

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**POTENCIAL MORFOGÊNÉTICO E CAROTENÓIDES EM TECIDOS
CULTIVADOS IN VITRO DE *Pothomorphe umbellata* L.**

CHARLOTTE CESTY BORDA YEPEZ

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP, Botucatu, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Área de Concentração em Horticultura

BOTUCATU-SP
Junho - 2003

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**POTENCIAL MORFOGÊNÉTICO E CAROTENÓIDES EM TECIDOS
CULTIVADOS IN VITRO DE *Pothomorphe umbellata* L.**

CHARLOTTE CESTY BORDA YEPEZ

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Giuseppina Pace Pereira Lima.

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas - Unesp - Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Área de Concentração em Horticultura.

BOTUCATU - SP

Junho - 2003

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO:.....(Letras maiúsculas)

AUTOR:.....(Letras maiúsculas)

ORIENTADOR:.....(Letras maiúsculas)

CO-ORIENTADOR:.....(Letras maiúsculas)

Aprovado pela Comissão Examinadora:

Nome.....Presidente

Nome.....

Nome.....

Data de realização ____/____/____

OBS: Este certificado será impresso e fornecido pela F.C.A.

AGRADECIMENTOS

A Profa. Doutora Guiseppina Pace Pereira Lima, pela sua orientação, confiança, apoio, otimismo e acima de tudo por compartilhar sua amizade.

Aos professores do curso da Horticultura, pelos ensinamentos ministrados e pelo seu profissionalismo.

Aos professores Ariovaldo Florentino de Oliveira, José Pedro Serra Valente e Fernando Broetto por sempre estarem prestes a me escutar e apoiar com qualquer dúvida.

Aos funcionários do Departamento de Química e Bioquímica – IB, Vânia, Cláudio, Fábio, Evandro e Lourdes pela colaboração e amizade.

A secretarias do Departamento de Química e Bioquímica- IBB, Claudete e Betty, pelo seu carinho e ajuda incondicional.

Aos funcionários da Seção de fotografia, Silvio Garcia Manoel e Silvio Geraldo dos Santos Junior, pelo atendimento e competência.

A Faculdade de Ciências Agronômicas – Campus Botucatu, pela oportunidade.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação pelo atendimento.

Aos colegas e amigos do curso de Pós-Graduação pela amizade, convívio e alto astral que se mantinha no nosso laboratório.

Ao Centro de Informática da FCA (CINAG) e ao **estatístico Roberto Wilson Jesus** pelas análises estatísticas.

A Dra. Marcia Ortiz (IAC) e Adilson (CPQBA) pela
doação do padrão do β -caroteno.

A todos que colaborarem de alguma forma para a
realização deste trabalho e para boa acolhida que tive, o que
contribuiu no meu crescimento, desenvolvimento e adaptação.

Ofereço

A meus pais Olga e Emilio que pela sua presença, apoio, força, amor, me brindaram em todos os momentos da minha vida.

Dedico

Ao amor da minha vida, Erik, pela força, motivação, incentivo e pelo exemplo que me dá em cada uma das coisas que ele faz.

Agradeço

A Deus por me fazer feliz com as coisas que faço, por fazer realidade este sonho e por fazer que acredite em elas. Gracias.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE QUADROS	X
RESUMO	XII
SUMMARY	XIII
1 INTRODUÇÃO	01
2 OBJETIVOS	04
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	06
3.1 <i>Pothomorphe umbellata</i> (L.) Miq (1840)	06
3.2 Cultura de Tecidos Vegetais	11
3.3 Carotenóides	14
4 MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1 Obtenção do material vegetal	22
4.2 Primeira etapa: Micropropagação	23
4.2.1 Assepsia	23
4.2.1.1 Assepsia das estacas	23
4.2.1.2 Assepsia das sementes	24
4.2.2 Germinação das sementes	25
4.2.3 Produção de calos	25
4.2.4 Organogênese	26

4.2.5	Crescimento das plântulas	27
4.2.6	Aclimatação	29
4.3	Segunda etapa : Determinação de carotenóides	30
4.3.1	Saponificação	30
4.3.2	Extração dos carotenóides	30
4.3.3	Quantificação dos carotenóides	31
4.3.3.1	Preparação da curva de calibração	31
4.3.3.2	Calculo da concentração dos Carotenóides	31
4.3.3.3	Cálculo do rendimento dos carotenóides.....	32
4.3.4	Fluxograma das atividades	34
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1	Primeira etapa: Micropropagação	36
5.1.1	Assepsia	36
5.1.1.1	Assepsia das estacas	36
5.1.1.2	Assepsia das sementes	39
5.1.2	Germinação das sementes	43
5.1.3	Produção de calos	46
5.1.4	Diferenciação das plântulas.....	49
5.1.5	Crescimento das plântulas	52
5.1.6	Aclimatação	53
5.2	Segunda etapa: Determinação de Carotenóides	58
5.2.1	Saponificação	58
5.2.2.	Extração dos Carotenóides	59
6	CONCLUSÃO	66
7	NECESSIDADES DE PESQUISA	67
8	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	68

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo estabelecer o protocolo de desinfestação de estacas e sementes e germinação de *Pothomorphe umbellata* (L.) e adaptar o protocolo de micropropagação de *Pothomorphe umbellata* (L.), incluindo a produção de calos e organogênese, além de comparar o teor de carotenóides entre calos e plântulas. O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Departamento de Química e Bioquímica, do Instituto de Biociências da UNESP - Botucatu, SP e o material vegetal (sementes e estacas) foi obtido no município de Adrianópolis - PR. Semente germinadas de *P. umbellata* foram inoculadas em diferentes concentrações de BAP (0,5 mg.L⁻¹; 1,0 mg.L⁻¹; 1,5 mg.L⁻¹) e NAA (0,4 mg.L⁻¹; 0,6 mg.L⁻¹; 0,6 mg.L⁻¹) respectivamente, visando estimular a produção de calos e dosar o carotenóides. Após 60 dias do cultivo, os calos contendo algumas brotações, foram transferidos para meio de diferenciação das plântulas (GA₃ 0,1 mg.L⁻¹, BAP 0,5 mg.L⁻¹) por um período de 40 dias, para logo serem transferidos para meio de diferenciação de plântulas. Calos (coletados aos 60 dias) e plântulas (coletadas aos 140 dias) foram congelados em nitrogênio líquido e mantidos em freezer a -80°C para posteriores análises de carotenóides. O melhor tratamento para a produção de calos e formação de gemas foi NAA 0.6 mg.L⁻¹ em combinação com BAP 1.0 mg.L⁻¹. Nas plântulas sem adição de reguladores vegetais foi encontrada uma maior concentração de carotenóides, em comparação aos calos.

CAROTENOIDS DETERMINATION IN PLANTLETS OF *Pothomorphe umbellata* L.

Botucatu, 2003. 84 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Horticultura) – Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: CHARLOTTE CESTY BORDA YEPEZ

Adviser: GIUSEPPINA PACE PEREIRA LIMA

SUMMARY

The present research aimed at establishing a protocol of stalks and seed disinfection, and seed germination of *Pothomorphe umbellata* (L.). A protocol of micropropagation including the induction of callus formation and organogenesis was adapted. Besides, it was compared the carotenoids quantity between *Pothomorphe umbellata* callus and plantlets. This experiment was carried out in Biotechnology Vegetal Laboratory of the Chemistry and Biochemistry Department at the Instituto de Biociências of Universidade Estadual Paulista, Botucatu campus. The vegetal material (seed and stalks) was obtained from Adranópolis - PR. *Pothomorphe umbellata* germinated seeds were inoculated in different concentrations of BAP (0,5 mg.L⁻¹; 1,0 mg.L⁻¹; 1,5 mg.L⁻¹) and NAA (0,4 mg.L⁻¹; 0,6 mg.L⁻¹; 0,6 mg.L⁻¹) respectively, in order to stimulate callus induction and increase quantity of carotenoids. After 60 days, callus which contained shoots were inoculated in plantlets differentiation medium (GA₃ 0,1 mg.L⁻¹, BAP 0,5 mg.L⁻¹) during 40 days and transferred to plantlets growth medium. Plantlets were acclimatized. Callus collected after 60 days and plantlets were collected after 140 days. They were frozen in liquid nitrogen and maintained in freezer -80°C to be used in further carotenoids test. The best treatment for callus production and shoots elongation was NAA 0.6 mg.L⁻¹ in association with BAP 1.0 mg.L⁻¹. The higher carotenoids concentration was in plantlets without growth regulators, compared with callus.

