

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste trabalho será disponibilizado somente a partir de 09/03/2019.

TIAGO FIDEMANN

**OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO DE CALOS DE
Capsicum baccatum var. pendulum**

ASSIS

2017

TIAGO FIDEMANN

**OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO DE CALOS DE
Capsicum baccatum var. *pendulum***

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e Letras de Assis – UNESP – Universidade Estadual Paulista para obtenção do título de Mestre em Biociências (Área de Conhecimento: Aplicação da Diversidade Biológica)

Orientador: Dr. Eutimio Gustavo Fernández Núñez

Co-Orientador(a): Dra Mônica Rosa Bertão

Bolsista: FAPESP 2014/26997-4

ASSIS

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca da F.C.L. – Assis – Unesp

F451o Fidemann, Tiago
Otimização das condições de cultivo de calos de *Capsicum
baccatum* var. **pendulum** / Tiago Fidemann. Assis, 2017.
81f. : il.

Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências e Letras
de Assis – Universidade Estadual Paulista.

Orientador: Dr. Eutímio Gustavo Fernández Núñez
Co-orientador: Dr^a Mônica Rosa Bertão

1. Pimenta. 2. Germinação. 3. Células vegetais. 4. Antioxi-
dantes. 5. Modelagem. I. Título.

CDD 581.4

FOLHA DE APROVAÇÃO

TIAGO FIDEMANN

OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO DE CALOS DE
Capsicum baccatum var. *pendulum*

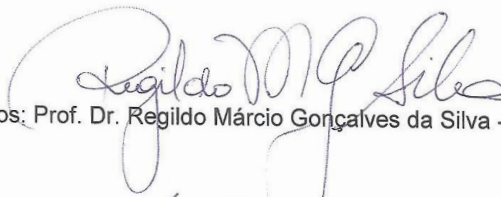
Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e Letras – UNESP/Assis para a obtenção do título de Mestrado Acadêmico em BIOCÊNCIAS (Área de Conhecimento: Caracterização e Aplicação da Diversidade Biológica)

Data da Aprovação: 09/03/2017

COMISSÃO EXAMINADORA



Presidente: Prof. Dr. Monica Rosa Bertão - UNESP/ASSIS



Membros: Prof. Dr. Regildo Márcio Gonçalves da Silva - UNESP/ASSIS



Prof. Dr. Nelson Barbosa Machado Neto - UNOESTE/PRESIDENTE PRUDENTE

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por ter permitido que mais essa etapa da minha vida seja concluída.

À minha família que teve paciência por em muitas reuniões eu não estar presente devido aos inúmeros experimentos e horas de estudos mesmo aos finais de semana, mas que mesmo assim me proporcionou condições para que eu pudesse concluir essa etapa, especialmente aos meus pais, Ronald Fidemann e Fátima Aparecida Barbosa Fidemann e meu irmão Anderson Henrique Fidemann.

Ao grupo do laboratório de Biotecnologia Vegetal que durante todo esse percurso tornou-se minha família, as pessoas que eu mais convivi durante esse período, que tornaram os dias mais alegres e fáceis para executar os experimentos.

Aos grandes amigos do laboratório, Rodrigo Boccoli Gallego, Lia Bossard Nascimento e Tárík Heluy Reis, os quais se tornaram mais próximos e com certeza devem estar nesses agradecimentos, pois eles foram imensamente importantes para o desenvolvimento desse projeto, ajudando a limpar as inúmeras vidrarias, oferecendo companhia aos finais de semana, contando as histórias engraçadas, enfim, tornando essa caminhada mais fácil.

À minha noiva Gabriela Aparecida de Araujo Pereira por ter me ajudado tanto profissionalmente, com sua experiência de laboratório, nas inúmeras dúvidas que surgem durante uma pesquisa levada à sério quanto emocionalmente, sendo uma verdadeira companheira, não me deixando ser vencido pelo cansaço ou pelas frustrações, além de ter toda a paciência e compreensão nas inúmeras ocasiões que não pude ser atencioso o quanto deveria ser.

Aos professores que aceitaram contribuir com a dissertação participando das bancas examinadoras.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pela bolsa concedida (2014/26997-4).

Por fim, as pessoas que me aceitaram no início de tudo, e sem elas, nada disso seria possível, Dr. Eutimio Gustavo Fernández Núñez e Dra Mônica Rosa Bertão, meus mais sinceros agradecimentos por todo o conhecimento transferido, tanto científico como pessoal, além da paciência e dedicação para que tudo isso fosse possível.

FIDEMANN, Tiago. **OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO DE CALOS DE *Capsicum baccatum* var. *pendulum***. 2017. 81 f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências). – Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Assis, 2017.

