e benzilaminopurina (BAP), com avaliação aos 30 e 60 dias após a inoculação (DAI). UNESP/Botucatu-SP, 2009.

Tratamentos	Altura (cm) de plântulas micropropagadas de <i>P. hispidinervium</i>	
	30 DAI	60 DAI
T1-Testemunha MS	3,47 A	9,60 A
T2-1,0 mg L⁻¹ BAP	3,21 A	3,63 B
T3- 1,0mg L⁻¹ BAP + 0,1 mM Spm	3,69 A	9,52 A
T4- 0,1 mM Spm	2,83 A	4,46 B
T5- 0,1 mM Spd	3,05 A	3,69 B
T6- 1,0mg L⁻¹ BAP + 0,1 mM Spd	2,73 A	3,47 B
T7- 0,1 mM Spm + 0,1 mM Spd	2,51 A	3,57 B
C.V.(%)	12,08	15,94

Médias seguidas de mesma letra nas colunas, não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Aos 60 DAI, observa-se que os tratamentos T2 (1,0mg L⁻¹ BAP), T4 (0,1 mM Spm) e T6 (1,0mg L⁻¹ BAP + 0,1 mM Spd) apresentaram explantes com menores alturas e apresentaram formação de brotos (tabela 4, aos 60 DAI). Segundo Debiassi (2000), em geral, o comportamento em relação à média proliferativa e o tamanho dos brotos *in vitro* é inversamente proporcional, ou seja, quanto maior o número de brotos formados em um explante, menor será o seu tamanho. Neste trabalho, tal fato também

pode ser atribuído ao efeito fisiológico das citocininas, como a quebra da dominância apical e a indução do crescimento de gemas laterais (MERCIER, 2008) aliadas às poliaminas, resultando em mais brotações com altura reduzida. Alguns autores mencionam ainda, que as poliaminas possuem efeitos fisiológicos semelhantes aos das citocininas (GALSTON, 1983; SERGIEV *et al.*, 1995; GEUNS *et al.*, 2001).

3.1- Teor de poliaminas livres

Quanto ao teor endógeno das poliaminas, observa-se na tabela 6, que microestacas de *Piper hispidinervium* inoculadas em meio de cultura MS, acrescido de diferentes poliaminas isoladas ou combinadas entre si e, ainda, combinadas com citocinina, bem como a época de avaliação das plântulas, influenciaram no teor endógeno das mesmas. Também houve efeito significativo da interação entre tratamentos e época de avaliação das plântulas.

TABELA 6: Análise de variância para os teores endógenos de putrescina (Put), espermidina (Spd) e espermina (Spm) em plântulas de *Piper hispidinervium* C.DC., obtidas da micropropagação em meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) acrescido de diferentes combinações de espermidina (Spd), espermina (Spm) e benzilaminopurina (BAP), com avaliação no momento da inoculação (tempo 0), aos 30 e 60 dias após a inoculação (DAI). UNESP/Botucatu-SP, 2009

Fonte de variação (F.V.)	GL	Quadrado Médio		
		Put	Spd	Spm
Tratamento (T)	6	284736,9*	16280,6*	140474,3*
Coleta (C)	2	1306632*	98530,4*	1288596,6*
T x C	12	358799,2*	16518,02*	67356,0*
Resíduo	42			
C.V. (%)		9,75	17,39	1,38

* significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Na tabela 7, de acordo com as médias obtidas para os teores endógenos de Put nas épocas de avaliação das plântulas, observa-se que no momento da inoculação (tempo 0) os teores endógenos de Put nas plântulas apresentaram quantidades não

consideráveis. Aos 30 DAI, houve aumento nos teores endógenos de Put, sendo que nesta avaliação, as plântulas de pimenta longa apresentaram maior teor endógeno de Put (482,32 μmol de Put g^{-1} M.F.), o qual apresentou decréscimo aos 60 DAI (248,37 μmol de Put g^{-1} M.F.).

De acordo ainda com a tabela 7, os maiores teores endógenos de Put aos 30 DAI foram observados no tratamento com 1,0mg L^{-1} BAP + 0,1 mM Spm (T3) e aos 60 DAI o tratamento com 1,0mg L^{-1} BAP + 0,1 mM Spd (T6) apresentou os maiores teores endógenos de Put nas plântulas, no entanto não houve diferença significativa em relação à testemunha.

Vários são os relatos da participação de poliaminas em processos celulares de desenvolvimento e crescimento vegetal (KUMAR *et al.*, 1997; VIU, 2000). Segundo Galston & Flores (1991), todos os organismos vivos dependem das poliaminas, descrevendo que o seu teor é proporcional ao crescimento celular, havendo assim a possibilidade das poliaminas desenvolverem papel crucial na divisão celular

TABELA 7: Teores endógenos de putrescina (Put), espermidina (Spd) e espermina (Spm) (μmol de poliaminas g^{-1} M.F.) em plântulas de *Piper hispidinervium* C.DC., obtidas da micropropagação em meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) acrescido de diferentes combinações de espermidina (Spd), espermina (Spm) e benzilaminopurina (BAP), com avaliação no momento da inoculação (tempo 0), aos 30 e 60 dias após a inoculação (DAI). UNESP/Botucatu-SP, 2009.

Teores endógenos de putrescina (Put) em plântulas micropropagadas de <i>P. hispidinervium</i>			
Tratamentos	0 DAI	30 DAI	60 DAI
T1-Testemunha MS	- *	-	319,36 Aa
T2-1,0 mg L ⁻¹ BAP	-	963,72 Ba	90,91 Cb
T3- 1,0mg L ⁻¹ BAP + 0,1 mM Spm	-	1603,51 Aa	241,75 Bb
T4- 0,1 mM Spm	-	246,25 Ca	253,41 Ba
T5- 0,1 mM Spd	-	75,61 Db	256,62 Ba
T6- 1,0mg L ⁻¹ BAP + 0,1 mM Spd	-	265,25 Cb	354,83 Aa
T7- 0,1 mM Spm + 0,1 mM Spd	-	221,67 Ca	221,75 Ba
Média	-	482,32	248,37

Teores endógenos de espermidina (Spd) em plântulas micropropagadas de <i>P. hispidinervium</i>			
Tratamentos	0 DAI	30 DAI	60 DAI
T1-Testemunha MS	-	-	124,8 Aa
T2-1,0 mg L ⁻¹ BAP	-	295,61 Aa	101,36 Bb
T3- 1,0mg L ⁻¹ BAP + 0,1 mM Spm	-	251,0 Ba	-
T4- 0,1 mM Spm	-	194,11 Ca	-
T5- 0,1 mM Spd	-	62,23 Ea	-
T6- 1,0mg L ⁻¹ BAP + 0,1 mM Spd	-	-	-
T7- 0,1 mM Spm + 0,1 mM Spd	-	99,06 Da	-
Média	-	128,86	32,3

Teores endógenos de espermina (Spm) em plântulas micropropagadas de <i>P. hispidinervium</i>			
Tratamentos	0 DAI	30 DAI	60 DAI
T1-Testemunha MS	1783,78 Ab	2176,98 Aa	1481,82 Ac
T2-1,0 mg L ⁻¹ BAP	1783,78 Aa	1334,83 Fb	1370,82 Bb
T3- 1,0mg L ⁻¹ BAP + 0,1 mM Spm	1783,78 Aa	1333,43 Fb	1212,52 Ec
T4- 0,1 mM Spm	1783,78 Aa	1668,57 Bb	1248,76 Dc
T5- 0,1 mM Spd	1783,78 Aa	1487,68 Db	1173,2 Fc
T6- 1,0mg L ⁻¹ BAP + 0,1 mM Spd	1783,78 Aa	1383,43 Eb	1321,41 Cc
T7- 0,1 mM Spm + 0,1 mM Spd	1783,78 Aa	1601,58 Cb	1320,89 Cc
Média	1783,78	1569,5	1304,2

Médias seguidas de mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. C.V.(%) Put = 9,75; Spd = 17,39; Spm = 1,38.

*quantidades não significativas.

Bagni *et al.* (1981) relatam que, geralmente, os teores de poliaminas endógenas são elevados em tecidos jovens e em plantas que apresentam crescimento ativo. Neves *et al.* (2002) apontaram correlação positiva entre o acúmulo de poliaminas e o enraizamento em espécies florestais, sugerindo que a determinação dos teores endógenos de poliaminas sirvam como marcadores de enraizamento. Tal fato está em concordância com este trabalho, onde o maior teor endógeno de Put foi encontrado aos 30 DAI no tratamento com $1,0\text{mg L}^{-1}$ BAP + $0,1\text{ mM Spm}$ (T3), cuja rizogênese e crescimento em altura foram significativos, apesar de semelhantes à testemunha

O tratamento com $1,0\text{mg L}^{-1}$ BAP (T2) também apresentou valores elevados aos 30 DAI, no entanto, estes diferiram estatisticamente entre si. Apesar disso, pode-se sugerir que o elevado teor endógeno de Put neste tratamento seja em virtude da taxa de brotação apresentada, ou devido ao estresse causado pela citocinina, resultando em brotações anormais. Silva *et al.* (2006) relatam o mesmo efeito do BAP em *Piper hispidinervium* micropropagada.

Galston & Kaur-Sawhney (1990) relatam o acúmulo de Put nos tecidos e órgãos vegetais, em resposta a vários tipos de estresse. Dessa forma, possivelmente, a concentração de BAP pode ter sido excessiva e ter desencadeado o acúmulo de Put nas plântulas.

Por outro lado, considerando o exposto no parágrafo anterior, que a Put apresenta teores endógenos elevados quando o tecido apresenta elevadas taxas de formação de brotos, observa-se que neste trabalho tal fato não ocorreu nos tratamentos com $0,1\text{ mM Spm}$ (T4) e $1,0\text{mg L}^{-1}$ BAP + $0,1\text{ mM Spd}$ (T6), os quais apresentaram também apresentaram formação de brotos. Bouchereau (2000) afirma que eventos de divisão e diferenciação celular no processo de desenvolvimento vegetal, geralmente apresentam a participação de Spd e/ou Spm, poliaminas formadas a partir da Put e de grupos amino propil vindo de S-adenosil metionina (SAM). Assim, a baixa concentração desta poliamina nos tratamentos 4 e 6, pode indicar que boa parte desta, tenha sido convertida a outras formas de poliaminas (Spm e/ou Spd) agindo diretamente na indução da divisão e diferenciação celular, levando a formação de maior número de brotos laterais (DEBIASI, 2007).

Quanto aos teores endógenos de Spd, observa-se na tabela 7 que, aos 30 DAI o tratamento 2 ($1,0\text{mg L}^{-1}$ BAP) apresentou diferença significativa em relação aos demais tratamentos, com $295,61\text{ }\mu\text{mol de Spd g}^{-1}\text{ M.F.}$. O tratamento 3 ($1,0\text{mg L}^{-1}$ BAP + $0,1\text{ mM Spm}$) apresentou valores próximos ($251,0\text{ }\mu\text{mol de Spd g}^{-1}\text{ M.F.}$), embora

significativamente diferente do tratamento 2. Aos 60 DAI, a testemunha apresentou o maior teor endógeno de Spd. Desta forma, pode-se afirmar que a adição de poliaminas exógenas não induziu o aumento no teor de Spd endógena aos 60 DAI.