Keywords: *Pothomorphe umbellata*, carotenoids, callus, organogenesis, acclimatization.

I. INTRODUÇÃO

As plantas medicinais têm importância mundial desde o começo da humanidade. Os conhecimentos foram obtidos pela experiência empírica e transmitidos de geração em geração. Atualmente, a fitoterapia e a fitoquímica estão respaldadas pela ciência, e é por isso que várias substâncias com efeitos terapêuticos úteis na farmacêutica foram isolados e suas estruturas determinadas (Di Stasi, 1995).

Uma das famílias com grande importância medicinal e econômica no Brasil são as piperáceas (Moraes, 1983), cuja principal representante é a *Piper nigrum*. A família Piperaceae possui cerca de 12 gêneros, com 1400 espécies, distribuídas nas regiões tropicais (Barroso, 1988). Suas plantas são lenhosas e herbáceas, com flores unissexuadas e hermafroditas (Strasburger, 1968), frutos pequenos, indeiscentes, drupáceos e sementes com perisperma e endosperma escasso (Cronquist, 1968). Um dos gêneros pouco conhecidos, porém com grande importância medicinal é a *Pothomorphe*, constituída por duas espécies

Pothomorphe umbellata (L.) conhecida como “caápeba do sul” e *Pothomorphe peltata* (L.), como “caápeba do norte” (Figura 1). Ambas são medicinais e utilizadas em quase todo Brasil. São muitas as propriedades atribuídas a estas espécies, *P. umbellata* é usada como analgésica, vermífuga, antiinflamatória, colagoga, colerética e *P. peltata* como antiinflamatória, anti-sifilítica, diurética, colagoga e colerética (Le Conde, 1934; Di Stasi et al., 1989).

Devido à presença de vários princípios ativos em sua composição e ao grande interesse na indústria de alimentos e de cosméticos (Gottlieb et al., 1981), as piperaceas têm sido objeto de muitas investigações fitoquímicas devido principalmente à presença de antioxidantes. Entretanto, pouca informação tem sido encontrada na literatura sobre a composição química da *Pothomorphe*, principalmente estudos sobre o teor e a natureza dos carotenóides.

Moraes et al. (1994) isolaram o prolicopeno em folhas da *Pothomorphe umbellata* e posteriormente, também foi isolado este mesmo carotenóide em *Pothomorphe peltata* (Moraes et al., 1996). Além disso, em *Piper nigrum* também foram identificados β -caroteno, licopeno e leucina no pericarpo (Variyar et al., 1990).

A cultura de tecidos vegetais *in vitro* é um dos métodos mais rápidos para produção de plântulas; exige pequeno espaço físico e menos funcionários (Centro Internacional de la Papa, 1995). Além disso, a cultura de tecidos tem mostrado sucesso na produção de enzimas e metabólitos secundários (Matsubara et al., 1989). Esta vantagem, reside no fato de que podem ser cultivadas sob condições controladas e por isso, não são influenciadas por variações sazonais (Phillipson, 1995). Outra vantagem do cultivo *in vitro*, é a possibilidade do controle dos meios.

A importância dos carotenóides na dieta diária centra-se nas suas propriedades antioxidantes. Dugas (1999) afirmou que os carotenóides podem evitar oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) no processo de desenvolvimento de arterioscleroses.

Desta forma, considerando a importância farmacológica dos carotenóides e a necessidade de maiores estudos em *Pothomorphe*, este trabalho propõe-se a determinar o teor de carotenóides em calos e plântulas de *Pothomorphe umbellata* L. cultivadas *in vitro*, além de estabelecer protocolos para desinfestação e germinação, e adaptar protocolo de micropropagação.

II. OBJETIVOS

Objetivo Geral

- ◆ Comparar o teor de carotenóides entre calos e plântulas micropropagadas de *Pothomorphe umbellata* L.

Objetivos Específicos

- ◆ Estabelecer o protocolo de desinfestação de estacas e sementes de *Pothomorphe umbellata*.
- ◆ Estabelecer o protocolo de germinação de *Pothomorphe umbellata*.
- ◆ Adaptar o protocolo de produção de calos e organogênese de *Pothomorphe umbellata*.

Figura 1: Planta de *Pothomorphe umbellata* L. coletada no Distrito de Adrianópolis - PR



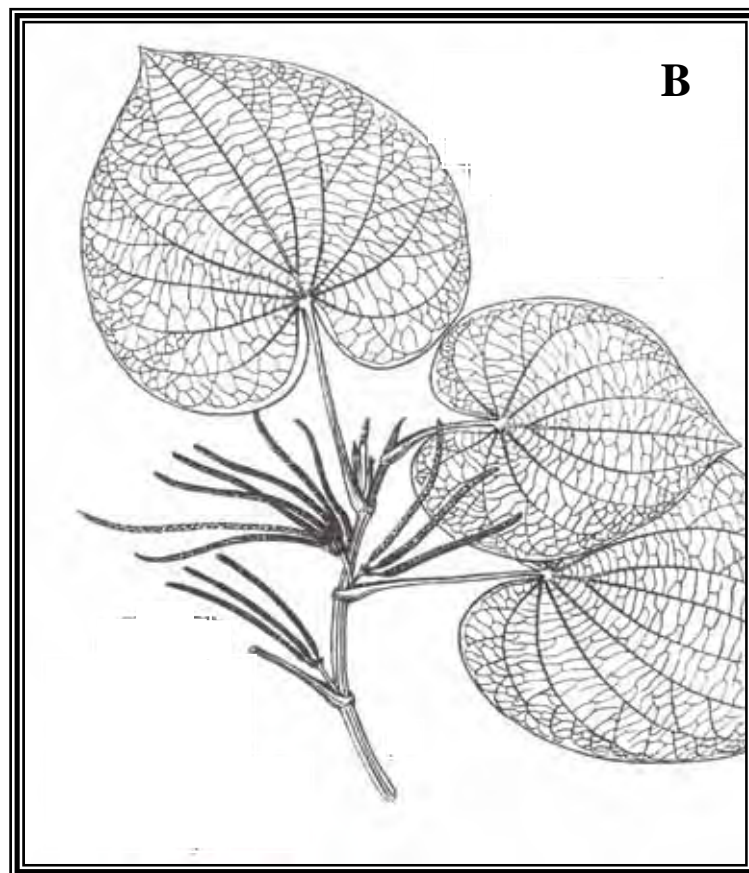
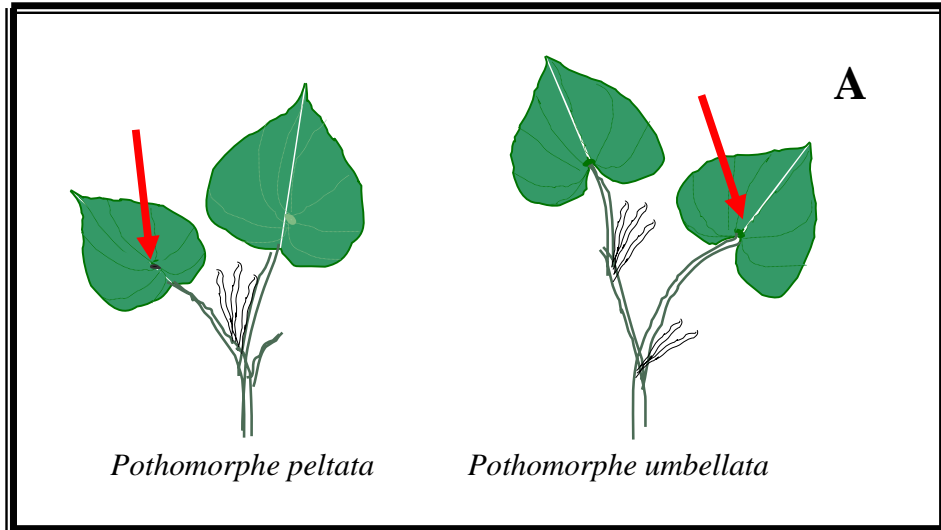
III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E JUSTIFICATIVA

3.1. *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq (1840)

O gênero *Pothomorphe* é constituído de um número pequeno de espécies. Diversos autores nas suas descrições reconhecem a *Pothomorphe umbellata* e *Pothomorphe peltata* (Figura 2) como representantes deste gênero (Saralegui, 1998).