RESUMO

O estresse oxidativo e as inflamações estão associados a muitas doenças como diabetes, câncer, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, incluindo a aterosclerose, causando preocupação em todo o mundo. Como alternativa, as plantas podem desempenhar um papel chave no combate a essas desordens devido suas propriedades farmacológicas que são relacionadas a uma ampla gama de compostos com atividade antioxidante, entre eles, os compostos polifenólicos. Nesse contexto as pimentas podem ser uma alternativa para a obtenção desses compostos. Porém, a concentração desses metabólitos secundários é baixa e afetada por diversos fatores abióticos. Como alternativa para contornar esse problema foram utilizadas metodologias relacionadas com as culturas *in vitro* de células e de tecidos vegetais. O presente trabalho teve como objetivo padronizar a obtenção de explantes (Capítulo 1) a serem utilizados em uma cultura de calos otimizada através de uma abordagem sistêmica (Capítulo 2). No capítulo 1, por meio de um delineamento experimental fatorial completoadois níveis (2^4) determinou-se numericamente o efeito de quatro fatores [O tipo de solução para condicionamento osmótico (água e solução aquosa de KNO_3 a 1%), meio germinativo (água e água + ácido giberélico a $1,88 \text{ mg.L}^{-1}$), tempo (15 e 30 dias) e dois genótipos (Pitanga e Cambuci)] nas taxas de surgimento de cotilédones e na germinação. As respostas dos genótipos a solução de condicionamento osmótico e ao meio de germinação foram diferentes. A melhor combinação de tratamentos para germinação *in vitro* e desenvolvimento de plântulas para Pitanga e Cambuci foram água + água e água + água-ácido giberélico (GA_3), respectivamente. No capítulo 2, objetivando-se otimizar a etapa de cultura de calos da pimenta Cambuci para maior produção de biomassa e metabólitos secundários foram avaliados a origem do explante, o hormônio de crescimento e a concentração do mesmo através de um delineamento fatorial multiníveis. Os valores obtidos nas condições otimizadas foram: massa de calo (225,03 mg), atividade antioxidante (35,95%), fenóis totais (11,48mg de GAE / g DE) e flavonóides (15,92 mg de RU / g DE).

Palavras-chave: Germinação *in vitro*. Cultivo de calos. Produção de metabólitos secundários através de bioprocessos. *Capsicum baccatum* var. *pendulum*. Modelagem estatística.

FIDEMANN, Tiago. **OPTIMIZATION OF *Capsicum baccatum* var. *pendulum* CALLUS CULTURE CONDITIONS**. 2017. 81 f. Dissertation (Master's Degree in Biosciences). – Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Assis, 2017.

ABSTRACT

The oxidative stress and inflammations are associated with many diseases such as diabetes, cancer, cardiovascular and neurodegenerative diseases including atherosclerosis causing concern worldwide. As an alternative, the plants can play a key role due to their pharmacological properties against these disorders; these attributes are most of the times associated with the presence of polyphenolic compounds. In this context, peppers can be an alternative to obtain these compounds. However, the presence of secondary metabolites is low and affected by several abiotic factors. As an alternative to circumvent this problem, methodologies related to *in vitro* cultures of plant cells and tissues were applied. The objective of the present work was to standardize the extraction of explants (Chapter 1) to be used in a callus culture optimized through a systemic approach (Chapter 2). In Chapter 1, through a two-level full factorial experimental design (2^4) was numerically determined the effect of four factors [The solution type for osmotic conditioning (water and 1% KNO_3 aqueous solution), germination medium (agar and agar + gibberellic acid at 1.88 mg.L^{-1} , GA_3), post-sowing time (15 and 30 days) and two genotypes (Pitanga and Cambuci)] in cotyledon emergence and germination rates. The genotypes responses to the osmotic conditioning solution and to the germination medium were different. The optimal combination of treatments for *in vitro* germination and development of seedlings for Pitanga and Cambuci was water + agar and water + agar- GA_3 , respectively. In Chapter 2, aiming to optimize systemically the Cambuci pepper callus culture stage for higher biomass and secondary metabolites production were evaluated explant's origin, plant growth regulator type and their concentrations through a multilevel factorial design. The values obtained in the optimized conditions were: callus mass (225.03 mg), antioxidant activity (35.95%), total phenols (11.48mg of GAE/g DE) and flavonoids (15.92 mg of RU/g DE).

Keywords: *In vitro* germination. Callus culture. Secondary metabolites production through bioprocesses. *Capsicum baccatum* var. *pendulum*. Statistical modeling.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

- Figura 1** – Estruturas químicas de alguns capsaicinóides naturais. Fonte: adaptado de DAVIS et al., (2007)..... 13
- Figura 2** – *Capsicum baccatum* L. var pendulum (A). Fruto maduro de *Capsicum baccatum* L. var pendulum (B)..... 14
- Figura 3** – Formação de algumas das espécies reativas de oxigênio(ERO) durante o transporte de elétrons na mitocôndria.O superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio(H_2O_2) e radicais hidroxil (OH^{\cdot}) são formados como resultado da sucessiva transferência de elétrons isolados. A citocromo C oxidase transfere um total de quatro elétrons com extrema eficiência, mesmo assim, de 1-2% dos elétrons são constantemente perdidos dentro da célula como ERO potencialmente tóxicos. Fonte: HIRATA et al., (2004)..... 16
- Figura 4** – Estrutura nuclear dos flavonóides. Fonte: HEIM et al., (2002)..... 17
- Figura 5** – Quercetina parcialmente ionizada em C-4'. A doação do H radicalar para o radical livre ocorre principalmente nas posições C-4' (A) e C-7 (B). Ambos os radicais livres formados podem ter seu elétron deslocalizado pela estrutura, com maior estabilidade para os radicais A, C e D, devido à estabilização resultante das ligações de hidrogênio. Fonte: Adaptado de BARREIROS et al.; (2006)..... 17
- Figura 6** – Calos originados de cotilédones de *C. baccatum* var. pendulum..... 19