Lima *et al.* (2007) relatam que as poliaminas Spd e Spm são relacionadas a organogênese, já que estão ligadas ao DNA. Os autores mencionam que em *Colocasia esculenta in vitro*, os teores endógenos de Spm prevaleceram sobre os teores de Spd e tal resultado também é relatado por Roussos & Pontik (2007) em jojoba. Observa-se que neste trabalho houve tendência de formação de Spm nos explantes e decréscimo do teor endógeno de Spd.

À Spm tem sido atribuído o papel protetor nas membranas, interagindo com moléculas carregadas negativamente, modulando, dessa forma, as cargas superficiais e, conseqüentemente, regulando a permeabilidade e a estabilidade, sendo importante sob condições de estresse, onde ocorre a peroxidação e a desestabilização de membranas (ROY *et al.*, 2005). Desta forma, o elevado teor endógeno de Spm pode estar ligado a possível função antioxidante atribuída as poliaminas.

Debiasi *et al.* (2007) evidenciam a predominância de Spm endógena em plântulas de *Hemerocallis* sp. cultivadas *in vitro* e os autores atribuem tal fato ao metabolismo das enzimas poliaminas sintetase e S-adenosilmetionina sintetase, resultando num acúmulo de Spm, principalmente. Os autores afirmam que há possível tendência de formação de Spm na espécie. Esta observação também é feita por Martin-Tanguy & Carré (1993) e concorda com o resultado obtido neste trabalho.

O valor encontrado para o teor endógeno de Spm na testemunha, aos 30 DAI, pode ser justificado pela síntese de Spm e Spd por meio da Put. Assim, no momento da avaliação das plântulas a Put já teria sido convertida a Spm, através da ação de enzimas de interconversão (TASSONI *et al.*, 2000). Observa-se que aos 60 DAI, o teor endógeno de Put na testemunha apresentou acréscimo, provavelmente devido ao crescimento dos explantes e também à rizogênese.

4- CONCLUSÕES

A adição de poliaminas e citocininas ao meio de cultura mostrou-se benéfica para a micropropagação de *Piper hispidinervium* em relação à formação de brotos nas plântulas. Em relação ao enraizamento e crescimento em altura das plântulas, não houve

efeito para a adição de poliaminas isoladas e combinadas com citocinina ao meio de cultura.

A adição de poliaminas influenciou nos teores endógenos de Put e não influenciou nos teores de Spd e Spm. No entanto os teores endógenos de Spm foram elevados em todos os tratamentos.

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARNALDOS, T.L.; MUNOZ, R.; FERRER, M.A.; CALDERON, A.A.. Changes in phenol content during strawberry (*Fragaria X ananassa*, c.v. Chandler) callus culture. **Physiologia Plantarum**, v.113, p.315-22, 2001.

BAGNI, N.; SERAFINI-FRACASSINI, D. Involvement of polyamines in the mechanism of break of dormancy in *Helianthus tuberosus*. **Bulletim Society Bot. France Actual Botanical**, n.132, p.119-125, 1985.

BENEVIDES, P.J.C; SARTORELLI, P.; KATO, M.J. Phenylpropanoids and Neolignans from *Piper regnellii*. **Phytochemistry**, v.52, p.339 – 343, 1999.

BOUCHEREAU, A. AZIZ, A.; LARHER, F.; MARTIN-TANGUY J. Polyamines and environmental challenges: recent development. **Plant Science**, v.140, p.103-25, 1999

BOUCHEREAU, A. et al. Analysis of amines in plant materials. **Journal of Chromatography Biology**, v. 747, p. 49-67, 2000.

CORRÊA JUNIOR, C.; MING, L. C.; SCHEFFER, M. C. **Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas**. 2.ed. Jaboticabal: FUNEP, 1994. 151p.

DEBIASI, C.; FRÁGUAS, C.B.; LIMA, G.P.P. Estudo das poliaminas na morfogênese *in vitro* de *Hemerocallis* sp. **Ciência Rural**, v.37, n.4, p.1014- 1020. 2007.

DEBIASI, C. **Caracterização fisiológica e bioquímica da dominância apical em bananeira (*Musa acuminata* Colla)**. Tese (Doutorado em Agronomia), 2007. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho-UNESP, Botucatu-SP.

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.

FUMAGALI, E.; GONÇALVES, R.A.C.; MACHADO, M. de F.P.S.; VIDOTI, G.J.; OLIVEIRA, A.B de, Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista brasileira de farmacognosia**, vol.18, n.4 p. 627-641, 2008.

GALSTON, A.W. Polyamines as modulators of plant development, **BioScience**, v.33, p. 382– 388, 1983.

GALSTON, A.W., FLORES, H.E. Polyamines and planta morfogenesis. In: Slocum, R.D., FLORES, H.E. **Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants**, CRC Press, p. 175- 186, 1991.

GALSTON, A.W., KAUR-SAWHNEY, R. Polyamines and plant cells-what's new in plant physiology. **Plant Physiology**, v. 11, p. 5-8, 1990.

GEUNS, J.M.C., SMETS, R., STRYF, T., PRINSEN, E., VALCK, R., ONCKELEN, H.V. Apical dominance in *Pss-it*-transformed tobacco. **Phytochemistry**, n. 58, p. 911-921, 2001.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. *et al.* (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília-DF: Embrapa, 1998. V.1, p.183-260.

KUMAR, A.; ALTABELA, T.; TAYLOR, M.A., TIBURCIO, A. F. Recent advances in polyamine research. **Trends in Plant Science Reviews**, v. 2, p. 124-130, 1997

LEAL, L F. **Estudo Químico e Avaliação da Atividade Farmacológica e Microbiológica de *Piper mikanianum* (Kunth) Steudel**. Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina, 2000, p.158. Dissertação de Mestrado em Química.

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 Agrícola**, v.56, n.1, p.21-5, 1999.

LIMA, G.P.P.; FRÁGUAS, C.B.; PLAZA, J.J.G.; RAMOS, P.R.R. Poliaminas e atividade da peroxidase em *colocasia esculenta* micropropagadas tratadas com NaCl. **Científica**, Jaboticabal, v.35, n.1, p.22 - 30, 2007

MARTIN-TANGUY, J.; CARRE, M. Polyamines in grapevine microcuttings cultivated *in vitro*. Effects of amines and inhibitors as polyamine biosynthesis on polyamine leaves and microcuttings growth and development. **Plant Growth Regulation**, v.13, p.269-280, 1993

MERCIER, H. Auxinas. In: KERBAUY, G.B. **Fisiologia Vegetal** 2^a ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2008.

MÓGOR, G.; LIMA, G.P.P.; MÓGOR, A.F. Efeito de poliaminas exógenas no crescimento inicial *in vitro* e nos teores de fenóis, poliaminas e atividade da peroxidase em *Aloe vera* (L.) Burm. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.9, n.3, p.37-47, 2007.

MOREIRA, D.L.; KAPLAN, M.A.C.; GUIMARÃES, E.F. Constituintes Químicos de *Piper solmsianum* C.DC.(PIPERACEAE). **Revista Brasileira de Farmácia**, v.76, n.4, p.106 – 109, 1995

- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio-assay with tobacco tissue cultures. **Physiology Plant**, v. 15, 1962.
- NEVES, C., SANTOS, H., VILAS-BOAS, L., AMANCIO, S. Involvement of free and conjugated polyamines and free amino acids in the adventitious rooting of micropropagated cork oak and grapevine shoots. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 40, p. 1071-1080, 2002.
- PIMENTEL, F.A. **Técnicas para colheita, beneficiamento e armazenamento de sementes de pimenta longa (*Piper hispidinervium*)**. Acre: EMBRAPA/ACRE, n. 147, dez/2001 (Comunicado Técnico).
- RAJAM, M.V. Polyamines. In: PRASAD, M.N.V. (Ed.). **Plant Ecophysiology**. New York: J.Wiley, 1997. p.343-74.
- ROUSSOS, P.; PONTIKS, C. A. Changes of free, soluble conjugated and bound polyamine titers of jojoba explants under sodium chloride salinity *in vitro*. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.164, n.7, p.895-903, 2007.
- ROY, P.; NIYOKI, K.; SENGUPTA, D. N.; GHOSH, B. Spermidine treatment to rice seedlings recovers salinity stress induced damage of plasma membrane and PM-bound H⁺-ATPase in salt-tolerant and salt-sensitive rice cultivars. **Plant Science**, Limerick, v.168, n.3, p.583-591, 2005.
- RUGINI, E., LUPPINO, M.; AGAZIO, M. Endogenous polyamine and root morphogenesis variations under different treatments in cuttings and in *in vitro* explants of olive, **Acta Horticulturae**, v.300, p.225-232, 1991.
- SERGIEV, I.; ALEXIEVA, V.; KARANOV, E. Cytokinin and anticytokinin effects on growth and free polyamine content in etiolated and green radish cotyledons. **Journal of Plant Physiology**, v.145 p. 266–270, 1995.
- 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, T.L. da ; Rodrigo da Silva GUEDES, R. da S.; COSTA, F.H. da S.; PEREIRA, J.E.S. Multiplicação *in vitro* da pimenta longa (*Piper hispidinervium*). In: 46º Congresso Brasileiro de Olericultura, 2006, Goiânia-GO. **Anais...** 46º Congresso Brasileiro de Oleicultura, 2006.
Disponível em: <http://www.abhorticultura.com.br/Biblioteca/Default.asp>. Acesso em 20 de fevereiro de 2009.
- TARENGHI, E. et al. Effects of inhibitors of polyamine biosynthesis and of polyamines on strawberry microcutting growth and development. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.42, n.1, p.47-55, 1995.
- TASSONI, A. et al. Polyamine content and metabolism in *Arabidopsis thaliana* and effect of spermidine on plant development. **Plant Physiology Biochemistry**, v.36, p.383-93, 2000.

TIBURCIO, A.F.; ALTABELLA, T.; BORRELL, A.; MASGRAU, C. Polyamine metabolism and its regulation, **Physiologia Plantarum**, v. 100, p. 664–674, 1997.

VALLE, R. de C.S.C. **Estratégias de cultivo de células de pimenta longa e determinação de parâmetros cinéticos**. Universidade Federal de Santa Catarina, 2003. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Florianópolis-SC.

VIU, A.F.M. **Organogênese e poliaminas em açafrão (*Curcuma longa* L.)**. Universidade Estadual Paulista, 2000, 125p. Tese (Doutorado em Agronomia). Botucatu-SP.

**CAPÍTULO IV- POLIAMINAS EXÓGENAS E CITOCININA SOBRE O TEOR
DE FLAVONÓIDES, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E
ATIVIDADE DA PEROXIDASE EM PIMENTA LONGA (*Piper
hispidinervium* C.DC.)**

POLIAMINAS EXÓGENAS E CITOCININA SOBRE O TEOR DE FLAVONÓIDES, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ATIVIDADE DA PEROXIDASE EM PIMENTA LONGA (*Piper hispidinervium* C.DC.)