Pothomorphe umbellata (L.) Miq (1840) é conhecida no Brasil como capeba, capeba branca, capeba verdadeira (Brasil) e caápeba, malvarisco, malvaisco, lençol de santa bárbara, pariparoba do sul e caapeba do sul (Luz et al., 1999). *Pothomorphe peltata* é conhecida como pariparoba do norte e caapeba do norte (Luz et al., 1999). Estas espécies são chamadas nas Antillas como Bois-anisette, Poivrier à feuilles peltées, no Paraguai como Baquina, na Venezuela como Cordoncillo negro e no Peru e Bolívia como Santa María (Fouque, 1980).

Figura 2: Diferenças morfológicas entre as espécies *Pothomorphe peltata* e *Pothomorphe umbellata* (A) (Saralegui, 1998). Esquematisação da plântula de *Pothomorphe umbellata* (B) (Hollnagel, 2000).



A Farmacopéia Brasileira inclui a *P. umbellata* com o nome de “pariparoba” e recomenda o uso das raízes secas do vegetal.

Com o nome de “pariparoba” conhece-se inúmeras outras espécies vegetais. Em São Paulo e Rio de Janeiro é freqüente se atribuir este nome a *Piper regnelii* (Miq), *Piper rohrii* C.DC., *Piper marginatum* Jacq., *Piper hilarium* Steudel, *Piper solmsianum* C.DC. e *Piper amplum* Kunth (Moraes, 1983).

Oliveira & Akisue (1982) tratando o problema da identificação dos metabólitos secundários das plantas, mencionam que os nomes populares podem constituir fonte de erro, sendo que estes variam de um lugar para outro, sendo comum designar-se plantas diferentes com o mesmo nome, como também o contrário.

Segundo Riedel (1941), pariparoba significa “o amargo que acaba com as feridas”, esta expressão é derivada do Tupi, Pa= acabar; Rob= amargo e Pari= ferida. Caápeba por sua vez deriva de Caa = vegetal e peba = plano, sendo este o motivo pelo qual nossos índios denominavam as *Pothomorphe* de caápeba, por terem folhas chatas ou largas (Hoene citado por Moraes, 1999).

Este gênero provém do neotrópico (Saralegui, 1998), mas *P. umbellata*, segundo Fouque (1980), é originária das Antilhas na América Central e no Sul de América do Norte. Alguns outros autores referem-se à *Pothomorphe* como uma planta nativa brasileira.

Pothomorphe umbellata é encontrada no México, América Central, América do Sul, Antilhas Maiores e Antilhas Menores (Saralegui, 1998) e no Brasil, onde se tem registrado ocorrência desde à Amazônia até o Rio de Janeiro, é também observada em São Paulo e Paraná (<http://www.cotianet.com.br/eco/HERB/capeba.htm>). As plantas são

encontradas em capoeiras e campos de colocações. Também cresce em solos esterçados e úmidos, próximos ou em bosques (Ming et al., 1997).

A planta de *Pothomorphe umbellata* L. é um subarbusto de 1 a 2 metros de altura, pecíolos de 12 a 23 cm, estreitamente alados, de glabros a puberulentos com lâminas foliares de 16 a 23 x 20-33 (40) cm, avoadas cortadas, agudas no ápice, marcadamente arredondas, lobuladas na base, com 2 a 4 nervuras secundárias ascendentes a partir de 1 a 3 cm na base, com pontuações glandulares, densamente pubescentes sobre as nervuras em ambas superfícies, coloração verde intensa na parte superior de verde pálida a cinza na parte inferior. As inflorescências têm comprimento de 5 a 10 cm e diâmetro de 2 a 4 mm. O pedúnculo axilar é de 4 a 7 cm e a bráctea da espiga de 1-2 cm. As brácteas florais medem de 0.3 a 0.6 mm, as anteras apresentam de 0.1 a 0.2 mm e o estigma é séssil tri-lobulado (Fouque, 1980).

Pothomorphe, como planta medicinal, tem grande importância no Brasil e no mundo por ser utilizada como tônico, vermífugo, para combater inflamações internas e externas (Berg, 1982), contra dor no fígado e baço, hepatite (Ming, 1997), dor de cabeça e infecções fúngicas da pele (Ehringhaus 1996, citado por Moraes 1999), anti-sifilítica, colagoga e colerética (Di Stasi et al., 1989) e antioxidante (Barros et al., 1996).

Segundo Peckolt citado por Moraes (1983), as diversas partes da *Pothomorphe* têm propriedades de fluidificar a bile e relaciona suas propriedades diuréticas relacionando esta atividade presença de sais de potássio nas folhas (Quadro 1).

Quadro 1. Composição química das folhas frescas (g/100 g) de *Pothomorphe umbellata* L., segundo Peckolt Th. & Peckolt G. (Moraes, 1983).

Composição química	g/100g
Ácido pothomorfico cristalizado	0,0058 g
Ácido resinoso	0,7368 g
Pariparobina cristalizada	0,0187 g
Substância cerêcea	0,0790 g
Ácido Tánico	0,0158 g
Clorofila	0,0842 g
Ácidos orgânicos (ácido tartárico, etc)	0,0184 g
Substâncias albuminoides gomosas, etc	1,1081 g
Sulfato de potássio	0,4634 g
Cinzas	3,1000 g
Água	82,0000 g

As folhas untadas e levadas ao fogo indireto devem ser usadas topicamente como cataplasmas para diminuir o inchaço produzido por erisipelas, furúnculos (tumores), feridas, hemorróidas, filarias, machucados, sendo usadas ainda como antiinflamatório externo. A raiz e as folhas são diuréticas nos casos de anúria (diminuição o supressão da urina) e antigonorreicas; a planta toda fornece um suco útil contra o infarto das vísceras abdominais; também nas moléstias do baço em consequência das infestações de malária e na vesícula biliar é usado como colagogo. Usa-se esta planta como tônico digestivo para curar ou aliviar fraqueza estomacal, gases, fermentação intestinal, prisão de ventre

(laxativa), resfriados, febres, anemia, escrofulose (mal caracterizados por tumores ganglionares, de origem tuberculosos), é também vermífuga e possui atividade antiespasmódica (Saralegui, 1998).

No caso do fruto ser vermelho, é feito o cozimento de folhas com água é depois de frio, a infusão é utilizada para fazer as lavagens das partes afetadas. Para problemas de fígado é bebido o chá frio. As folhas aquecidas são usadas também como emplasto na testa, em caso de dor de cabeça (Ming et al., 1997).

Ainda não se tem informação sobre os efeitos colaterais desta planta, nem problemas durante a sua ingestão (Ming*, 2002).

Na atualidade, o laboratório KLYDONT já esta produzindo fitofarmacos contendo *P. umbellata* (Tríptico Elixir de Capeba Composta KLYDONT).

3.2. Cultura de tecidos vegetais

A propagação *in vitro*, também conhecida como micropropagação, é uma técnica biotecnológica muito utilizada nas últimas décadas como uma ferramenta de estudo em diferentes áreas, desde a agronomia até a biologia molecular. A propagação vegetativa de plantas medicinais e de plantas economicamente importantes é a mais freqüente aplicação das técnicas de cultura de tecidos, sendo esta uma das técnicas que tem influenciado, com grande impacto na horticultura, sobretudo na área comercial (Giles & Friesen, 1994).

MING, L. (Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP – Campus de Botucatu) Comunicação pessoal, 2002.

São muitas as contribuições apresentadas por esta técnica, por exemplo, a influencia na produtividade agrícola, mediante o controle de doenças e patógenos, na produção de variantes somaclonais desejáveis ou a manutenção do genótipo e fenótipo de híbridos com um bom estado fitossanitário (Withers & Williams citado por Torres et al., 1998). Além disso, pode-se produzir um número ilimitado de explantes sem influência sazonal (Phillipson, 1995).