CAPÍTULO 1

- Figura 1**– Interaction graphs for in vitro germination rate. A: genotype-culture medium associated to yield of any detail related to germination emerging. B: osmotic conditioning solution (OCS)-culture medium associated to yield of any detail related to germination emerging for GN1. C: osmotic conditioning solution (OCS)-culture medium associated to yield of any detail related to germination emerging for GN2..... 37
- Figura 2** –Interaction graphs for *in vitro* cotyledon emerging rate. A: genotype-osmotic conditioning solution (OCS) associated to yield of cotyledon emerging for agar as germination culture medium. B: genotype-osmotic conditioning solution (OCS) associated to yield of cotyledon emerging for agar- GA_3 as germination culture medium..... 39

CAPÍTULO 2

- Figura 1A** – Interaction graphs for adjusted model associated to callus mass. A: Interaction between explant's origin and PGR type or mixture. B: Interaction between explant's origin and PGR concentration. C: Interaction between PGR

type or mixture and PGR concentration.....	70
--	----

Figura 2 – Interaction graph between explant’s origin and PGR type or mixture for adjusted model associated to budding index.....	73
--	----

Figura 3 – Interaction graphs for adjusted model associated to antioxidant activity. A: Interaction between explant’s origin and PGR type or mixture. B: Interaction between PGR type or mixture and PGR concentration.....	74
--	----

Figura 4 – Interaction graphs for adjusted model associated to total phenols. A: Interaction between explant’s origin and PGR type or mixture. B: Interaction between concentration factor and PGR type or mixture.....	76
--	----

Figura 5 – Interaction graph between concentration factor and PGR type or mixture for adjusted model associated to flavonoids.....	78
---	----

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

- Tabela 1** –Factors as well as their classification and levels considered in full two-level factorial (2^4) design to describe germination and cotyledon emerging rates associated to pepper seeds considered in the present study..... 33
- Tabela 2** –Primary data corresponding to a two-level full factorial design ($2^4 = 16$) performed with five repetitions of each experimental combination. Germination parameters are represented as mean \pm standard deviation (n=5)..... 34
- Tabela 3** –Analysis of variance for selected factorial models, which describe the cotyledon emerging rates and any detail related to in vitro germination emerging..... 35

CAPÍTULO 2

- Tabela 1** – Experimental runs (15 for each explant's origin) associated to multilevel factorial design for modelling and optimizing callus culture stage from *Capsicum baccatum* L. var. pendulum cells. All combinations were randomly performed in triplicate (48.89%), in duplicate (37.78%) or in single sample (13.33%)..... 67
- Tabela 2** –Analysis of variance (ANOVA) for each response variable model. Probability values associated to the statistical significance tests for models, terms and model lack of fit of the coded response variables used to describe callus cultures stage are reported..... 68
- Supplementary file 1**–Primary data derived from multilevel factorial design. The results are expressed as mean \pm standard deviation. They were ordered taking into account the explant's origin, from root to cotyledon and keeping the sequence showed in Table 1. Superscript numbers (^{1,2,3}) represent the number of repetitions of each experimental run and * represents samples without callus formation..... 79

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	13
<i>Capsicum baccatum</i>	13
Estresse oxidativo.....	14
Metabólitos secundários e sua obtenção por cultura de calos e em suspensão de células de plantas.....	18
Parâmetros de operação críticos associados às etapas de cultura de calos e cultivos em suspensão de células vegetais.....	20
Referências.....	22
CAPÍTULO 1 - Optimizing <i>in vitro</i> germination of <i>Capsicum baccatum</i> L. seeds through a multifactorial experimental design	26
1.1 Abstract.....	27
1.2 Introduction.....	28
2. Materials and Methods.....	30
2.1 Plant Material.....	30
2.2 Seeds Pretreatment and Disinfestation.....	30
2.3 Sowing and Culture Medium.....	31
2.4 Determination of Germination and Cotyledon Emerging Rates.....	31
2.5 Experimental Design.....	32
3. Results.....	33
3.1 Germination Emerging.....	35
3.2 Cotyledon Emerging.....	38
4. Discussion.....	39
5. References.....	45
CAPÍTULO 2 - Systemic approach for callus culture stage optimization of <i>Capsicum baccatum</i> L. var. pendulum	50
Abstract.....	51
Introduction.....	52
Materials and methods.....	53
Plant material.....	53
Optimization of callus culture	54
Extracts.....	55
<i>In vitro</i> antioxidant activity.....	55
Quantification of callus wet weight and budding index.....	56
Total phenol and flavonoid assays.....	56
Statistical Analysis.....	57
Results and Discussion.....	57

Wet weight.....	58
Budding ratio.....	59
Antioxidant activity.....	60
Total phenols(TP)	61
Flavonoids.....	61
Optimization.....	62
Conclusions.....	62
Acknowledgments.....	63
Literature Cited	63
CONCLUSÃO	81