Luciani Marcia Scherer Salvaro, Elizabeth Orika Ono, Giuseppina Pace Pereira Lima

RESUMO - O presente trabalho teve como objetivo verificar a influência de poliaminas exógenas e citocinina sobre o teor de flavonóides totais, atividade antioxidante e atividade da enzima peroxidase em plântulas de *Piper hispidinervium*. Os tratamentos utilizados foram: T1: MS (testemunha), T2: 1mg L⁻¹ BAP, T3:1mM Spd, T4: 1m M Spd + 1mg L⁻¹ BAP, T5: 1mM Spm, T6: 1mM Spm + 1mg L⁻¹ BAP e T7: 1mM Spd + 1mM Spm. Foram inoculadas 3 repetições para cada tratamento, sendo 6 microestacas para cada repetição. Para as análises bioquímicas foram realizadas coletas no momento da inoculação, aos 30 e 60 DAI. Nas condições realizadas, a adição de poliaminas cominadas induziu elevados teores de flavonóides totais, atividade antioxidante e atividade da enzima peroxidase.

Palavras-chave: BAP, espermina, espermidina, micropropagação

EXOGENOUS POLYAMINES AND CYTOKININ ON CONTENTS OF TOTALS FLAVONOIDS, ANTIOXIDANT ACTIVITY AND PEROXIDASE ACTIVITY IN LONG PEPPER (*Piper hispidinervium* C.DC)

Luciani Marcia Scherer Salvaro, Elizabeth Orika Ono, Giuseppina Pace Pereira Lima

ABSTRACT - The aim of this present paper was to verify to influence of polyamines exogenous and cytokinins about the contents of totals flavonoids, antioxidant activity, and activity of peroxidase enzyme in *Piper hispidinervium* seedlings. The treatments used were: T1: MS (control), T2: 1mg L⁻¹ BAP, T3:1mM Spd, T4: 1m M Spd + 1mg L⁻¹ BAP, T5: 1mM Spm, T6: 1mM Spm + 1mg L⁻¹ BAP and T7: 1mM Spd + 1mM Spm. Three repetitions were inoculated for each treatment with six microcuttings for each repetition. For biochemical analysis the collects were realized in the moment of inoculation, at 30 and 60 DAI. In the realized conditions, was observed that the application of polyamines combined induced elevated contents of total flavonoids, antioxidant activity and activity of peroxidase enzyme.

Key-words: BAP, espermine espermidine, micropropagation

1- INTRODUÇÃO

Nos últimos anos os estudos com espécies aromáticas e medicinais vêm aumentando e o interesse se concentra na obtenção de moléculas bioativas, ou ainda, na descoberta de novos produtos naturais.

Pesquisas recentes estabeleceram que nos países ocidentais, 25% das moléculas alvo foram originalmente isoladas de plantas (VIEGAS Jr *et al.*, 2006) e a produção de metabólitos secundários vem sendo feita por cultivos de plantas medicinais e aromáticas.

Como consequência ocorrem problemas ambientais que têm colocado em risco a integridade e a manutenção dos ecossistemas. Além disso, algumas espécies nativas estão sofrendo erosão genética acelerada, principalmente pela perda de variabilidade, consequência direta do alto volume de extração em seus ambientes naturais (ORELLANA *et al.*, 1994).

Diferentemente do que ocorria no passado, atualmente a coleta de plantas medicinais e aromáticas não é tão simples, dada a importância que o conhecimento da biodiversidade vem tendo entre a sociedade e a legislação específica que governos vêm adotando e, em muitas situações, são necessárias permissões dos órgãos governamentais responsáveis para a extração de plantas (MING, 1996). Um exemplo de exploração desenfreada de recursos naturais foi a proibição do corte da canela sassafrás (*Ocotea odorifera*), através do Decreto do IBAMA nº 1557/91. A espécie encontrada em abundância na Região Sul do Brasil, quase entrou em extinção devido à derrubada para extração do safrol contido no óleo essencial presente no caule. O safrol é muito apreciado pela indústria química e farmacêutica e com a proibição do corte da canela sassafrás, o Brasil passou a importar o óleo da China e Vietnã (VALLE, 2003).

A pimenta longa (*Piper hispidinervium* C.DC.), uma piperácea natural do Estado do Acre, surgiu como uma promessa na obtenção do safrol, além disso, a espécie possibilita o desenvolvimento de um sistema sustentável de obtenção do óleo, pois rebrota facilmente após a poda da parte aérea, que contem cerca de 95% de safrol em seu óleo essencial (PIMENTEL, 2001). Antes da descoberta da pimenta longa como fonte natural de safrol, a espécie era considerada invasora pelos agricultores, pois era frequente em campos abertos e antropizados. Atualmente, alguns estudos têm sido realizados em outras regiões do país, visando a adaptação da espécie a outros biomas (VALLE, 2003).

Por outro lado, plantas originárias de biótipos específicos podem ter muitas dificuldades para crescer fora de seus ecossistemas locais. Algumas espécies de plantas comuns não podem ser cultivadas em larga escala devido à sua susceptibilidade a patógenos. Isto tem conduzido os cientistas e biotecnologistas a considerar as culturas de células, tecidos e órgãos vegetais, como uma maneira alternativa para produzir os metabólitos secundários *in vitro* (FUMAGALI *et al.*, 2008).

A cultura de tecidos vegetais tem sido frequentemente usada como modelo para estudar o desenvolvimento, bem como os metabólitos presentes, devido à maior facilidade de obtenção das plantas, quando estabelecido um protocolo (ARNALDOS *et al.*, 2001). As poliaminas têm sido utilizadas na micropropagação de diversas espécies (RUGINI, 1991; MÓGOR *et al.*, 2007; DEBIASI *et al.*, 2007; FRANCISCO *et al.*, 2008) com a finalidade de regenerar e obter maior número de planta.

Além das poliaminas demonstrarem efeitos durante os eventos organogenéticos (TANG *et al.*, 2004), são atribuídas a estas substâncias efeitos antioxidantes, exercendo proteção às células, incluindo membranas, ácidos nucleicos e ácidos graxos poli-insaturados, de danos oxidativos (LOVAAS, 1997). Tais danos oxidativos são causados por espécies reativas de oxigênio (ROS), popularmente conhecidos como radicais livres e que resultam de processos metabólicos.

A oxidação de tecidos vegetais cultivados *in vitro* é um fenômeno observado em diversas espécies (TANG *et al.*, 2004), sendo relatado que a peroxidase (EC 1.11.1.7) apresenta alterações na atividade em tecidos que mostram algum tipo de escurecimento (LAUKKANEN *et al.*, 2000). Já as poliaminas exercem efeito protetor e quando usadas exogenamente tendem a induzir menor taxa de oxidação, promovendo diminuição na atividade da peroxidase (TANG *et al.*, 2004).

Além das poliaminas, os compostos fenólicos também exercem efeitos antioxidantes e são relatados em piperáceas Amazônicas (NUNOMURA *et al.*, 2006). Na literatura são escassos os trabalhos com pimenta longa *in vitro*, bem como a pesquisa por produtos do metabolismo secundário que possam ser úteis na indústria química, farmacêutica e cosmética.

Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo verificar o efeito de poliaminas e citocinina, bem como da época da avaliação das plântulas, nos teores de flavonóides totais, na atividade antioxidante e na atividade da enzima peroxidase em plântulas de *Piper hispidinervium* C.DC., provenientes do cultivo *in vitro*.

2- MATERIAL E MÉTODOS

O material vegetal utilizado neste experimento foi coletado no jardim clonal da Faculdade de Ciências Agronômicas da Universidade Estadual Paulista (FCA/UNESP), Campus de Botucatu-SP. A coleta do material vegetal ocorreu no período de fevereiro a março de 2008 e a condução dos experimentos foi realizada no período de março a dezembro de 2008.

Foram coletadas espiguetas de pimenta longa apresentando coloração verde escura com sementes de coloração preta (PIMENTEL, 2001).

As espiguetas foram transportadas em vidros com tampa plástica até o Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, do Departamento de Química e Bioquímica, IB/UNESP, Campus de Botucatu-SP, onde foi realizado o beneficiamento das sementes de acordo com a metodologia proposta por Pimentel (2001).

Para o beneficiamento, as espiguetas contendo as sementes foram deixadas de molho em água destilada por um período de 24 horas, sendo após maceradas para liberar as sementes. Com o auxílio de um tecido fino, as sementes foram lavadas sucessivamente até que não houvesse mais resíduos. Posteriormente à lavagem, as sementes foram submetidas à secagem em temperatura ambiente, em local ventilado e sobre papel filtro, durante 5 dias.

Após a secagem, as sementes de pimenta longa foram inoculadas assepticamente em câmara de fluxo laminar, em frascos de vidro para cultura de tecidos vegetais, com capacidade para 200 mL, contendo 20 mL do meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), isento de reguladores vegetais, acrescido de 3% de sacarose, geleificado com ágar e autoclavado a 121°C, durante 20 minutos. Após a inoculação, os frascos contendo as sementes permaneceram em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas/luz e à temperatura de 26°C ± 2 e intensidade luminosa de 2000 Lux.

As plântulas germinadas e com aproximadamente 3 cm de altura (microestacas), com um par de folhas expandidas, inclusive as cotiledonares e desprovidas de raízes foram utilizadas como explantes para a realização deste trabalho.

Para obtenção do material vegetal a ser utilizado nas análises bioquímicas, utilizaram-se as poliaminas espermina (Spm) e espermidina (Spd) na concentração de 1,0 mM, isoladas, combinadas entre si e combinadas com a citocinina BAP (benzilaminopurina) na concentração de 1,0 mg L⁻¹, a qual também foi testada

isoladamente e também, foi utilizada uma testemunha (meio MS), isenta de reguladores vegetais.

O meio de cultura contendo as poliaminas e a citocinina foram preparados da mesma maneira que o meio utilizado para a germinação *in vitro*, no entanto, a citocinina foi adicionada antes da autoclavagem e as poliaminas foram adicionadas depois da autoclavagem. O procedimento para adição das poliaminas ao meio de cultura foi realizado assepticamente em câmara de fluxo laminar, com auxílio de uma membrana (0,22 µm) estéril, acoplada a uma seringa descartável. As poliaminas foram adicionadas ao meio de cultura ainda quente e homogeneizadas com auxílio de bastão de vidro, sendo, posteriormente, os vidros vedados com papel alumínio.

Após a inoculação das microestacas nos devidos tratamentos, os vidros permaneceram em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas/luz, à temperatura de 26°C±2 sob intensidade luminosa de 2000 Lux.

As coletas para realização das análises do teor de flavonóides totais, atividade antioxidante e atividade da enzima peroxidase foram realizadas no momento da inoculação, aos 30 e 60 dias após a inoculação (DAI). Todas as análises foram realizadas com material fresco e em triplicata. Desta forma, as amostras foram acondicionadas em papel alumínio devidamente identificado, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer até o momento de realização das análises.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 7 x 3 (7 tratamentos e 3 épocas de coleta). Os dados foram submetidos à análise de variância (teste F) e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

2.1- Determinação de flavonóides totais

A análise foi realizada de acordo com o método espectrofotométrico adaptado de Santos e Blatt (1998) e Awad *et al.* (2000). Amostras frescas (50 mg) obtidas da micropropagação foram pulverizadas e maceradas em nitrogênio líquido e, em seguida, foram adicionados 4 mL da mistura metanol 70% (v/v) e ácido acético 10% (v/v). Os extratos foram levados para banho de ultrassom por 30 minutos e centrifugados por 20 minutos a 10.000 rpm. Ao sobrenadante foi acrescentado 0,2 mL de AlCl₃.6H₂O 10% e o volume completado com ácido acético 10 % (v/v). A mistura foi homogeneizada e

após 30 minutos filtrada e a absorbância verificada a 425 nm usando espectrofotômetro UV-Vis (Pharmacia Biotech – Ultrospec 2000).