A conservação de germoplasma *in vitro* é uma alternativa com grandes méritos e vantagens com relação à conservação em campo; sobretudo naqueles países onde existem muitas mudanças climáticas e as variedades e/ou cultivares não apresentam tolerância a diferentes tipos de estresse, aumentam a probabilidade da perda de genes ou erosão genética (Centro Internacional de la Papa, 1998). Além disso, a renovação daquelas culturas anuais e bianuais, no caso da batata, da batata doce, do cará, da mandioca, etc., fazem necessário o emprego de abundante mão de obra, espaços muito grandes para serem semeados, etc. Assim, a tecnologia da micropropagação é valiosa na manutenção e propagação de genótipos de interesse, tendo-se em conta que os protocolos utilizados permitem grande frequência de multiplicação de plantas com uma produção de alta qualidade (Giacometti citado por Torres & Caldas, 1990).

Para o sucesso da micropropagação é necessário controlar inúmeras variáveis, como o estabelecimento das culturas, sobretudo o tratamento aplicado à planta matriz, seleção e coleta dos explantes, desinfestação, isolamento do explante, meios de cultura, condições de incubação, entre outros. (Grattapaglia & Machado citado por Torres et al., 1998). Segundo Murashige (1974), para explicar todo o processo de desenvolvimento das plântulas desde a introdução do material vegetal *in vitro*, o sistema de micropropagação tem vários estágios. Estágio 0, é o que corresponde ao tratamento dado a planta-matriz, de onde

são retirados os explantes. Estágio I, onde se faz a seleção dos explantes, desinfestação e cultivo sob condições assépticas. Estágio II, multiplicação dos propágulos mediante sucessivas subculturas. Estágio III, transferência das partes aéreas para o meio de enraizamento e finalmente ao substrato o solo.

O crescimento e a morfogênese dos tecidos cultivados *in vitro* dependem de fatores físicos, bioquímicos e fisiológicos, onde o ambiente tem uma grande influência sobre o genótipo, além da composição do meio no qual será inoculado (George, 1993). Os reguladores, estimularão ou suprimirão as atividades nos teores do próprio explante, levando a respostas de crescimento, diferenciação, alongamento, multiplicação e enraizamento (Luz et al., 1997), sendo que a concentração e a estabilidade térmica do regulador durante a preparação e esterilização do meio de cultura, influenciam no sucesso destes fatores (Grattapaglia & Machado citado por Torres et al., 1998).

Os principais reguladores vegetais utilizados na cultura de tecidos são as citocininas, auxinas e giberelinas, empregados para induzir a divisão, crescimento e alongamento celular em balanços específicos (Grattapaglia & Machado citado por Torres et al., 1998). O balanço entre citocininas e auxinas no meio de cultura é determinante no processo de regeneração de plantas. As auxinas, sintetizadas nas regiões de crescimento ativo, como folhas jovens, gemas axilares, meristemas apicais, controlam o crescimento, estimulam a iniciação e alongamento das raízes, maturação de frutos, etc. As auxinas mais utilizadas são ácido α -naftaleno acético (NAA), ácido indol-3-butírico (IBA), ácido 3-indolilacético (IAA) e ácido 2,4 dicloro fenoxi-acético (2,4 D). As citocininas promovem divisão, alongamento e diferenciação celular, retardam a senescência das plantas, promovem a quebra da dominância apical e induzem proliferação de gemas axilares sendo fundamental para a multiplicação da

parte aérea e indução de gemas adventícias. As citocininas mais utilizadas são 6-benzilaminopurina (BAP) e 6-furfurilaminopurina (KIN), N-6-benziladenina (BA) (Tagliacozzo, 1998).

Há basicamente, três rotas disponíveis para a multiplicação de um explante: aumentando a liberação de gemas axilares, produzindo brotos adventícios através da organogênese e pela embriogênese somática (Hu & Wang, 1983). A multiplicação dos explantes por gemas axilares utiliza a cultura de ápices caulinares, a cultura de ápices de brotos, de meristemas florais e de sementes, além da cultura de nós. A produção de brotos adventícios e embriões, através da organogênese, pode ser obtida diretamente dos tecidos inoculados ou através de calos (George & Sherrington, 1984).

A função dos explantes é servir como parte propagativa de onde surgirão os calos e/ou novas plântulas. No processo de produção de calos, células do tecido do explante são estimuladas a se dividirem indiferenciadamente, devido à presença de reguladores vegetais (Texeira, 1994).

A cultura de tecidos tem sido usada também como técnica para obtenção de diversos metabólitos primários (enzimas) e secundários (flavonoides) (Matsubara et al., 1989) entre outros.

3.3. Carotenóides

Os carotenóides formam parte de uma família de compostos naturais, onde aproximadamente são 600 os reportados e caracterizados, sendo o β -caroteno o mais abundante na natureza (Martínez, 2001). Estes podem ser encontradas nas três principais linhas evolutivas archaeobacteria, eubacteria e eucarya (Armstrong & Hearst, 1996). A

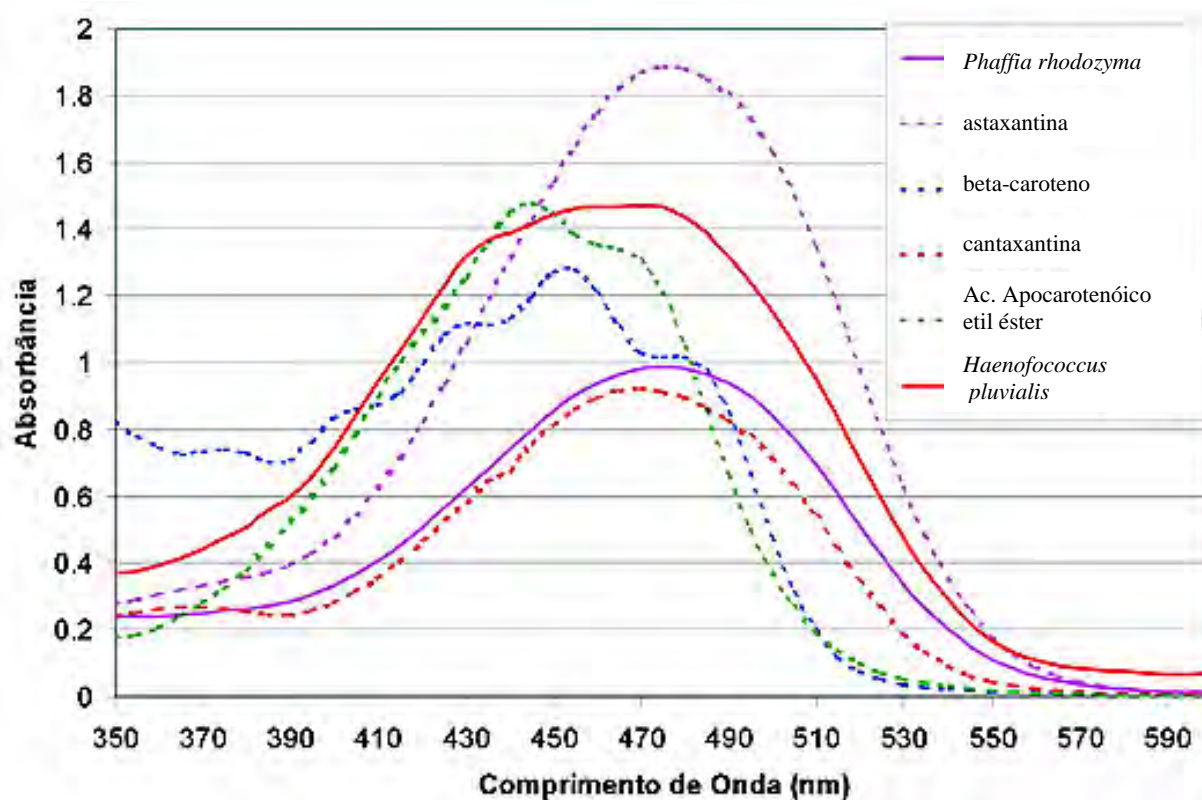
produção natural mundial é estimada em 100 milhões de toneladas por ano, e é encabeçada pela fucoxantina (xantofila) das algas fotossintéticas marrons (Fontana et al., 2000).