INTRODUÇÃO GERAL

Capsicum baccatum

As pimentas e pimentões do gênero *Capsicum* pertencem à família Solanaceae são originárias da América Central e América do Sul, tendo centenas de variedades com frutos que variam em tamanho, formato, cor e sabor. Dentro desse contexto cinco espécies se destacam: *Capsicum baccatum*, *Capsicum annuum*, *Capsicum chinense*, *Capsicum frutescens* e *Capsicum pubescens* (ZIMMER et al., 2012). Apresentam expressiva importância econômica e social para o agronegócio mundial, associada a seu alto aproveitamento na culinária para temperos. Possuem altos valores vitamínicos e são fonte de antioxidantes naturais. Entre os principais componentes químicos das pimentas destacam-se os caretonóides, o ácido ascórbico, os tocoferóis, a vitamina A e os capsaicinóides (Figura 1), além de minerais como molibdênio, manganês e potássio, cujas concentrações podem variar com o grau de maturação e o genótipo (KOTHARI et al., 2010; PINTO et al., 2013).

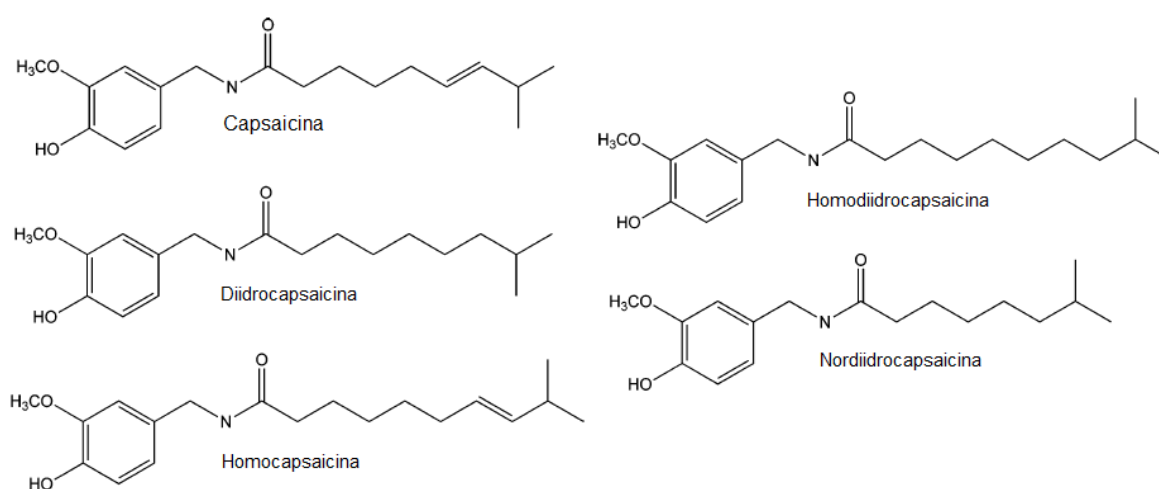


Figura 1 – Estruturas químicas de alguns capsaicinóides naturais. Fonte: adaptado de DAVIS et al., (2007).

A culinária brasileira faz amplo consumo das diferentes variedades de *Capsicum*, entre elas, a *Capsicum baccatum* var. pendulum (Figura 2). Recentemente tem sido demonstrada atividade anti-inflamatória e antioxidante dessas pimentas devido aos seus compostos bioativos, entre eles, os compostos fenólicos (BERTÃO et al., 2016; ZIMMER et al., 2012).

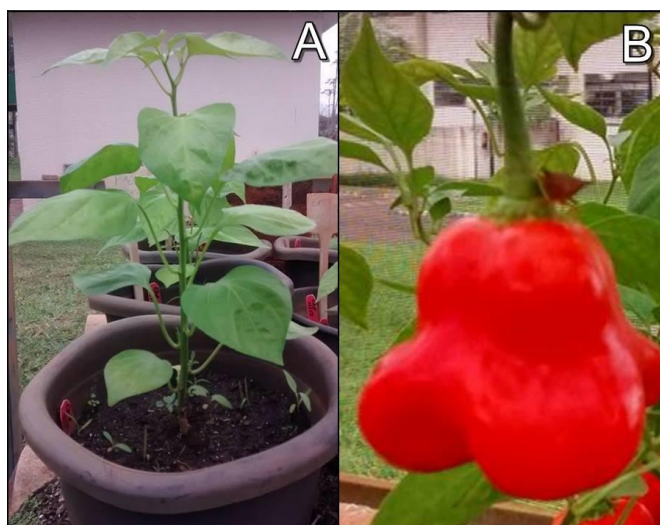


Figura 2 – *Capsicum baccatum* L. var pendulum (A). Fruto maduro de *Capsicum baccatum* L. var pendulum (B)

Estresse oxidativo

O estado pró-oxidante (estresse oxidativo) tem sido relacionado a diversas doenças inflamatórias, cardiovasculares e diferentes formas de câncer (MATKOWSKI, 2008; NIKI, 2010). Isso ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e sua neutralização pelos sistemas antioxidantes, sendo extremamente nocivo aos componentes celulares e indivíduos como um todo (BARREIROS et al., 2006). Os radicais livres podem ser definidos como qualquer espécie, de existência independente, que contém um ou mais elétrons

desemparelhados, fato que os torna instáveis e altamente reativos (HALLIWELL e CROSS, 1994). Podem ser gerados tanto por fontes endógenas como exógenas. As fontes endógenas estão relacionadas com reações metabólicas como a oxidação nas mitocôndrias durante a respiração celular, a fagocitose durante o processo inflamatório e a atividade de enzimas como oxidases, lipoxigenases e peroxidases. As fontes exógenas são a poluição do ar, a utilização de medicamentos, pesticidas, tabagismo, dieta alimentar e radiação ultravioleta. Em condições normais existe um equilíbrio entre a produção de radicais livres e sua neutralização pelos sistemas antioxidantes. Porém, quando esse equilíbrio é afetado pela produção excessiva de radicais ou pela deficiência dos sistemas gera-se o estresse oxidativo (BARREIROS et al., 2006; MARTELLI e NUNES, 2014).