O teor de flavonóides totais foi determinado em comparação com uma curva de referência (quercetina) ($y = 0,0832x + 0,01$ $R^2 = 0,9999$) e expressos em de flavonóides (equivalente quercetina) $\mu\text{g g}^{-1}$ M.F.(matéria fresca).

2.2- Determinação da atividade antioxidante (DPPH)

O método de determinação da atividade antioxidante usando DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) é um dos mais usados e consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical livre DPPH.

A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres e/ou a porcentagem de DPPH remanescente no meio reacional (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995; SÁNCHEZ-MORENO *et al.*, 1998). A porcentagem de atividade antioxidante (%AAO) corresponde à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante, sendo que a quantidade necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH é denominada concentração eficiente (CE_{50}), também chamada de concentração inibitória (CI_{50}). Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será sua CE_{50} e maior será sua atividade antioxidante (SOUZA *et al.*, 2007).

O procedimento para a análise foi descrito por Mensor *et al.* (2001). Para a obtenção do extrato etanólico, foram pesados 50 mg de amostra fresca. As amostras foram colocadas em béqueres juntamente com 10 mL de etanol P.A. e mantidas sobre chapa aquecedora até a evaporação completa do etanol. As amostras foram ressuspendidas em 10 mL de etanol, filtradas e armazenada em vidros com tampa. O extrato foi mantido em freezer até o momento da análise da atividade antioxidante.

Para a análise, os extratos etanólicos foram acondicionados em tubos de ensaio nas concentrações de 1250, 625, 500 e 375 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A essas concentrações foi adicionado etanol para que o volume total fosse de 2,5 mL (extrato etanólico + etanol). Em seguida foi adicionado 1 mL de solução de DPPH (0,3 mM) em cada tubo de ensaio. O controle foi obtido com 2,5 mL de etanol e 1 mL da solução de DPPH e um branco, com as respectivas concentrações dos extratos etanólicos e 2,5 mL de etanol, para todas as concentrações.

Após o tempo de reação de 30 minutos, a absorvância foi verificada a 518nm (espectrofotômetro UV/VIS – Pharmacia Biotech – Ultrospec 2000) e convertida em porcentagem de atividade antioxidante (AAO) usando a seguinte fórmula:

$$AAO\% = 100 - \{[(Abs amostra - Abs branco) \times 100] / Abs controle\}$$

A concentração eficiente, isto é, a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% (CE₅₀) foi determinada usando Microsoft Excel®, a partir de uma curva de regressão, plotando-se na abscissa as concentrações da amostra (1250, 624, 500 e 375 µg mL⁻¹) e na ordenada, a proporção da atividade antioxidante (AAO%), obtendo-se a equação da reta. A resolução desta equação resultou no valor de CE₅₀ (MENSOR, 2001). Já o IAA (índice de atividade antioxidante) é calculado a partir da concentração final de DPPH e do valor calculado para CE₅₀, conforme a fórmula sugerida por Scherer & Godoy (2009):

$$IAA = \frac{\text{Concentração final de DPPH } (\mu\text{g mL}^{-1})}{CE_{50} (\mu\text{g mL}^{-1})}$$

A partir do resultado obtido considera-se que o extrato apresenta atividade antioxidante pobre quando o IAA é menor do que 0,5, moderada quando o IAA do extrato se concentra entre 0,5 e 1,0, forte quando o IAA do extrato se concentra entre 1,0 e 2,0 e muito forte quando o IAA é maior do que 2,0 (SCHERER & GODOY, 2009).

2.3- Atividade da peroxidase

A análise da atividade da peroxidase foi realizada de acordo com método descrito por Lima *et al.* (1999). Amostras de 0,2 g de plântulas de *Piper hispidinervium* (massa fresca) foram pesadas e homogeneizadas em 3 mL de tampão fosfato de potássio 0,2 M e pH= 6,7. Em seguida, foram centrifugadas a 10.000 rpm, por 10 minutos a 4°C obtendo-se dessa maneira o extrato bruto.

O sobrenadante foi utilizado como fonte da enzima peroxidase pelo método espectrofotométrico proposto por Lima (1994). O sistema de reação continha 1,0 mL do

extrato enzimático (extrato bruto), 0,5 mL de solução de H₂O₂, 30%, 0,5 mL de solução de diclorofenol e aminoantipirina. Os tubos foram mantidos em banho-maria a 30°C por 5 minutos, sendo a reação interrompida pela adição de 2 mL de etanol absoluto. Procedeu-se a leitura imediatamente em espectrofotômetro a 505 nm. Os resultados foram expressos em mol de H₂O₂ decomposto min.⁻¹g⁻¹ proteína.

3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1- Teores de flavonóides totais

Quanto ao teor de flavonóides totais observa-se na tabela 1 que houve efeito significativo das poliaminas e citocinina e também da época de avaliação das plântulas. A interação entre os fatores também foi significativa, demonstrando a relação entre ambos.

TABELA 1: Análise de variância para teor de flavonóides totais (μg de flavonóides g⁻¹ M.F.) em plântulas de *Piper hispidinervium* C.DC. obtidas da micropropagação em meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) acrescido de diferentes combinações de espermidina (Spd), espermina (Spm) e BAP (benzilaminopurina), isoladas ou combinadas entre si, com avaliação no momento da inoculação (tempo 0), aos 30 e 60 dias após a inoculação (DAI). UNESP/Botucatu-SP, 2009

Fonte de variação (F.V.)	GL	Quadrado médio
Tratamento (T)	6	4,4178*
Avaliação (A)	2	8,5834*
T x A	12	3,7872*
Resíduo	42	
C.V. (%)	9,13	

* significativo a 5% de probabilidade pelo teste F

Na tabela 2, observa-se que para a primeira avaliação (tempo 0) do teor de flavonóides totais nas plântulas de pimenta longa, não foi considerado o efeito dos tratamentos e, portanto, na tabela, os dados são os mesmos, mas, necessitam serem ilustrados para fins de comparação com as demais avaliações das plântulas (30 e 60 DAI).

Ainda na tabela 2, observa-se que de maneira geral, houve aumento nos teores de flavonóides entre as avaliações, desde a inicial (tempo 0) até a avaliação final (60 DAI) das plântulas de pimenta longa, as quais apresentaram teores de 357,1, 509 e 757,6 μg de flavonóides g^{-1} M.F., respectivamente.

TABELA 2: Teor de flavonóides totais (μg de flavonóides g^{-1} M.F.) em plântulas de *Piper hispidinervium* C.DC. obtidas da micropropagação em meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) acrescido de diferentes combinações de espermidina (Spd), espermina (Spm) e BAP (benzilaminopurina), isoladas ou combinadas entre si, com avaliação no momento da inoculação (tempo 0), aos 30 e 60 dias após a inoculação (DAI). UNESP/Botucatu-SP, 2009.

Teor de flavonóides totais (μg de flavonóides g^{-1} M.F.) em plântulas micropropagadas de <i>P. hispidinervium</i>			
Tratamentos	Épocas de avaliação das plântulas (DAI)		
	0 DAI	30 DAI	60 DAI
T1-Testemunha MS	357,1 Ac	554,41 Bb	884,5 Aa
T2-1,0 mg L^{-1} BAP	357,1 Ac	473,65 Cb	806,7 Aa
T3- 1,0 mg L^{-1} BAP + 0,1 mM Spm	357,1 Ac	549,3 Bb	828,1 Aa
T4- 0,1 mM Spm	357,1 Ab	186,23 Dc	694,9 Ba
T5- 0,1 mM Spd	357,1 Ac	462,94 Cb	701,9 Ba
T6- 1,0 mg L^{-1} BAP + 0,1 mM Spd	357,1 Ac	528,81 Bb	681,5 Ba
T7- 0,1 mM Spm + 0,1 mM Spd	357,1 Ac	807,68 Ab	705,5 Ba
Média	357,1	509	757,6

Médias seguidas de mesma letra, maiúscula nas colunas e minúscula nas linhas, não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. C.V.(%) = 9,13.

Aos 30 DAI, o tratamento 7 (0,1 mM Spm + 0,1 mM Spd) apresentou o maior teor de flavonóides, e, resultados semelhantes são relatados por Mógor *et al.* (2007) com a espécie *Aloe vera* cultivada *in vitro*. A atividade da enzima peroxidase também foi elevada (tabela 6) e, segundo Neves *et al.* (2002) existe correlação entre o aumento na concentração de compostos fenólicos com o aumento da atividade da POD, que é considerada por diversos autores como marcadora da organogênese (LIMA *et al.*, 2002). Outro fato que deve ser considerado é a elevada atividade antioxidante deste tratamento apresentada na tabela 4. Alguns autores relatam que os teores de compostos fenólicos estão relacionados à atividade antioxidante, sendo esta avaliada pelo método do radical livre, DPPH (MAILLARD & BERSSET, 1995; DIAS, *et al.*, 2006). Desta forma, sendo

os flavonóides substâncias antioxidantes, capazes de remover radicais livres, supõem-se que quanto maior o teor de flavonóides, maior será sua atividade antioxidante.

Já aos 60 DAI observa-se elevados teores de flavonóides totais em todos os tratamentos, inclusive na testemunha e dessa forma, não houve resultado significativo dos tratamentos em relação à testemunha. No entanto, mesmo sem resultado significativo, é importante destacar que as plântulas inoculadas nos tratamentos com poliaminas e citocinina eram provenientes da germinação *in vitro* e, portanto, estavam em pleno desenvolvimento.

Debiasi (2007) relata que o teor de flavonóides apresentou-se elevado em tecidos vegetais onde o metabolismo se apresentava alterado, devido aos processos de crescimento e desenvolvimento e, tal fato, concorda com os resultados do presente trabalho. Shimizu (2004) também afirma que os compostos fenólicos localizam-se nos grupos celulares presentes em órgãos e tecidos em início de desenvolvimento nos vegetais.

3.2- Atividade antioxidante (AAO)

Observa-se na tabela 3 que a adição de poliaminas e citocinina, bem como a época de coleta foi significativa para a atividade antioxidante em plântulas de *Piper hispidinervium* micropropagadas. A interação entre os fatores também foi significativa. O índice de atividade antioxidante (SCHERER & GODOY, 2009) obtidos neste trabalho variou de moderado a muito forte (APÊNDICE II).

TABELA 3: Análise de variância da atividade antioxidante (CE_{50} $\mu\text{g.mL}^{-1}$) em plântulas de *Piper hispidinervium* C.DC. obtidas da micropropagação em meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) acrescido de diferentes combinações de espermidina (Spd), espermina (Spm) e BAP (Benzilaminopurina), isoladas ou combinadas entre si, com avaliação no momento da inoculação, aos 30 e 60 dias após a inoculação (DAI). UNESP/Botucatu-SP, 2009.