Os carotenóides mais comumente encontrados nos alimentos vegetais são o β -caroteno (*Daucus carota*), licopeno (*Lycopersicon esculentum*), xantofilas (zeaxantina, luteína e outras, de *Zea mays*, *Mango indica*, *Carica papaya*) e a bixina (aditivo culinário e corante dérmico usado por indígenas amazônicos de *Bixa orellana*). Outras ocorrências naturais de uso culinário são capsaxantina e capsorubina (*Capsicum annuum*) e a crocina (*Crocus sativus*) (Fontana et al., 2000).

Os carotenóides constituem um dos grupos mais importantes dos pigmentos naturais, pela ampla distribuição, diversidade estrutural e numerosas funções (Martínez, 2001). Nos vegetais, ocorrem nos cromoplastos formando um complexo lipoprotéico e são concentrados nos cloroplastos (Fontana et al., 2000), entretanto, sua presença muitas vezes é mascarada pela clorofila (Martínez, 2001).

Quimicamente, os carotenóides são tetraterpenos formados por oito unidades de isopentenil PP ou dimetil alil PP, com 40 átomos de carbono derivados de duas unidades de geranyl-geranyl-pirofosfato, com um sistema de duplas ligações conjugadas (Martínez, 2001). As respectivas colorações vão desde o amarelo, passando pelo laranja, até o vermelho intenso e resultam da interação de duplas ligações conjugadas na molécula C_{40} , e são caracterizados pela espectrofotometria no visível com comprimentos de onda máximos de absorção (Figura 3) (Fontana et al., 2000).

Figura 3: Espectros de absorvância de β -caroteno e alguns outros carotenóides e algas no comprimento de onda entre 350-590 nm (Fontana et al., 2000).



Dentre as várias funções que lhes são atribuídas destaca-se, em termos nutricionais, o fato de alguns desses pigmentos atuarem como precursores de vitamina A, o que depende essencialmente de sua estrutura, que contém um anel β -ionona não substituído, ligado a uma cadeia poliênica de pelo menos 11 átomos de carbono (Rodriguez-Amaya, 1985). Alguns autores já demonstraram que também a isomeria da molécula influi no aproveitamento biológico dessas provitaminas (Deuel et al. citado por Flores & Penteado, 1992). Todos os isômeros *trans* de carotenos, precursores de vitamina A, possuem maior atividade que os respectivos isômeros cujas duplas ligações encontram-se na configuração *cis*.

Sabe-se que os carotenóides têm diferentes formas geométricas (isômeros *cis e trans*) e estas formas podem ser convertidas pela luz, energia térmica ou reações químicas.

Nos vegetais, os carotenóides estão envolvidos na captação e transferência luminosa no processo de fotossíntese. Diferentemente do β -caroteno, uma xantofila como a astaxantina interage fortemente como “carreadores” naturais de proteínas (carotenoproteínas) (Fontana et al., 2000).

Muitos carotenóides atualmente usados como corantes de alimentos ou de rações, são obtidos por síntese e seu uso vem generalizando-se por serem inócuos, facilmente metabolizados e por garantirem a reprodutibilidade de cor. Aos poucos, os carotenóides estão substituindo os corantes amarelos e vermelhos. Assim, o β -caroteno cristalino sintético é usado principalmente como corante de margarinas. Em geral, os carotenóides usados como corantes alimentícios são estáveis, não sendo afetados por agentes redutores. Entretanto, sob condições oxidativas fortes, podem perder a cor e formar produtos fracamente coloridos (Oliveira et al., 1989).

Segundo Rock et al. (1996), os carotenóides não podem ser considerados apenas como um grupo de pigmentos, mas como substâncias com propriedades muito específicas. Dentre as funções conhecidas estão a absorção de luz, atividade anticancerígena, transporte de oxigênio, atividade pró-vitamina A e atividade antioxidante. Os carotenóides, também são considerados como supressores de radicais de oxigênio. Através de técnicas específicas, verificou-se que as vesículas de β -caroteno se encontram bastante distantes das moléculas de clorofila. No caso da microalga *Dunaliella*, alguns autores mencionam que o β -caroteno não poderia funcionar como agente protetor contra as ações oxidativas dos radicais livres, uma vez que estes têm um período de vida muito curto. Desta

maneira, pelo menos nesta microalga, segundo tais autores, o β -caroteno não teria as mesmas funções antioxidativas, como é o caso do homem (Henriques et al., 1998).

O β -caroteno é um dos compostos carotenóides mais bem estudados. Na última década adquiriu um papel relevante no contexto da nutrição e medicina. Este carotenóide, que confere a muitos frutos e vegetais a sua pigmentação amarelada, desempenha um importante papel fisiológico, sendo convertido em vitamina A (retinol) e ácido retinóico no corpo humano (Yamano et al., 1994; Armstrong & Hearst, 1996; Armstrong, 1997). Esta conversão processa-se principalmente no intestino e no fígado. Outros carotenóides podem igualmente desempenhar tal função, mas dão origem a uma única molécula de vitamina. O β -caroteno, pelo contrário, dá origem a duas moléculas de retinol. Por esta razão, o β -caroteno é por vezes apelidado de pró-vitamina A, funcionando como um reservatório vitamínico (Armstrong & Hearst, 1996).

A distribuição dos carotenóides no mundo vegetal é muito ampla, tendo-se estudado sua presença em plantas folhosas como espinafre (*Tetragonia expanza* Murray), couve chinesa (*Brassica chinensis* L.), couve flor (*Brassica oleraceae* L.), mostarda (*Brassica juncea* L.), agrião (*Nasturtium officinale*) e em frutos como tomate (*Lycopersicum esculentum*) (Minazzi-Rodrigues & Penteado, 1989; Sant'anna & Penteado, 1996).

Os teores médios de β -caroteno encontrados em hortaliças folhosas oscilam entre 13-20 $\mu\text{g/g}$ como encontrado no agrião 19,7 $\mu\text{g/g}$, em espinafre 19,55 $\mu\text{g/g}$, folha de couve flor 18,88 $\mu\text{g/g}$ (Sant'anna & Penteado, 1996), couve chinesa 13,41 $\mu\text{g/g}$, enquanto que nas folhas da mostarda, o teor é de aproximadamente 60,45 $\mu\text{g/g}$ (Minazzi-Rodrigues & Penteado, 1989).