Os radicais livres envolvidos neste processo de estresse oxidativo podem estar relacionados com duas vias de oxidação: as espécies reativas de oxigênio (ERO) e a de nitrogênio (ERN). As ERO (Figura 3) estão divididas em dois grupos, os radicalares: superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroperoxila (HO_2^{\cdot}), hidroxila (OH^{\cdot}), oxigênio singlete (1O_2); e os não radicalares: ácido hipocloroso e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Entre as ERN encontram-se o radical óxido nítrico (NO^{\cdot}), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2) e peroxinitrito ($ONOO^-$) que podem desencadear reações de oxidação nos ácidos graxos da membrana lipoprotéica, denominada de peroxidação lipídica, afetando a integridade estrutural e funcional da membrana celular e alterando sua fluidez e permeabilidade (MARTELLI e NUNES, 2014; TEIXEIRA, 2013).

Além disso, os produtos da oxidação dos lipídios da membrana podem causar alterações em certas funções celulares, modificações nas proteínas celulares,

resultando em sua fragmentação, agregação e, em certos casos, ativação ou inativação de certas enzimas devido à reação dos radicais livres com aminoácidos constituintes da cadeia polipeptídica (BARREIROS et al., 2006; SOARES, 2002; TEIXEIRA, 2013).

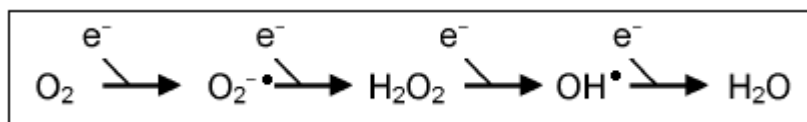


Figura 3 – Formação de algumas das espécies reativas de oxigênio (ERO) durante o transporte de elétrons na mitocôndria. O superóxido ($\text{O}_2^{\bullet -}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxil (OH^{\bullet}) são formados como resultado da sucessiva transferência de elétrons isolados. A citocromo C oxidase transfere um total de quatro elétrons com extrema eficiência, mesmo assim, de 1-2% dos elétrons são constantemente perdidos dentro da célula como ERO potencialmente tóxicos. Fonte: HIRATA et al., (2004).

Diante desses estudos que relacionam diversas doenças com o estresse oxidativo torna-se importante o combate desses radicais livres pela absorção e reação de compostos com características sequestradoras de radicais livres, sendo estes representados por substâncias com capacidade antioxidante. As substâncias antioxidantes podem ser definidas como aquelas, que mesmo em baixas concentrações, são capazes de atrasar ou inibir as taxas de oxidação (BARBOSA et al., 2010; SHAMI e MOREIRA, 2004). Tais substâncias têm a capacidade de inibir os processos oxidativos pelo bloqueio do início da oxidação, por meio da remoção de espécies reativas, ou ainda interrompendo a cadeia de reação, doando elétrons ou hidrogênio, convertendo as espécies radicalares em moléculas termodinamicamente estáveis.

Alguns antioxidantes são encontrados no organismo, conhecidos como antioxidantes endógenos, e podem ser divididos em enzimáticos (superóxido dismutase, catalase e, glutathione peroxidase) e não enzimáticos (glutathione,

bilirubina e ácido lipóico) (ANGELO e JORGE, 2007; BARBOSA et al., 2010; SILVA et al., 2010). Além do sistema antioxidante endógeno o organismo utiliza ainda substâncias antioxidantes obtidas da dieta, como ácido ascórbico, α -tocoferol, β -caroteno e compostos fenólicos, entre eles, os flavonóides (Figuras 4 e 5) que servem como um importante complemento no sistema de defesa humano contra os radicais livres (PEREIRA et al., 2009; STRINGHETA et al., 2006).

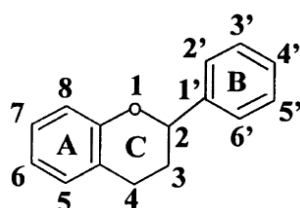


Figura 4 – Estrutura nuclear dos flavonóides. Fonte: HEIM et al., (2002).