Fonte de variação (F.V.)	GL	Quadrado médio
Tratamento (T)	2	10846,015*
Avaliação (A)	6	1750,423*
T x A	12	1235,5899*
Resíduo	42	
C.V. (%)	16,19	

* significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Na tabela 4, observa-se que para a primeira avaliação (tempo 0) atividade antioxidante nas plântulas de pimenta longa, não foi considerado o efeito dos tratamentos e, portanto, na tabela, os dados são os mesmos, mas, necessitam serem ilustrados para fins de comparação com as demais avaliações das plântulas (30 e 60 DAI).

Segundo Zhao *et al.* (2005), a atividade antioxidante pode ser definida como uma propriedade da célula em remover radicais livres formados por processos oxidativos. Os radicais livres são prejudiciais às células, pois são responsáveis por danos oxidativos que afetam a integridade celular. Desta forma, a atividade antioxidante é maior quando o CE_{50} é menor e vice-versa (SOUZA *et al.*, 2007).

De maneira geral, na tabela 4 é possível perceber que a atividade antioxidante foi semelhante para as avaliações aos 30 e 60 DAI e ambas foram superiores a avaliação das plântulas no momento da inoculação (tempo 0).

TABELA 4: Atividade antioxidante ($CE_{50} \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) em plântulas de *Piper hispidinervium* C.DC. obtidas da micropropagação em meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) acrescido de diferentes combinações de espermidina (Spd), espermina (Spm) e BAP (benzilaminopurina), isoladas ou combinadas entre si, com avaliação no momento da inoculação (tempo 0), aos 30 e 60 dias após a inoculação (DAI). UNESP/Botucatu-SP, 2009.

Atividade antioxidante ($CE_{50} \mu\text{g mL}^{-1}$) em plântulas micropropagadas de <i>P. hispidinervium</i>			
Tratamentos	Épocas de avaliação das plântulas (DAI)		
	0 DAI	30 DAI	60 DAI
T1-Testemunha MS	134,2 Ab	93,33 Ba	106,00 Ba
T2-1,0 mg L⁻¹ BAP	134,2 Ac	64,00 Aa	93,66 Bb
T3- 1,0mg L⁻¹ BAP + 0,1 mM Spm	134,2 Ab	100,33 Ba	91,00 Ba
T4- 0,1 mM Spm	134,2 Aa	119,66 Ba	142,66 Ca
T5- 0,1 mM Spd	134,2 Ab	128,66 Bb	80,33 Aa
T6- 1,0mg L⁻¹ BAP + 0,1 mM Spd	134,2 Ab	118,66 Bb	67,33 Aa
T7- 0,1 mM Spm + 0,1 mM Spd	134,2 Ab	63,33 Aa	65,33 Aa
Média	134,2	98,28	92,33

Médias seguidas de mesma letra, maiúscula nas colunas e minúscula nas linhas, não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. C.V.(%) = 16,19

Aos 30 DAI, os tratamentos 2 (1,0 mg L⁻¹ BAP) e 7 (0,1 mM Spm + 0,1 mM Spd) apresentaram a maior atividade antioxidante e aos 60 DAI, o tratamento 7 (0,1 mM Spm + 0,1 mM Spd) manteve elevada a atividade antioxidante. Concomitante à atividade antioxidante apresentada pelo tratamento 7 (0,1 mM Spm + 0,1 mM Spd), o teor de flavonóides também foi elevado neste tratamento aos 30 DAI (tabela 2). Tal fato é relatado por DIAS *et al.* (2006) em *Eugenia* sp. Além disso, pode-se destacar que este tratamento (Spm +Spd) resultou em um eficiente sistema antioxidante, pois, o índice de atividade antioxidante (IAA) obtido de acordo com a metodologia proposta por Scherer & Godoy (2009), demonstrou atividade antioxidante muito forte para este tratamento (APÊNDICE II).

Aos 60 DAI os tratamentos 5 (0,1 mM Spd) e 6 (1,0mg L⁻¹ BAP + 0,1 mM Spd), contendo Spd, isolada e combinada com BAP apresentaram atividade antioxidante semelhante ao 7 (0,1 mM Spm + 0,1 mM Spd) e tal atividade antioxidante, pode ser atribuída as poliaminas, neste caso a Spd.

As poliaminas são descritas como substâncias que podem prevenir ou diminuir a oxidação, agindo como possível antioxidante (LOVAAS, 1996). Segundo Tepe *et al.*

(2007), os antioxidantes são compostos que inibem ou atrasam a oxidação de outras moléculas pela inibição da iniciação ou propagação em cadeia de reação de oxidação e diversas moléculas podem ser consideradas antioxidantes, como a vitamina C, carotenóides, substâncias fenólicas, dentre elas os flavonóides e, também as poliaminas, quando adicionadas exogenamente (DEBIASI *et al.*, 2007).

3.3- Atividade da peroxidase (POD)

De acordo com a tabela 5 observa-se que houve influência tanto dos tratamentos como da época de coleta das plântulas na atividade da enzima peroxidase. Também houve efeito significativo para a interação entre ambos os fatores.

TABELA 5: Análise de variância da atividade da enzima peroxidase (μmol de H_2O_2 decomposto $\text{min}^{-1}\text{g}^{-1}$ proteína) em plântulas de *Piper hispidinervium* C.DC. obtidas da micropropagação em meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) acrescido de diferentes combinações de espermidina (Spd), espermina (Spm) e BAP (benzilaminopurina), isoladas ou combinadas entre si, com avaliação no momento da inoculação (tempo0), aos 30 e 60 dias após a inoculação (DAI). UNESP/Botucatu-SP, 2009.

Fonte de variação (F.V.)	GL	Quadrado médio
Tratamento (T)	6	66238,79*
Avaliação (A)	2	759411,63*
T x A	12	43154,19*
Resíduo	42	
C.V. (%)	17,46	

* significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Na tabela 6, observa-se que para a primeira avaliação (tempo 0) da atividade da enzima peroxidase nas plântulas de pimenta longa, não foi considerado o efeito dos tratamentos e, portanto, na tabela, os dados são os mesmos, mas, necessitam serem ilustrados para fins de comparação com as demais avaliações das plântulas (30 e 60 DAI).

TABELA 6: Atividade da enzima peroxidase (μmol de H_2O_2 decomposto $\text{min}^{-1}\text{g}^{-1}$ proteína) em plântulas de *Piper hispidinervium* C.DC. obtidas da micropropagação em meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) acrescido de diferentes combinações de espermidina (Spd), espermina (Spm) e BAP (benzilaminopurina), isoladas ou combinadas, com avaliação no momento da inoculação (tempo 0), aos 30 e 60 dias após a inoculação (DAI). UNESP/Botucatu-SP, 2009.

Atividade da enzima peroxidase (μmol de H_2O_2 decomposto $\text{min}^{-1}\text{g}^{-1}$ proteína) em plântulas micropropagadas de <i>P. hispidinervium</i>			
Tratamentos	Épocas de avaliação das plântulas (DAI)		
	0 DAI	30 DAI	60 DAI
T1-Testemunha MS	0,095 Ab	0,428 Ca	0,390 Ba
T2-1,0 mg L⁻¹ BAP	0,095 Ac	0,432 Cb	0,524 Aa
T3- 1,0mg L⁻¹ BAP + 0,1 mM Spm	0,095 Ab	0,556 Ba	0,151 Cb
T4- 0,1 mM Spm	0,095 Ab	0,280 Da	0,196 Ca
T5- 0,1 mM Spd	0,095 Ab	0,527 Ba	0,447 Ba
T6- 1,0mg L⁻¹ BAP + 0,1 mM Spd	0,095 Ac	0,242 Db	0,446 Ba
T7- 0,1 mM Spm + 0,1 mM Spd	0,095 Ab	0,665 Aa	0,614 Aa
Média	0,095	0,447	0,395

Médias seguidas de mesma letra, maiúscula nas colunas e minúscula nas linhas, não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. C.V.(%) = 17,46

Ainda na tabela 6, observa-se que, em geral, a atividade da enzima peroxidase foi maior aos 30 DAI e apresentou redução aos 60 DAI. O tratamento 7 (0,1 mM Spm + 0,1 mM Spd) apresentou a maior atividade tanto aos 30 como aos 60 DAI, o que pode ser relacionado à atividade celular meristemática (SHIMIZU, 2004), evidenciando a rizogênese dos explantes. A atividade celular também foi intensa no tratamento 2 (1,0mg L⁻¹ BAP) aos 60 DAI, o qual apresentou atividade enzimática semelhante ao tratamento T7 (0,1 mM Spm + 0,1 mM Spd). Tal fato é comprovado pela formação de brotos neste tratamento.

4- CONCLUSÕES

A combinação de Spd + Spm demonstrou ser um eficiente sistema antioxidante, resultando em maior em maior teor de flavonóides, bem como em elevada atividade antioxidante aos 30 DAI. A atividade enzimática também foi elevada neste tratamento.

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AWAD, A.M.; JAGER, A.; Van WESTING, L.M. Flavonoid and chlorogenic acid levels in apple fruit: characterization of variation. **Scientia Horticulturae**, v.83, p.249-63, 2000.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v.28, p.25-30, 1995.

DEBIASI, C.; FRÁGUAS, C.B.; LIMA, G.P.P. Estudo das poliaminas na morfogênese *in vitro* de *Hemerocallis* sp. **Ciência Rural**, v.37, n.4, p.1014- 1020. 2007.

DEBIASI, C. **Caracterização fisiológica e bioquímica da dominância apical em bananeira (*Musa acuminata* Colla)**. Tese (Doutorado em Agronomia), 2007. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho-UNESP, Botucatu-SP.

DIAS, M.; MAGINA, M.D.A.; PIZZOLATTI, M.G.; BRIGHENTE, M.C. Monitoramento de extratos de *Eugenia umbelliflora* Berg. através de testes antioxidantes. In: 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia-SP, 2006. **Anais...** 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2006.

FUMAGALI, E.; GONÇALVES, R.A.C.; MACHADO, M. de F.P.S.; VIDOTI, G.J.; OLIVEIRA, A.B de, Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol.18, n.4 p. 627-641, 2008.

FRANCISCO, A.A.; TAVARES, A.R.; KANASHIRO, S.; RAMOS, P.R.R.; LIMA, G.P.P. Reguladores vegetais e teores endógenos de poliaminas durante o desenvolvimento de taro cultivado *in vitro*. **Ciência Rural**, v.38, n.5, ago, 2008.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. *et al.* (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília-DF: Embrapa, v.1, p.183-260, 1998.

LAUKKANEN, H.; SOINI, H.; KONTUNEN-SOPPELA, S.; HOHTOLA, A.; VILJANEN, M. A mycobacterium isolated from tissue cultures of native *Pinus sylvestris* interferes with growth of Scot pinus seedlings. **Tree Physiology**, v.20, p.915-20, 2000.

LIMA, G.P.P. **Efeito do cálcio sobre o teor de poliaminas e atividade da peroxidase e redutase de nitrato em calos de arroz (*Oriza sativa* L. Cv. IAC 4440)**. Universidade Estadual Paulista, 1994, 85p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Botucatu-SP.