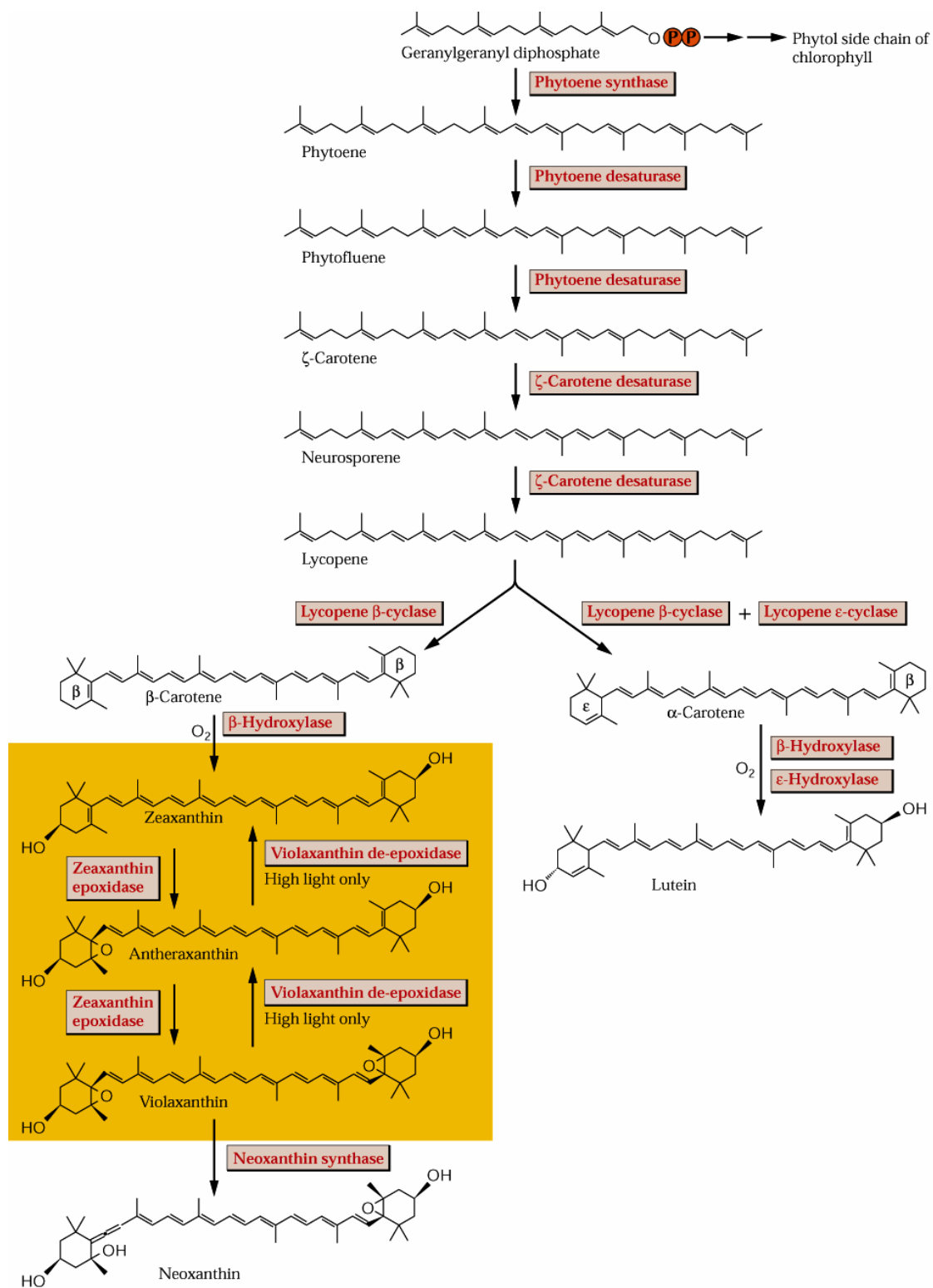
Segundo Moraes (1999), em suas análises morfo-anatômicas e fitoquímicas, plantas de *Pothomorphe umbellata* L. e *Pothomorphe peltata* L. apresentam abundantes carotenos nos idioblastos das folhas.

As moléculas dos carotenóides são totalmente simétricas. São sintetizadas a partir geranylgeranyl difosfato pela ação da enzima geranylgeranyl pirofosfatase (GGPP). A fitoeno sintetase catalisa a condensação de duas moléculas de GGPP em fitoeno pirofosfato. Uma série de reações de desnaturação resulta na síntese do licopeno, para logo catalisar β -caroteno, do qual produz a zeaxantina e a violaxantina, os quais são os dois principais compostos do ciclo das xantofilas (Figura 4) (Bartley & Scolnix, 1995).

Na determinação dos carotenóides, a saponificação é o método mais efetivo e importante na análises dos pigmentos carotenóides (Bertoli, 1998; Liaaen-Jensen, 1971).

Em frutos folhosos, os carotenóides são esterificados por ácidos graxos. O grau da esterificação poderia estar diferenciado em função do número de hidroxilas presentes nas xantofilas. Os monohidroxicarotenóides e dihidroxicarotenóides poderiam ser encontrados livres ou esterificados por um ou dois ácidos graxos, prejudicando posteriormente na identificação desses picos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Visando uma melhor separação dos carotenóides, a maioria de métodos que quantifica carotenóides tem passado por uma fase de saponificação (Chen & Chen, 1994).

Figura 4: Biosíntese dos carotenóides (Buchanan et al., 2002).



Normalmente, a saponificação é realizada com uma solução, de hidróxido de potássio (KOH) etanólico ou metanólico, entre 10-60% (p/v) (Davies, 1976), onde é mantida a temperatura ambiente por uma noite (Britton, 1985). Depois da saponificação, as amostras são extraídas com dietil éter ou hexano, e finalmente, lavadas com água até que o KOH seja removido (Olivier & Palou, 2000).

A perda total ou parcial dos carotenóides durante a saponificação tem sido descrita, mas isto depende das condições da saponificação e da composição da amostra (Minguez-Mosquera & Perez-Galvez, 1998).

No caso do leite e do pão de leite, a saponificação é importante porque o conteúdo de gorduras é muito alto (aproximadamente 45%) (Craft et al., 1992). Nestes casos, são muito utilizados tratamentos enzimáticos por precipitação de proteínas com etanol (EtOH) e finalmente extração com hexano.

Trabalhos com brócolis crus, mostraram que a saponificação com KOH metanólico (30%) a temperatura ambiente, por 3 horas e sob atmosfera de N₂, causam perdas de 6% para os carotenos e 17-84% para os oxicarotenóides (Khachick et al., 1986). Por outro lado, Baranyai et al. (1982) analisando extrato de páprica sob as mesmas condições de saponificação, com um intervalo de tempo maior (16 horas), não observaram perdas.

Nos estudos feitos por Kimura et al. (1990), onde analisaram 6 procedimentos diferentes para saponificação, encontraram que o processo degradativo foi agravado pela alta temperatura e pelo tempo de contato entre os pigmentos e o álcali. As porcentagens de perda variam dependendo dos carotenóides. Os autores recomendaram a saponificação com KOH metanólico (10%) sob temperatura ambiente e atmosfera N₂, mantida a noite toda.

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Departamento de Química e Bioquímica, do Instituto de Biociências da UNESP - Botucatu, SP. A parte experimental teve duas fases: cultura de tecidos e análise bioquímica.

4.1. Obtenção do material vegetal

Foram usadas estacas e sementes de *Pothomorphe umbellata* L. obtidas do Distrito de Adranópolis - PR, como fonte de explantes (Figura 1).

As estacas, foram coletadas com aproximadamente 4 a 5 nós cada, para manter uma uniformização do material vegetal. Cada explante foi cortado reto na parte de cima e em bisel na parte de baixo, para diferenciar o sentido do crescimento. Após a coleta o material foi mantido em câmara fria a $\pm 4^{\circ}\text{C}$ por dois dias, até o momento da inoculação do experimento.

No caso das sementes, estas foram coletadas dos frutos da planta, e secos em temperatura ambiente. Após a coleta, o material foi mantido em câmara fria até o momento da realização do experimento.

4.2. Primeira etapa: Micropropagação

4.2.1. Assepsia

4.2.1.1. Assepsia das estacas

Após retiradas da câmara fria, as estacas foram lavadas com água corrente e as folhas foram retiradas, tendo-se cuidado para não danificar as gemas.

As estacas foram colocadas em bandejas com água corrente para evitar a desidratação e sua provável oxidação. As estacas foram então submetidas a vários testes de desinfestação (Quadro 2).

Quadro 2. Tratamentos utilizados na fase de desinfestação das estacas de *Pothomorphe umbellata*.