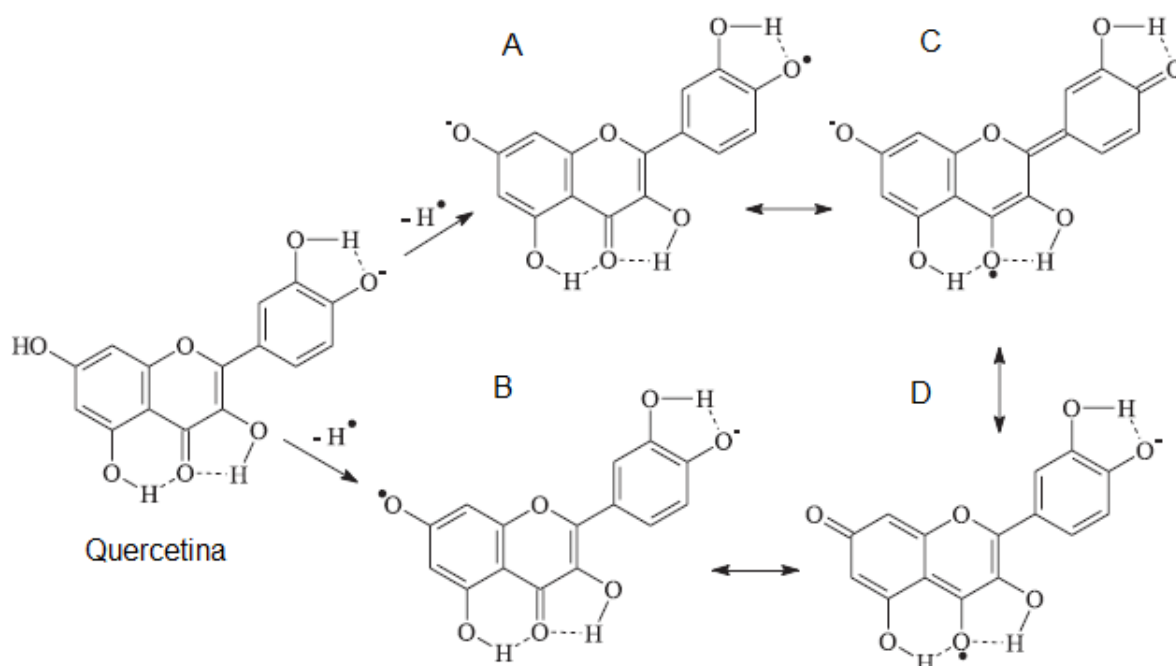


Figura 5 – Quercetina parcialmente ionizada em C-4'. A doação do H radical para o radical livre ocorre principalmente nas posições C-4' (A) e C-7 (B). Ambos os radicais livres formados podem ter seu elétron deslocalizado pela estrutura, com maior estabilidade para os radicais A, C e D, devido à estabilização resultante das ligações de hidrogênio. Fonte: Adaptado de BARREIROS et al., (2006).

A partir disso observa-se a importância de estudos recentes que têm demonstrado capacidade antioxidante, anti-inflamatória e fotoprotetora de certas plantas e alimentos que formam as bases de sistemas tradicionais de medicina milenares (PETRUSSA et al., 2013; RAMKISSOON et al., 2013; RANILLA et. al., 2010).

Metabólitos secundários e sua obtenção por cultura de calos e em suspensão de células de plantas

Metabólitos secundários das plantas são compostos pouco abundantes, com uma frequência inferior a 1% da massa seca, de baixa massa molecular, que desempenham um importante papel na adaptação das plantas aos seus ambientes, porém não afetam diretamente seu desenvolvimento e crescimento (FUMAGALI et al., 2008; WILSON e ROBERTS, 2012). Devido à sua grande atividade biológica esses metabólitos têm sido aplicados na medicina tradicional há muitos anos. Podem atuar como antibióticos, antifúngicos, antivirais e antioxidantes e são também comumente utilizados como inseticidas, corantes, saborizantes, cosméticos ou fragrâncias (AOYAGI, 2011; FUMAGALI et al., 2008).

Em geral a síntese dos metabólitos secundários nas plantas é afetada por diversas condições ambientais como sazonalidade, índice pluviométrico, altitude e temperatura que alteram os níveis de metabólitos, dificultando a obtenção dos mesmos de modo reproduzível (GOBBO-NETO e LOPES, 2007).

Para contornar esse problema a cultura de células de plantas em suspensão tem sido utilizada na produção de diferentes metabólitos secundários. Pode-se citar

a produção de digoxina, morfina, paclitaxel, artemisina entre outros; sendo alguns destes produzidos em escala comercial como, por exemplo, o paclitaxel (taxol, droga anticâncer). Desta maneira a utilização de células de plantas pode constituir uma alternativa economicamente viável para obter metabólitos secundários de relativa alta complexidade química e alto valor agregado (NAILL et al., 2012; DORAN, 2010).

O cultivo de células vegetais pode ser realizado a partir de qualquer fragmento da planta (explante), que são desinfectados utilizando um tratamento químico exógeno, para depois colocá-los em meio de cultura sólido formulado com os hormônios de crescimento e nutrientes necessários para cada espécie. Com uma correta formulação da composição dos meios, após 2 à 6 semanas, os explante proliferam em calos, massa de células indiferenciadas (figura 6), que podem ser submetidos a um processo de triagem para o produto ou os produtos de interesse. Finalmente, são isolados, fragmentados e transferidos a um meio líquido para gerar uma cultura de células em suspensão (CARVALHO e VIDAL, 2003; MUSTAFA et al., 2011).