- LIMA, G.P.P.; BRASIL, O.G.; MARINHO, A.O. Poliaminas e atividade da peroxidase em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivado sob estresse salino. **Scientia Agrícola**, v. 56, p. 21-25, 1999.
- LIMA, G.P.P.; BALSALOBRES, C.; PIZA, I.M.T.; CEREDA, M.P. Efeito do BAP e ANA e atividade da peroxidase em mandioca (*Manihot esculenta* Crantz cv Mcol 22) cultivada *in vitro*. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 8, n. 2, p. 107-110, mai-ago, 2002.
- LIMA, G.P.P.; FRÁGUAS, C.B.; PLAZA, J.J.G.; RAMOS, P.R.R. Poliaminas e atividade da peroxidase em *colocasia esculenta* micropropagadas tratadas com NaCl. **Científica**, Jaboticabal, v.35, n.1, p.22 - 30, 2007
- LOVAAS, E. Antioxidative and metal-chelating effects of polyamines. **Advance in Pharmacology**, v.38, p.119-149, 1997
- LOVAAS, E. Antioxidante and metal-chellatying effects of polyamines. In: H. SIES (Ed.). **Advances in pharmacology antioxidants in disease mechanisms and therapy**. New York: Academic Press, v.38, p.119-49, 1996.
- MAILLARD, M.N.; BERSET, C. Evolution of antioxidant activity during kilning role of insoluble bound phenolic acids of barley and malt. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.43, p.1789-93, 1995.
- MENSOR, L.L.; MENEZES, FS.; LEITÃO, G.G.; REIS, A.S.; dos SANTOS, T.C.; COUBE, C.S.; LEITÃO, S.G.. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research** 15: 127-130, 2001.
- MING, L.C. 1996. Coleta de plantas medicinais. In: DI STASI, L.C. (Eds.). **Plantas medicinais: arte e ciência**. São Paulo, Editora UNESP. p.47-68.
- MÓGOR, G.; LIMA, G.P.P.; MÓGOR, A.F. Efeito de poliaminas exógenas no crescimento inicial *in vitro* e nos teores de fenóis, poliaminas e atividade da peroxidase em *Aloe vera* (L.) Burm. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.9, n.3, p.37-47, 2007.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- NEVES, C., SANTOS, H., VILAS-BOAS, L., AMANCIO, S. Involvement of free and conjugated polyamines and free amino acids in the adventitious rooting of micropropagated cork oak and grapevine shoots. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 40, p. 1071-1080, 2002.
- NUNOMURA, S.M.; GARCIA, G dos S.; TORRES, Z. E. dos S. Prospecção da atividade antioxidante em piperáceas amazônicas. In: 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia-SP, 2007. **Anais...** 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007.

ORELLANA, A.D.; PERLA, H.; HERRERA, M. Diagnóstico de Guatemala. In: O CAMPO, R.A. Ed. **Domesticación de plantas medicinales em Centroamérica**. Turrialba: Centro Agronômico Tropical de Investigación y Enseñanza, p. 13-27. 1994.

PIMENTEL, F.A. **Técnicas para colheita, beneficiamento e armazenamento de sementes de pimenta longa (*Piper hispidinervium*)**. Acre: EMBRAPA/ACRE, n. 147, dez/2001 (Comunicado Técnico).

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.

SANCHEZ-MORENO C.; LARRAURI, J.A.; SAURACALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.76, p.270-6, 1998.

SANTOS, M.D., BLATT, C.T.T. Teor de flavonóides e fenóis totais em folhas de *Pyrostegia venusta* M. de mata e de cerrado. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 21, n. 2, p. 135-140, 1998.

SERGIEV, I., V. ALEXIEVA, E. KARANOV, 1995. Cytokinin and anticytokinin effects on growth and free polyamine content in etiolated and green radish cotyledons. **Journal of Plant Physiology**, 145, 266–270.

SCHERER, R.; GODOY, H.T. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. **Food Chemistry**, v.112, p.654–658, 2009.

SHIMIZU, M.M. **Polifenoloxidase como fator de resistência da soja a nematóides e na oxidação do palmito**. (Tese de Doutorado) Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, 108 p., 2004.

SOUZA, C.M.M.; ROCHA, H.; VIEIRA-JR, G.M.; AYRES, M.C.; COSTA, C.L. da; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.; BARROS, E.D.; ARAÚJO, P.B. de M.; BRANDÃO, M.S.; CHAVES, M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante em cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v.30, p.351-5, 2007.

TANG, W.; NEWTON, R.J.; OUTHAVONG, V. Exogenously added polyamines recover browning tissues into normal callus cultures and improve plant regeneration in pine. **Physiologia Plantarum**, v.122, 386–395, 2004.

TEPE, B. EMINAGAOGLU, O.; AKPULAT, H.A.; AYDIN, E.; Antioxidant potentials and rosmarinic acid levels of the methanolic extracts of *Salvia verticillata* (L.) subsp. *verticillata* and *S. verticillata* (L.) subsp. *Amasiaca* (Freyn & Bornm.) Bornm. **Food Chemistry**, v.100, p.985- 9, 2007.

VALLE, R. de C.S.C. **Estratégias de cultivo de células de pimenta longa e determinação de parâmetros cinéticos**. Universidade Federal de Santa Catarina, 2003. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Florianópolis-SC.

VIEGAS Jr., C.; REZENDE, A.; SILVA, D.H.S.; CASTRO-GAMBÔA, I.; BOLZANI, V.S.; Aspectos químicos, biológicos e etnofarmacológicos do gênero *Cassia*. **Química Nova**, v.29, n.6, p.1279-86, 2006.

3- CONSIDERAÇÕES FINAIS

Trabalhos envolvendo a micropropagação de *Piper hispidinervium* são escassos. A maioria dos relatos se concentra na produção sustentável do safrol (componente químico do óleo essencial). Em se tratando de estudos bioquímicos com a espécie, observa-se carência de informações e sabe-se que espécies da família Piperaceae possuem diversas propriedades biológicas que as tornam importante economicamente. Por isso, estudos a respeito da espécie *Piper hispidinervium* são relevantes.

Em relação à micropropagação, os diferentes reguladores vegetais utilizados neste trabalho auxiliaram no desenvolvimento de plântulas de *Piper hispidinervium*. No entanto, novos estudos devem ser realizados para ajustar a melhor concentração e tipo de citocinina, já que o BAP promoveu plântulas de aspecto anormal, no entanto, o BAP foi responsável pelo maior número de brotações nas plântulas. Em relação ao IBA, o mesmo induziu a formação de raízes nas plântulas, bem como resultou em plântulas com maior altura.

As poliaminas também demonstraram serem benéficas para a micropropagação de *Piper hispidinervium*, quando objetiva-se a obtenção de brotações. Quanto ao enraizamento e altura das plântulas, não houve efeito significativo das poliaminas.

De maneira geral, o teor endógeno de Spd e Spm não foi influenciado pela adição dessas poliaminas ao meio de cultura e o teor endógeno de Put foi influenciado pela adição de BAP e Spm ao meio de cultura. O IBA isolado demonstrou ser efetivo para o aumento no teor de flavonóides aos 60 DAI. A combinação de Spd +Spm demonstrou ser um eficiente sistema antioxidante, resultando em elevado teor de flavonóides e atividade antioxidante.

Apesar da formação de calo em alguns tratamentos ser indesejável para a multiplicação de plântulas, tal fato pode ser interessante para a obtenção de metabólitos secundários de interesse econômico, os quais têm sido amplamente utilizados para produção de fármacos, cosméticos, produtos alimentícios dentre outros. Além disso, o estudo desses metabólitos secundários permite ainda a elucidação de processos fisiológicos e bioquímicos possivelmente ainda desconhecidos em plantas.

4- CONCLUSÃO GERAL

De acordo com os resultados obtidos e nas condições deste trabalho foi possível concluir que:

- O IBA propiciou o maior crescimento das plântulas e induziu maior número de raízes, bem como maior teor de flavonóides;
- A atividade antioxidante e da enzima peroxidase foi maior nos tratamentos com BAP;
- A adição de poliaminas isoladas e combinada entre si e com BAP não resultaram em enraizamento significativo e, em plântulas com altura significativa em relação à testemunha;
- A combinação de BAP + Spd foi benéfica para obtenção de novas brotações;
- Nas condições realizadas, a adição de poliaminas ao meio de cultura somente induziu aumento no teor endógeno de Put;
- O teor de flavonóides e a atividade antioxidante, bem como a atividade da enzima peroxidase foi elevada na combinação de Spm e Spd.

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, M. C. **Banco de sementes e simulação de clareiras na germinação de Pimenta Longa (*Piper hispidinervium* C. DC.)**. Universidade Federal do Acre, 1999. Dissertação (Mestrado). Rio Branco-AC.
- ATOUI, A. K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chemistry**, v.89, n.1, p. 27-36, 2005
- ASSADA, K. Ascorbate peroxidase – a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. **Physiology Plantarum**, v.85, p.235-241, 1992.
- ARBOS, K.A. **Estudo do potencial antioxidante de vegetais da família Cruciferae de diferentes cultivos**. Universidade Federal do Paraná, 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Curitiba-PR.
- BADI, H.N.; YAZDANI, D.; ALI, S.M.; NAZARI, F. Effects of spacing and harvesting time on herbage yield and quality/quantity of oil in thyme, *Thymus vulgaris* L. **Industrial Crops and Products** v.19, p. 231-236, 2004.
- BARBOSA-FILHO, J.M.; ALENCAR, A.A.; NUNES X.P.; TOMAZ, A.C.A.; SENA-FILHO, J.G.; ATHAYDE-FILHO, P.F.; SILVA, M.S.; SOUZA, M.F.V.; DA-CUNHA, E.V.L. Sources of alpha-, beta-, gamma-, delta- and epsilon-carotenes: A twentieth century review. **Revista Brasileira de Farmacognosia** v.18, p.135-154, 2008.
- BARDÓCZ, S.; DUGUID, T.C.; BROWN, D.S.; GRANT, G.; PUSZTAI, A.; WHITE, A.; RALPH, A. The importance of dietary polyamines in cell regeneration and growth. **British Journal of Nutrition**, v.73, p.819-828, 1995.
- BARROSO, G.M. **Sistemática de Angiosperma do Brasil**. São Paulo: EDUSP, V.1, 1978.
- BASU, P. S.; CHATTOPADHYAY, K. K.; BHATTACHARYYA, R. N. Relation of naphthalene acetic acid and 2,4- dichlorophenoxy acetic-acid induced growth of wheat coleoptile with IAA metabolism. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.36, p.109-712, 1998.
- BEAL M. F. Oxidatively modified proteins in aging and disease. **Free Radical Biology & Medicine** v. 32, n. 9, p., 797-803, 2002.
- BENEVIDES, P.J.C; SARTORELLI, P.; KATO, M.J. Phenylpropanoids and Neolignans from *Piper regnellii*. **Phytochemistry**, v.52, p.339 – 343, 1999.
- BIAVATTI, M.; MAENSI, V.; LEITE, S.N.; REIS, A. Ethnopharmacognostic survey on botanical compendia for potential cosmeceutic species from Atlantic Forest. **Revista Brasileira de Farmacognosia** v.17, p.640-653, 2007.