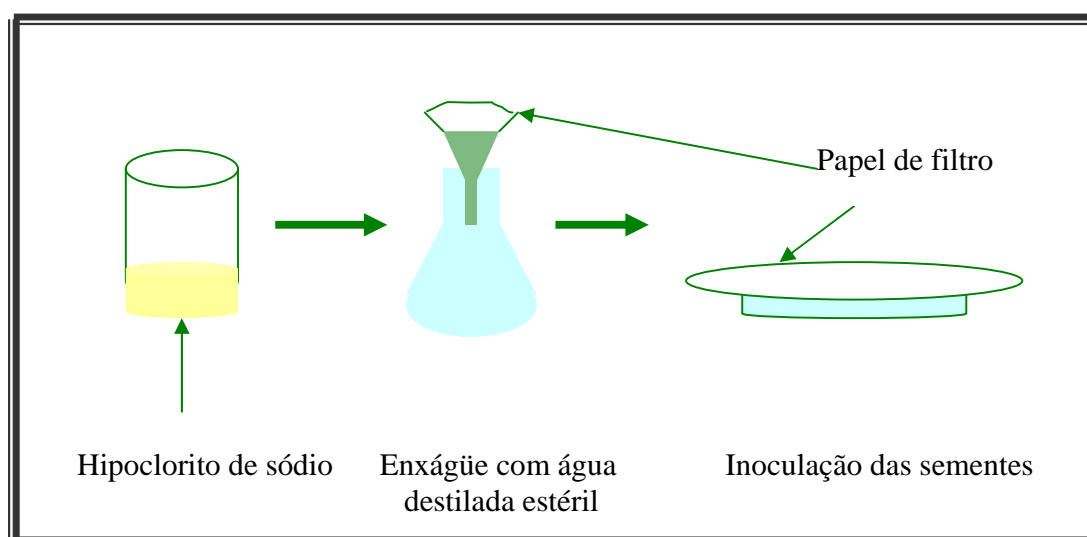
	Tratamento 1	Tratamento 2	Tratamento 3	Tratamento 4
Benomyl	1,5 g.L ⁻¹ 50 minutos	2,0 g.L ⁻¹ 50 minutos	—	—
Thiram	—	—	1,5 g.L ⁻¹ 50 minutos	2,0 g.L ⁻¹ 50 minutos
Álcool 70% v/v	30 seg	30 seg	30 seg	30 seg
Hipoclorito de sódio (Q-Boa 20%)	50% v/v 30 minutos	35% v/v 30 minutos	50% v/v 30 minutos	35% v/v 30 minutos
Enxágüe com água Destilada estéril	3 vezes	3 vezes	3 vezes	3 vezes

4.2.1.2. Assepsia das Sementes

As sementes da *Pothomorphe umbellata* L. foram embebidas em água destilada, em repouso, para amolecer o tegumento da semente (Upadhya*). Após 12 horas, foram desinfestadas superficialmente em câmara de fluxo laminar, com álcool 70% v/v por 30 segundos e solução de hipoclorito de sódio comercial Q-Boa, a 20% v/v (2% de cloro ativo) por 5, 10, 15 e 30 minutos.

Devido ao tamanho das sementes (<1 mm) foi desenvolvido um sistema de desinfestação. As sementes foram contadas e colocadas num recipiente com a solução de hipoclorito de sódio durante o tempo correspondente ao tratamento. Esta solução foi vertida em funil contendo papel filtro estéril e em seguida foram feitas três lavagens com água destilada estéril (Figura 5).

Figura 5: Desinfestação das sementes de *Pothomorphe umbellata*



UPADHYA, M. (Centro Internacional de la Papa – Lima). Comunicação pessoal, 2000.

Finalizadas as lavagens, imediatamente foram inoculadas as sementes em placas de Petri contendo meio semi-sólido MS (Murashige & Skoog, 1962) (Quadro 3). As placas foram mantidas em sala de crescimento a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 2000 lux e fotoperíodo de 16 h/dia, durante 30 dias. Cada tratamento contou com três repetições com 50 sementes por cada um deles.

Nesta etapa foi avaliado o melhor tempo de assepsia nas sementes de *P. umbellata*.

4.2.2. Germinação das sementes

Padronizada a assepsia das sementes de *P. umbellata*, testou-se a germinação sob efeito de 3 fotoperíodos: 16h luz /8h escuro, 24h luz com intensidade luminosa de 2000 lux e só escuro (em ausência de luz), todos em temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. As sementes foram mantidas em sala de crescimento durante 40 dias, onde foram feitas contagens a cada 7 dias. Nesta etapa foi avaliado o número de sementes germinadas (saída da radícula) em cada fotoperíodo.

4.2.3. Produção de calos

O meio de cultura para obtenção de calos consistiu nos sais básicos de Murashige & Skoog (1962), 30 g.L^{-1} de sacarose comercial (Marca Da BARRA Especial), 7 g.L^{-1} de ágar e reguladores vegetais dependendo do tratamento. Foram estabelecidos 4 tratamentos, baseados nos trabalhos de Pescador et al. (2000) em *Piper hispidinervium*, mais conhecida como pimenta longa (Quadro 3).

O pH dos meios foi ajustado a 5,8, os quais foram autoclavados durante 20 minutos a 121°C e 1 atm de pressão. Após a esterilização dos meios, as sementes anteriormente germinadas *in vitro* foram inoculadas em frascos de vidro contendo 25 ml de meio de cultura. O material vegetal foi mantido em sala de crescimento, com fotoperíodo de 16 horas, 2000 lux e temperatura de 25± 2°C. Durante esta fase foram avaliados o diâmetro dos calos e a formação de brotações.

Quadro 3. Tratamentos utilizados na fase de produção de calos em plântulas de *Pothomorphe umbellata*.

TRATAMENTOS				
	T0	T1	T2	T3
	(Testemunha)			
Sais	MS	MS	MS	MS
Tiamina	1 mg.L ⁻¹	1 mg.L ⁻¹	1 mg.L ⁻¹	1 mg.L ⁻¹
Sacarose comercial	30 g.L ⁻¹	30 g.L ⁻¹	30 g.L ⁻¹	30 g.L ⁻¹
Ágar	7 g.L ⁻¹	7 g.L ⁻¹	7 g.L ⁻¹	7 g.L ⁻¹
BAP	—	0.5 mg.L ⁻¹	1,0 mg.L ⁻¹	1,5 mg.L ⁻¹
NAA	—	0.4 mg.L ⁻¹	0.6 mg.L ⁻¹	0.8 mg.L ⁻¹

4.2.4. Diferenciação das plântulas

Os calos produzidos nos tratamentos anteriores foram transferidos para meio proposto por Pereira et al. (2000) para desenvolvimento de brotos, e comparados com

aquelas plântulas cultivadas em meio MS (testemunha). A composição do meio denominado MS/4 foi 0,5 mg.L⁻¹ BAP, 0,1 mg.L⁻¹ GA₃ e 10 g de açúcar cristal comercial (Quadro 4).

Os calos foram mantidos em sala de crescimento, com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25± 2°C, durante 40 dias.

Nesta esta etapa foi avaliado o número de plântulas produzidas a partir dos calos.

Quadro 4: Tratamentos utilizados nos calos de *Pothomorphe umbellata* na fase da organogênese.

TRATAMENTOS		
	Testemunha	T1
Sais	MS	MS/4
Tiamina	1 mg.L ⁻¹	1 mg.L ⁻¹
Açúcar cristal	30 g.L ⁻¹	10 g.L ⁻¹
Ágar	7 g.L ⁻¹	7 g.L ⁻¹
GA ₃	—	0.1 mg.L ⁻¹
BAP	—	0.5 mg.L ⁻¹

4.2.5. Crescimento das plântulas

As plântulas obtidas nos tratamentos propostos foram transplantadas para meio MS básico (Quadro 5) com a finalidade de avaliar seu desenvolvimento. As condições de cultivo foram as mesmas descritas anteriormente.

Foi avaliado o número de plântulas, altura e número de nós em cada um dos tratamentos.

Quadro 5. Sais componentes e suplementos para constituição do meio básico MS (Murashige & Skoog, 1962).

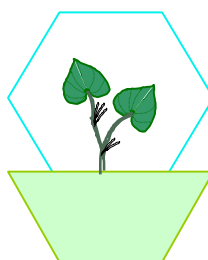
	SAIS	CONCENTRAÇÃO (g.L ⁻¹)
Macronutrientes	NH ₄ NO ₃	165
	KNO ₃	190
	CaCl ₂ .2H ₂ O	44
	MgSO ₄ .7H ₂ O	37
	KH ₂ PO ₄	17
Micronutrientes	MnSO ₄ .H ₂ O	1,690
	H ₃ BO ₃	0,620
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,860
	KI	0,083
	NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,025
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,0025
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,0025
FeEDTA	NaEDTA.2H ₂ O	3,73
	FeSO ₄ .7H ₂ O	2,78
Mistura Orgânica	Tiamina.HCl	0,02
	Ácido nicotínico	0,1
	Piridoxina.HCl	0,1
	Glicina	0,4

4.2.6. Aclimação

A aclimação das plântulas de *Pothomorphe umbellata* foi realizada nos meses de março e abril do 2003, na estufa da Seção de Manutenção, do Instituto de Biociências da UNESP Botucatu, em ambiente protegido com 50% de sombreamento e com nebulização três vezes por dia durante 15 minutos cada. No plantio, usou-se vasos plásticos individuais, com substrato formado por 90% de restos vegetais e 10% de esterco de aves (Lucio & Sidoes*).