Figura 6 – Calos originados de cotilédones de *C. baccatum* var. *pendulum*

Parâmetros de operação críticos associados às etapas de cultura de calos e cultivos em suspensão de células vegetais

Entre os parâmetros operacionais mais importantes a serem otimizados na etapa de cultivo de calos visando alta produtividade de biomassa e metabólitos de interesse, encontram-se o explante (principalmente tecidos meristemáticos: ex. gemas, folhas jovens) e a concentração de hormônio no meio de cultura. Também deve ser definido um protocolo de desinfecção dos explantes, tendo como variáveis fundamentais a seleção do desinfetante, a concentração do mesmo e o tempo de imersão do explante na solução desinfetante (FUMAGALI et al., 2008; MUSTAFA et al., 2011; GODOY-HERNÁNDEZ e VÁZQUEZ-FLOTA, 2006).

Por outro lado, quando é pretendida a otimização da cultura de células vegetais em suspensão, outros parâmetros de operação como luminosidade, temperatura, velocidade de agitação, concentração de oxigênio dissolvido, composição do meio de cultura, devem ser considerados. Quando as culturas em suspensão são realizadas em frascos erlenmeyers, recomenda-se trabalhar com um volume de suspensão celular equivalente entre 20 e 40 % do volume do frasco, velocidade de agitação entre 90-125 rpm e a uma temperatura próxima a temperatura ambiente (24-25 °C). Entretanto, entre os componentes que necessitam ter suas concentrações estão as fontes de carbono, macronutrientes (Mg, Ca, P, S, N, K), micronutrientes (Fe, Cu, Mn, Co, Mo, B, I, Ni, Cl, Al), vitaminas e hormônios de crescimento (auxinas ou citocininas) em concentrações na faixa de 10^{-7} a 10^{-5} mol.L⁻¹. O pH do meio de cultura é normalmente ajustado entre 5,75 e 5,85 antes da esterilização do meio. De maneira geral a aeração é outro fator crítico na cultura de

células vegetais em suspensão, mas o mesmo só é rigorosamente controlado quando a cultura é realizada em biorreatores. Geralmente as concentrações críticas de oxigênio dissolvido para este tipo de células encontram-se entre 15-20% de saturação. Entretanto, este parâmetro deve ser otimizado para cada sistema em particular (KIERAN et al., 1997; MUSTAFA et al., 2011; WILSON e ROBERTS, 2012).

Nesse contexto o presente estudo teve como objetivo a obtenção de explantes adequados germinados *in vitro* como alternativa aos tradicionais métodos de desinfecção para o desenvolvimento e otimização de cultura de calos de pimenta Cambuci – *Capsicum baccatum* L. var. pendulum buscando uma relação entre maior rendimento de biomassa, maior atividade antioxidante e maior teor de flavonóides e compostos fenólicos.

Para a confecção dos capítulos a seguir foram utilizadas as normas dos periódicos American International Journal of Biology (Capítulo 1) e Biotechnology Progress (Capítulo 2).

Referências

- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.
- AOYAGI, H. Application of plant protoplasts for the production of useful metabolites. **Biochemical Engineering Journal**, v.56, p.1-8, 2011.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. de C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 23(4), p. 629-643, jul./ago., 2010.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, Jorge M.; DAVID, J. P.. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Revista Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- BERTÃO, M. R.; MORAES, M. C.; PALMIERI, D. A.; SILVA, L. P.; SILVA, R. M. G. Cytotoxicity, genotoxicity and antioxidant activity of extracts from *Capsicum* spp. **Res J MedPlant**, v. 3, p. 1-11, 2016.
- CARVALHO, J. M. F.; VIDAL, M. S. Noções de Cultivo de Tecidos Vegetais por Julita Maria Frota Chagas Carvalho e Márcia Soares Vidal. **Documento 116, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Centro Nacional de Pesquisa de Algodão, EMBRAPA**, 39p, 2003.
- DAVIS, C.B.; MARKEY, C.; BUSCH, M.A.; BUSCH, K.W. Determination of Capsaicinoids in Habanero Peppers by Chemometric Analysis of UV Spectral Data. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p. 5925-5933, 2007.
- DORAN, P. Bioreactors, stirred tank for culture. In: M. Flickinger, **Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology**, p. 1-35, 2010.

- FUMAGALI, E.; GONÇALVES, R. Ap. C.; MACHADO, M. de F. P. S.; VIDOTI, G. J.; OLIVEIRA, A. J. B. de. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernae Montana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v 18, n.4, p.627-641, 2008.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Revista Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.
- GODOY-HERNÁNDEZ, G.; VÁZQUEZ-FLOTA, F.A. Growth measurements. Loyola-Vargas, V.M., Vázquez-Flota F. (Editores). **Plant Cell Culture Protocols**, Humana Press Inc, New Jersey, p. 51-58, 2006.
- HALLIWELL B.; CROSS, C. E. Oxygen-derived Species: Their Relation to Human Disease and Environmental Stress. **Environmental Health Perspectives**, v. 2, p. 5-12, 1994.
- HEIM, K.E.; TAGLIAFERRO, A.R.; BOBILYA, D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activityrelationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, p. 572–584, 2002.
- HIRATA, L.L.; SATO, M.E.O.; SANTOS, C.A.M. Radicais Livres e o Envelhecimento Cutâneo. **Acta farmacéutica bonaerense**, v. 23, n 3, p. 418-424, 2004.
- KIERAN,P.M.; MACLOUGHLIN,P.F.;MALONE,D.M.Plant cell suspension cultures: some engineering considerations. **Journal of Biotechnology**, v. 59, n. 1–2, p.39-52, 1997.
- KOTHARI S. L.; JOSHI A.; KACHHWAHA S.; OCHOA-ALEJO N..Chilli peppers - a review on tissue culture and transgenesis. **Biotechnol Adv**, v. 28 ,p. 35–48, 2010.