BOUCHEREAU, A.; AZIZ, A.; LARHER, F.; MARTIN-TANGUY, J. Polyamines and environmental challenges: recent development. **Plant Science**, v.140, p.103-125, 1999.

CAI, Y.; LUO, Q.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. **Life Sciences**, v. 74, p. 2157-2184, 2004.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P. & FERREIRA, M. E. **Meios nutritivos**. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. Cultura de Tecidos e Transformação Genética de plantas. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, p.87-132, 1998.

CLARO, L.M. **Ação *in vitro* das vitaminas C e E em eritrócitos humanos submetidos a sobrecarga oxidativa induzida pelo cloridrato de fenil-hidrazina**. Universidade Federal do Paraná, 2002. Dissertação (Mestrado em Ciências farmacêuticas). Curitiba-PR.

COLLI, S. **Outros reguladores: Brassinoesteróides, poliaminas, ácido jasmônico e salicílico**. In: KERBAUY, G.B. Fisiologia vegetal, 2ª. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 431p., 2008.

CYSNE, J.R.B. **Propagação *in vitro* de *Moringa oleifera* L.** 2006. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Universidade Federal do Ceará. Fortaleza-CE.

DA COSTA, N.P.; PEREIRA, L.A.G.; FRANÇA NETO, J.B. Método da peroxidase para identificação de cultivares de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, n. 1, v. 1, p. 89-93, 1979.

DEBIASI, C.; FRÁGUAS, C.B.; LIMA, G.P.P. Estudo das poliaminas na morfogênese *in vitro* de *Hemerocallis* sp. **Ciência Rural**, v.37, n.4, p.1014- 1020. 2007.

DEGÁSPARI, C.H., WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**. Curitiba, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.

DESAI H. V.; MEHTA 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, n. 1, p. 45-53, 1985.

DJILIANOV, D.; GENOVA, G.; PARVANOV, D.; ZAPRYANOVA, N.; KNSTANTINOVA, T.; ATANASSOV, A. *In vitro* culture of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** v.80, p.115-118, 2005

ELIASSEN, K.A.; REISTAD, R.; RISOEN, U.; RONNING, H.F. Dietary polyamines. **Food Chemistry**, v.78, p.273-280, 2002.

EL-SHERBINY, D. A.; KHALIFA, A. E.; ATTIA, A. S.; ELDENSHARY, E. E. S. *Hypericum perforatum* extract demonstrates antioxidant properties against elevated rat brain oxidative status induced by amnesic dose of scopolamine. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 76, p. 525-533, 2003

EMBRAPA/AC – Pimenta longa. **Centro de Informação de Pimenta longa**. Disponível em <http://www.embrapa.br/pimentalonga/faqs.htm>. Acesso em: 19 de dezembro de 2007.

FUMAGALI, E.; GONÇALVES, R.A.C.; MACHADO, M. de F.P.S.; VIDOTI, G.J.; OLIVEIRA, A.B de, Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.4 p. 627-641, 2008.

FUNASAKI, M. **Estruturas, atividade biológica e biossíntese de metabólitos de *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae)**. Universidade de São Paulo, 2006, 132p. Tese (Doutorado em Química Orgânica). São Paulo-SP.

GALSTON, A.W.; KAUR-SAWHNEY, R. **Polyamines as endogenous growth regulators**. In: DAVIES, P.J. (ed.) *Plant Hormones: physiology, biochemistry and molecular biology*. 2nd ed. Dordrecht, Kluwer Academic Press, 158 – 178, 1995.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. **Micropropagação**. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. p. 183-260.

HALLIWELL, B. Antioxidants in human health and disease. **Annual Review of Nutrition**, v. 16, p. 33-50, 1996.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3rd ed. Oxford:Oxford University Press, 1999

HARBORNE, J.B. **Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis**. Chapman and Hall. 288p, 1888.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo: Editora Nacional, 1993.

HARBORNE, J. B.; **Introduction to ecological biochemistry**, 3rd ed., Academic Press Limited: London, 1989,

KAKKAR, R.K.; SAWHNEY, V.K. Polyamine research in plants – a changing perspective. **Physiologia Plantarum**, v.116, p.281-292, 2002.

Kakkar RK, Nagar PK, Ahuja PS, Rai VK. Polyamines and plant morphogenesis. **Biologia Plantarum**. v.43, p. 1 -11, 2000.

KALAC, P.; KRAUSOVÁ, P. A review of dietary polyamines: Formation, implications for growth and health and occurrence in foods. **Food Chemistry**, v.90, p.219-230, 2005.

KLIEBENSTEIN, D.J.; Secondary metabolites and plant/environment interactions: a review through *Arabidopsis thaliana* tinged glasses. **Plant Cell Environmental** v. 27, p.675-684, 2004.

KOSAR, M.; DORMAN, H.J.D.; HILTUNEN, R. Effect of an acid treatment on the phytochemical and antioxidant characteristics of extracts from selected Lamiaceae species. **Food Chemistry**, v.91, p.525-33, 2005.

LAGO, J.H.G., RAMOS, C.S.; CASANOVA, D.; MORANDIM, A.A.; BERGAMO, D.C.; CAVALHEIRO, A.; BOLZANI, V.; FURLAN, M.; GUIMARÃES, E.; YOUNG, M.; KATO, M.J. Benzoic acid derivatives from *Piper* species and their fungitoxic activity against *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum*. **Journal Product Natural**. v.67, p.1783-1788, 2004.

LAUKKANEN, H.; SOINI, H.; KONTUNEN-SOPPELA, S.; HOHTOLA, A.; VILJANEN, M. 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.

LEAL, L. F. **Estudo Químico e Avaliação da Atividade Farmacológica e Microbiológica de *Piper mikanianum* (Kunth) Steudel**. Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina, 2000, p.158. Dissertação de Mestrado em Química.

LI, N., PARSONS, B.L., LIU, D.; MATTOO, A.K. Accumulation of wound-inducible ACC synthase transcript in tomato fruit is inhibited by salicylic acid and polyamines. **Plant Molecular Biology**, v.18, p. 477-487, 1992.

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)**. 1994. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) –Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista. Botucatu-SP.

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 Agrícola**. v.56, p. 21-25, 1999.

LIMA, G.P.P.; ZIGIOTTO, D.C.; TAKAKI, M. Micropropagação de *Salvia officinalis* L. com avaliação do teor de fenóis totais e atividade antioxidante. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.10, n.2, 2008.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Proceedings International Plant Propagator's Society**, Asheville, v.30, p.421-427, 1986.

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.

MACHADO, J.A. de G; ASTARITA, L.V.; SANTARÉM, E.R. Quantificação de flavonóides em culturas *in vitro* de *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 432-434, jul. 2007

MATSINGOU, T.C.; PETRAKIS, N.; KAPSOKEFALOU, M.; SALIFOGLU, A. Antioxidant activity of organic extracts from aqueous infusions of sage. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.50, p.6696-6701, 2003.

MATO, M. C.; RÚA, M. L.; FERRO, E. Changes in levels of peroxidases and phenolics during root formation in *Vitis* cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, v.72, p.84-88, 1988.

MILLAM, S.; OBERT, B.; PRET' OVÁ, A. Plant cell and biotechnology studies in *Linum usitatissimum* – a review. **Plant Cell, Tissue e Organ Culture** v.82, p.93-103, 2005.

MILIAUSKAS G.; VENSKUTONIS P.R.; VAN BEEK T.A. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. **Food Chemistry**, v.85, p.231-7, 2004.

MÓGOR, G.; LIMA, G.P.P.; MÓGOR, A.F. Efeito de poliaminas exógenas no crescimento inicial *in vitro* e nos teores de fenóis, poliaminas e atividade da peroxidase em *Aloe vera* (L.) Burm. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.9, n.3, p.37-47, 2007.

MOREIRA, D.L.; GUIMARÃES, E.F.; KAPLAN, M.A.C. A C – Glucosylflavone from Leaves of *Piper lhotzkyanum*. **Phytochemistry**, v.55, p. 783-786, 2000.

MOREIRA, D.L.; KAPLAN, M.A.C.; GUIMARÃES, E.F. Constituintes Químicos de *Piper solmsianum* C.DC.(PIPERACEAE). **Revista Brasileira de Farmácia**, v.76, n.4, p.106 – 109, 1995

MOREIRA, M.A.; PASQUAL, M.; CARVALHO, J.G.; FRÁGUAS, C.B. Estiolamento na micropropagação do abacaxizeiro CV. Pérola. **Ciência e Agrotecnologia**, v.275, p. 1002-1006, 2003.

MOURA, E.F; MANFIO, C.E.; CARVALHO, M.; OLIVEIRA, M.A.R. de; DIAS, G.L.S.; DIAS, J.M.M. Efeito de BAP e AIB na Propagação *In Vitro* de Baunilha (*Vanilla planifolia*). In: 46º Congresso Brasileiro de Olericultura, 2006, Goiânia-GO. **Anais...** 46º Congresso Brasileiro de Oleicultura, 2006. Disponível em: <http://www.abhorticultura.com.br/Biblioteca/Default.asp>. Acesso em 20 de fevereiro de 200

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio-assay with tobacco tissue cultures. **Physiology Plant**, v. 15, 1962.

NIJVELDT, J.R. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **American Journal Clinical Nutrition**, v. 74, p. 418–425, 2001.

NUNOMURA, S.M.; GARCIA, G dos S.; TORRES, Z. E. dos S. Prospecção da atividade antioxidante em piperáceas amazônicas. In: 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia-SP, 2007. **Anais...** 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007.

PAPADAKIS, A.K.; ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K.A. Polyamines inhibit NADPH oxidase-mediated superoxide generation and putrescine prevents programmed cell death syndrome induced by the polyamine oxidase-generated hydrogen peroxide. **Planta**, v.220, p.826-837, 2005.

PAREJO, I.; VILADOMAT, F.; BASTIDA, J.; ROSAS-ROMERO, A.; SAAVEDRA, G.; MURCIA, M. A.; JIMÉNEZ, A. M.; CODINA, C. Investigation of Bolivian plant extracts for their radical scavenging activity and antioxidant activity. **Life Sciences**, v. 73, p. 1667-1681, 2003.

PESCADOR, R.; ARAÚJO, P.S.; MAAS, C.H.; REBELO, R.A.; GIOTTO, C.R.; WENDHAUSEN JR., R.; LARGURA, G. e TAVARES, L.B.B. Biotecnologia da *Piper hispidinervium* – Pimenta longa. **Biotecnologia Ciência e desenvolvimento**, n 15, julho-agosto/2000.

PICHERSKY, E, GANG, D.R. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. **Trends Plant Science**, v.5, p.439-445, 2000.

PROENÇA DA CUNHA, A.; SILVA, A. P.; ROQUE, O. R. **Plantas e produtos vegetais em fitoterapia**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2003.

REGALADO, C.; GARCIA-ALMENDÁREZ, B. E.; DUARTE-VÁZQUEZ, M. A. **Phytochemistry Review**. v.3, 243-256, 2004.

RICE-EVANS, C.A.; PACKER, L. **Flavonoids in health and disease**. Marcel Dekker, Inc. New York. 468p., 2003.