MARTELLI, F.; NUNES, F. M. F..Radicais livres: em busca do equilíbrio, **Revista Ciência e Cultura**, v. 66, n. 3, p. 54-57 , 2014.

MATKOWSKI A. Plant *in vitro* culture for the production of antioxidants - a review. **Biotechnol Adv**, v. 26, p. 548–560, 2008.

MUSTAFA, N. R.; WINTER, W.; IREN, F. van; VERPOORTE, R. Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures. **Nature Protocols**. v. 6, n. 6, p. 715-742, 2011.

NAILL, M.C.; KOLEWE, M.; ROBERTS, S.C. Paclitaxel uptake and transport in *Taxus* cell suspension cultures. **Biochemical Engineering Journal**, p. 50–56, 2012.

NIKI, E. Assessment of Antioxidant Capacity *in vitro* and *in vivo*. **Free Radical Biology & Medicine**, v.49, n. 4, p. 503-515, 2010.

PEREIRA, A. L. F.; VIDAL, T. F.; CONSTANT, P. B. L. Antioxidantes alimentares: importância química e biológica. **Nutrire: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, v. 34, n. 3, p. 231-247, 2009.

PETRUSSA, E.; BRAIDOT, E.; ZANCANI, M.; PERESSON, C.; BERTOLINI, A.; PATUI, S.; VIANELLO, A. Plant Flavonoids - Biosynthesis, Transport and Involvement in Stress Responses. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 14, p. 14950-14973, 2013.

PINTO, C. M. F.; PINTO, C. L. O.; DONZELES, S. M. Lopes. Pimenta *Capsicum*: propriedades químicas, nutricionais, farmacológicas e medicinais e seu potencial para o agronegócio. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS)**, v. 3, n. 2, p. 108-120, 2013.

RAMKISSOON, J.; MAHOMOODALLY, M.; AHMED, N.; SUBRATTY, A. Antioxidant and anti-glycation activities correlates with phenolic composition of tropical medicinal herbs. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 6, n. 7, p. 561-569, 2013.

RANILLA, L.G., KWON, Y., APOSTOLIDIS, E.; SHETTY, K. Phenolic compounds, antioxidant activity and in vitro inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4676–4689, 2010.

SHAMI, N.J.I.E.; MOREIRA, E.A.M. Licopeno como agente antioxidante. **Revista Nutrição**, v. 17, n. 2, p. 227-236, 2004.

SILVA, M.L.C.; COSTA, R.S.; SANTANA, A. dos S.; KOBLITZ, M.G.B.. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Revista Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n.3, p. 669-682, 2010.

SOARES, S. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista Nutrição**, v. 15, p. 71-81, 2002.

STRINGHETA, P.C.; NACHTIGALL, A.M.; OLIVEIRA, T.T.; RAMOS, A.M.; SANT'ANA, H.M.P.; GONÇALVES, M.P.J.C. Luteína: propriedades antioxidantes e benefícios à saúde. **Revista Alimentos e Nutrição**, v. 17, n. 2, p. 229-238, 2006.

TEIXEIRA, M.S.S.R. Stress oxidativo e dano no DNA na doença inflamatória intestinal. **Arquivos de medicina**, v. 27, n.6, p. 248-255, 2013.

WILSON, S.A.; ROBERTS, S.C.; Recent advances towards development and commercialization of plant cell culture processes for the synthesis of biomolecules. **Plant Biotechnology Journal**, v.10, n.3, p. 249-268, 2012.

ZIMMER A.R.; LEONARDI B.; MIRON D.; SCHAPOVAL E.; OLIVEIRA J.R. DE; GOSMANN G. Antioxidant and anti-inflammatory properties of *Capsicum baccatum*: from traditional use to scientific approach. **J Ethnopharmacol**, v. 139, p. 228–233, 2012.

CONCLUSÃO

Foi possível a padronização dos explantes por meio de um delineamento experimental fatorial completoa dois níveis (2^4) no qual a melhor combinação de tratamentos para germinação *in vitro* e desenvolvimento de plântulas quanto ao tipo de solução para condicionamento osmótico e meio germinativo foram água + ágar e água + ágar-ácido giberélico (GA_3) para os genótipos Pitanga e Cambuci, respectivamente.

Os calos derivados de explantes do genótipo Cambuci – *Capsicum baccatum* var. pendulum apresentaram diferentes respostas para o delineamento fatorial multiníveis, no qual, os valores obtidos nas condições otimizadas foram: massa de calo (225,03 mg), atividade antioxidante (35,95%), fenóis totais (11,48 mg de GAE / g DE) e flavonóides (15,92 mg de RU / g DE), superando em termos de atividade antioxidante valores previamente relatados para esta espécie quando cultivada naturalmente.