RIVERO, P.V. **Poliaminas e morfogênese em tecidos de Solanum melongena L. cv Embú cultivados in vitro**. Instituto Butantã, 2006. **Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)**. São Paulo-SP.

ROCHA, S. F. R.; MING, L. C. ***Piper hispidinervium*: a sustainable source of safrole**. p. 479-481. In: JANICK, J. (Ed.). **Perpectives on new crops and new uses**. Alexandria: ASHS Press, 2000.

SANTIAGO, E.J.A. de. **Caracterização morfológica e bioquímica de calos de pimenta longa (*Piper hispidinervium* Candolle, De Candolle)**. Universidade Federal de Lavras, 2003. Tese (Doutorado em Agronomia). Lavras-MG.

SANTOS-GOMES, P.C.; SEABRA, R.M.; ANDRADE, P.B.; FERNANDES-FERREIRA, M. Phenolic antioxidant compounds produced by *in vitro* shoots of sage (*Salvia officinalis* L.). **Plant Science**, v.162, p.981-7, 2002.

SAUNDERS, B.C.; HOLMES-SIEDLE, AG.; STARK, B.P. **Peroxidase**. London: Butterworths, p.271, 1964.

SCALBERT, A; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **Journal of Nutritional**, v. 130. p. 2073-2085, 2000.

SCHWERTNER, A.B.S.; NAGAO, E.O.; HIDALGO, A.F.; ZAFFARI, G.R. Efeito do 6-benzilaminopurina (BAP) e do ácido indolacético (AIA) na propagação *in vitro* da caapeba [*Pothomorphe peltata* (L.) Miq.]. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.10, n.1, p.76-81, 2008.

SHOEB, F.; YADAV, J.S.; BAJAJ, S.; RAJAM, M.V. Polyamines as biomarkers for plant regeneration capacity: improvement of regeneration by modulation of polyamine metabolism in different genotypes of indica rice. **Plant Science**, v.160, p.1229 -1235, 2001.

SILVA, B. A.; FERRERES, F.; MALVA, J. O.; DIAS, A. C. P. Phytochemical and antioxidant characterization of *Hypericum perforatum* alcoholic extracts. **Food Chemistry**, v. 90, n. 1-2, p. 157-167, 2005.

SILVA, R.Z. da **Estudo fitoquímico e biológico da *Piper solmsianum* C.DC. var. solmsianum (Piperaceae)**. Universidade Federal de Santa Catarina, 2006. Tese (Doutorado em Química). Florianópolis-SC.

SILVA, T.L. da ; Rodrigo da Silva GUEDES, R. da S.; COSTA, F.H. da S.; PEREIRA, J.E.S. Multiplicação *in vitro* da pimenta longa (*Piper hispidinervium*). In: 46º Congresso Brasileiro de Olericultura, 2006, Goiânia-GO. **Anais...** 46º Congresso Brasileiro de Oleicultura, 2006.

Disponível em: <http://www.abhorticultura.com.br/Biblioteca/Default.asp>. Acesso em 20 de fevereiro de 2009.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia. Da planta ao medicamento. Editora da UFSC/Editora da UFRGS, 312-320, 1999.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Phenolics in Food and Nutraceuticals**. New York: CRC Press, 365p., 2004.

ŠKERGET M.; KOTNIK, P.; HADOLIN, M.; RIŽNER-HRAŠ, A.; SIMONIČ, M.; KNEZ, Z. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. **Food Chemistry**, v. 89, n. 2, p. 191-198, 2005.

SOKMEN, A.; GULLUCE, M.; AKPULAT, H.A.; DAFERERA, D.; TEPE, B.; POLISSIOU, M.; SOKMEN, M.; SAHIN, F. The *in vitro* antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. **Food Control** v.15, n.8, p.627-634, 2004.

SOUZA, C.C. **Influência de poliaminas no desenvolvimento de plantas de inhame (*Dioscorea* sp) cultivadas *in vitro***. Botucatu, 2002. 86p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Instituto de Biociências. Universidade Estadual Paulista

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4ª ed. Artmed, Porto Alegre, 820p., 2009.

TANG, W.; NEWTON, R.J.; OUTHAVONG, V. Exogenously added polyamines recover browning tissues into normal callus cultures and improve plant regeneration in pine. **Physiologia Plantarum**, v.122, 386–395, 2004.

TAVARES, A.R. **Poliaminas na micropropagação de *Aechmea distichantha* Lemaire**. 2000. 77 p. Tese (Doutorado em Horticultura) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.

TOMBOLATO, A.F.C.; COSTA, A.M.M. **Micropropagação de plantas ornamentais**. Boletim técnico n. 174. Campinas, Instituto Agrônomo, 72p.,1998.

TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília, v.1, p.183-242. 1998.

VALLE, R. de C.S.C. **Estratégias de cultivo de células de pimenta longa e determinação de parâmetros cinéticos**. Universidade Federal de Santa Catarina, 2003. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Florianópolis-SC.

VELLOSA, J.C.R.; BARBOSA, V. de F.; OLIVEIRA, O.M.M. de, Pesquisa de produtos naturais: plantas e radicais livres. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.4, n.2, p. 119-130, 2007.

VIU, A.F.M. **Organogênese e poliaminas em açafrão (*Curcuma longa* L.)**. (Tese de Doutorado) Agronomia – Área de Concentração em Horticultura - Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista. Botucatu, 125 p., 2000.

ZAIDAN, H.A. **Níveis de Putrescina, Poliaminas e Nutrientes Minerais Relacionados a Diferentes Concentrações de Potássio em Bananeira (*Musa* sp., AAA e AAB) cvs. Nanica e Prata Anã *in vitro***. Piracicaba: ESALQ/USP. 114p. 1998. Dissertação de Mestrado

ZHAO, G.R.; XIAN, Z.J.; YE, T.X.; YUAN, Y.J.; GUO, Z.X. Antioxidant activities of *Salvia miltiorrhiza* and *Panax notoginseng*. **Food Chemistry**, v.99, p.767- 74, 2005.

ZHENG, W.; WANG, S. Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 5165-5170, 2001.

YEPEZ, C.C.B. et al. Carotenóides totais em *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 10, n. 2, p. 89-93, Mai. 2008.

YUNCKER, T. G. The Piperaceae of Brazil. **Hoehnea**, São Paulo, v. 2, 1972.

WANG, L.; ZHANG, H. A theoretical study of the different radical-scavenging activities of catechin, quercetin, and a rationally designed planar catechin. **Bioorganic Chemistry** v.33, p. 108-115, 2005.

APÊNDICES

APÊNDICE I – Índice de atividade antioxidante - tratamentos com BAP e IBA.

Índice de atividade antioxidante (IAA) (SCHERER & GODOY, 2009), em plântulas de *Piper hispidinervium* C.DC., micropropagadas com os reguladores vegetais benzilaminopurina (BAP) e ácido indolilbutírico (IBA) nos tratamentos: T1: MS testemunha; T2: 0,25 mg L⁻¹ BAP; T3: 0,50 mg L⁻¹ BAP; T4: 0,75 mg L⁻¹ BAP; T5: 1,0 mg L⁻¹ BAP; T6: 0,25 mg L⁻¹ BAP + 0,25 mg L⁻¹ IBA; T7: 0,50 mg L⁻¹ BAP + 0,25 mg L⁻¹ IBA; T8: 0,75 mg L⁻¹ BAP + 0,25 mg L⁻¹ IBA; T9: 1,0 mg L⁻¹ BAP + 0,25 mg L⁻¹ IBA e T10: 0,25 mg L⁻¹ IBA e, coletadas ao 0, 30 e 60 DAI. IAA < 0,5= atividade pobre; IAA 0,5 a 1,0= atividade moderada; IAA 1,0 a 2,0= atividade forte e IAA > 2,0= atividade muito forte. UNESP/Botucatu-SP, 2009.

COLETA	TRATAMENTO	CE ₅₀	IAA	ATIVIDADE
Tempo 0	1	127,0780632	0,930609084	moderada
30 DAI	1	26,53976978	4,455954252	muito forte
30 DAI	2	48,43306036	2,441720575	muito forte
30 DAI	3	24,18930267	4,888937959	muito forte
30 DAI	4	12,08412206	9,786395683	muito forte
30 DAI	5	49,33851147	2,396910577	muito forte
30 DAI	6	64,95148734	1,820743525	Forte
30 DAI	7	86,19150953	1,372060898	Forte
30 DAI	8	64,00151712	1,847768699	Forte
30 DAI	9	100,0529962	1,181973599	Forte
30 DAI	10	105,6254755	1,119616261	Forte
60 DAI	1	83,71058477	1,412724572	Forte
60 DAI	2	114,7312686	1,030756492	Forte
60 DAI	3	60,34359232	1,95977726	muito forte
60 DAI	4	133,779041	0,883994975	moderada
60 DAI	5	95,88207771	1,233390043	Forte
60 DAI	6	9,895919689	11,95037993	muito forte
60 DAI	7	87,89737188	1,345432719	Forte
60 DAI	8	87,48438276	1,351784127	Forte
60 DAI	9	97,94040151	1,207469014	Forte
60 DAI	10	122,9759995	0,961651058	moderada

APÊNDICE II – Índice de atividade antioxidante - tratamentos com poliaminas e BAP.

Índice de atividade antioxidante (IAA) (SCHERER & GODOY, 2009), em plântulas de *Piper hispidinervium* C.DC., micropropagadas com poliaminas espermidina (Spd), espermina (Spm) e diamina putrescina (Put) e BAP, nos tratamentos: T1: MS testemunha; T2: 1,0 mg L⁻¹ BAP; T3: 1,0mg L⁻¹ BAP + 0,1 mM Spm; T4: 0,1 mM Spm; T5: 0,1 mM Spd; T6: 1,0mg L⁻¹ BAP + 0,1 mM Spd e, T7: 0,1 mM Spm + 0,1 mM Spd e, coletadas no momento da inoculação (tempo 0), aos 30 e 60 DAI. IAA < 0,5= atividade pobre; IAA 0,5 a 1,0= atividade moderada; IAA 1,0 a 2,0= atividade forte e IAA > 2,0= atividade muito forte. UNESP/Botucatu-SP, 2009.

COLETA	TRATAMENTO	CE ₅₀	IAA	ATIVIDADE
Tempo 0	1	1,342,583,946	0,919794881	Moderada
30 DAI	1	9,333,203,397	1,363,739,896	Forte
30 DAI	2	6,402,737,081	1,932,625,991	Forte
30 DAI	3	1,001,028,534	1,125,071,767	Forte
30 DAI	4	1,197,779,128	1,011,035,971	Forte
30 DAI	5	128,713,236	0,975119758	Moderada
30 DAI	6	1,186,709,373	1,192,077,379	Forte
30 DAI	7	6,340,130,109	1,741,991,678	Forte
60 DAI	1	1,059,818,083	1,159,959,357	Forte
60 DAI	2	9,350,467,088	1,257,409,244	Forte
60 DAI	3	9,092,264,396	1,974,612,406	forte
60 DAI	4	1,429,139,722	0,807977209	moderada
60 DAI	5	8,045,620,041	1,488,608,163	forte
60 DAI	6	6,734,388,747	1,342,183,903	forte
60 DAI	7	5,603,445,302	2,787,339,014	muito forte