A plântulas permaneceram em casa de vegetação por 30 dias, sendo que durante os primeiros 15 dias foi adotado um sistema para proteger as plântulas de um estresse hídrico, onde foi colocado um frasco transparente (para não interferir na fotossíntese) nem a umidade relativa (Figura 6). A temperatura média na casa de vegetação variou entre 18 a 25° C.

Figura 6. Sistema adotado para evitar o estresse hídrico em plântulas de *Pothomorphe umbellata*.



LUCIO, E. & SIDOES, L. (Instituto de Biociências, UNESP – Campus de Botucatu) Comunicação pessoal, 2003.

4.3. Segunda etapa: Determinação de Carotenóides

As amostras (plântulas e calos) foram congeladas em nitrogênio líquido (-196°C). Todas as operações foram realizadas no escuro, para evitar a degradação dos carotenóides.

4.3.1. Saponificação

A saponificação é uma etapa necessária para a remoção de lipídeos e clorofila, que são compostos que podem alterar a quantificação correta dos carotenóides (Davies, 1976).

Para a saponificação, as amostras foram homogeneizadas em 30 mL de uma solução aquosa de KOH metanólico 10% (Sant'anna e Penteado, 1996), por aproximadamente 12 horas a temperatura ambiente (Minazzi-Rodrigues & Penteado, 1989).

4.3.2. Extração dos carotenóides

Para a extração dos carotenóides totais foi utilizado o método descrito no Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemistry – AOAC (1990), adaptado às características do material vegetal (Figura 7).

Após a saponificação, a amostra foi filtrada à vácuo e o resíduo transferido para béquer, onde foi adicionado 20 mL de acetona, 30 ml de hexano e 50 mg de MgCO₃.

Num funil de separação, a mistura foi agitada por 5 minutos, onde a mistura acetona - hexano foi separada e o precipitado (material vegetal e MgCO₃) foi lavado tantas vezes quanto necessário com 12,5 mL de acetona até obter o extrato incolor.

Posteriormente, foram misturados os extratos e adicionados 12,5 mL de hexano. Finalmente, esta mistura foi lavada 5 vezes com água destilada, para garantir a remoção completa da acetona (camada inferior).

O extrato hexânico foi transferido para balão volumétrico de 50 mL, contendo 4,5 mL de acetona. O volume foi completado com hexano.

4.3.3. Quantificação de carotenóides

4.3.3.1. Preparação da reta padrão

A preparação da reta padrão foi baseada no método descrito por AOAC (1995). Para a preparação da solução estoque, foi utilizado aproximadamente 6 µg/L. Foram pesados 1,5 mg de β-caroteno (Sigma, 95%. C.9750) e transferidos para balão volumétrico de 250 mL contendo acetona.

Após diluição obteve-se diferentes concentrações (0.6, 1.2, 1.8, 2.7, 3.6 e 4.5 µg/L) para plotagem da reta padrão. Foi usado acetona como branco.

4.3.3.2. Calculo da Concentração dos carotenóides

Por serem desconhecidos os carotenóides constituintes do extrato acetônico, realizou-se inicialmente o espectro de absorção, nos comprimentos de onda de 350 a 550 nanômetros (nm).

A quantificação dos carotenóides totais foi feita com uma modificação da formula de Ramos (1987), a partir da absorbância máxima verificada anteriormente. Baseada na lei de Beer, utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\mu\text{g carotenóides totais / gr amostra} = \frac{A(450\text{ nm}) \times V \times 10^6}{\varepsilon_{1\text{cm}}^{1\%} \times 100} / \text{Peso da amostra fresca (g)}$$

A. = absorvância obtida no espectro de absorção a 450 nm.

V = volume final em hexano

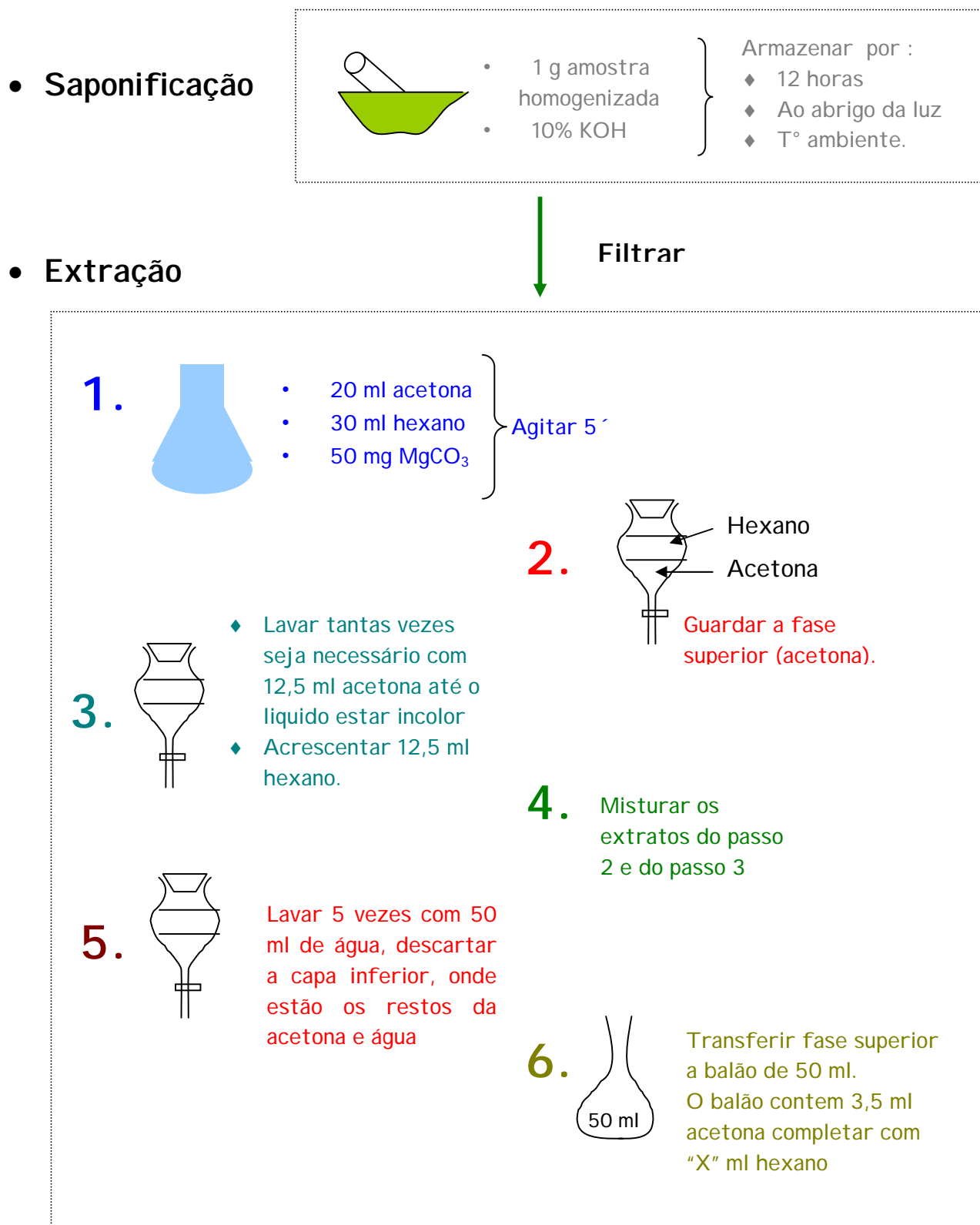
$\varepsilon_{1\text{cm}}^{1\%}$ = coeficiente de extinção = 2592

4.3.3.3. Calculo do rendimento dos carotenóides

Para o calculo do rendimento foi feita a extração de carotenóides (Figura 7) a partir do padrão de β -caroteno (Sigma, 99%). Obtido o rendimento calculou-se o fator de correção, para finalmente se obter a concentração real dos carotenóides.

Concentração real = Concentração obtida x Fator de Correção
--

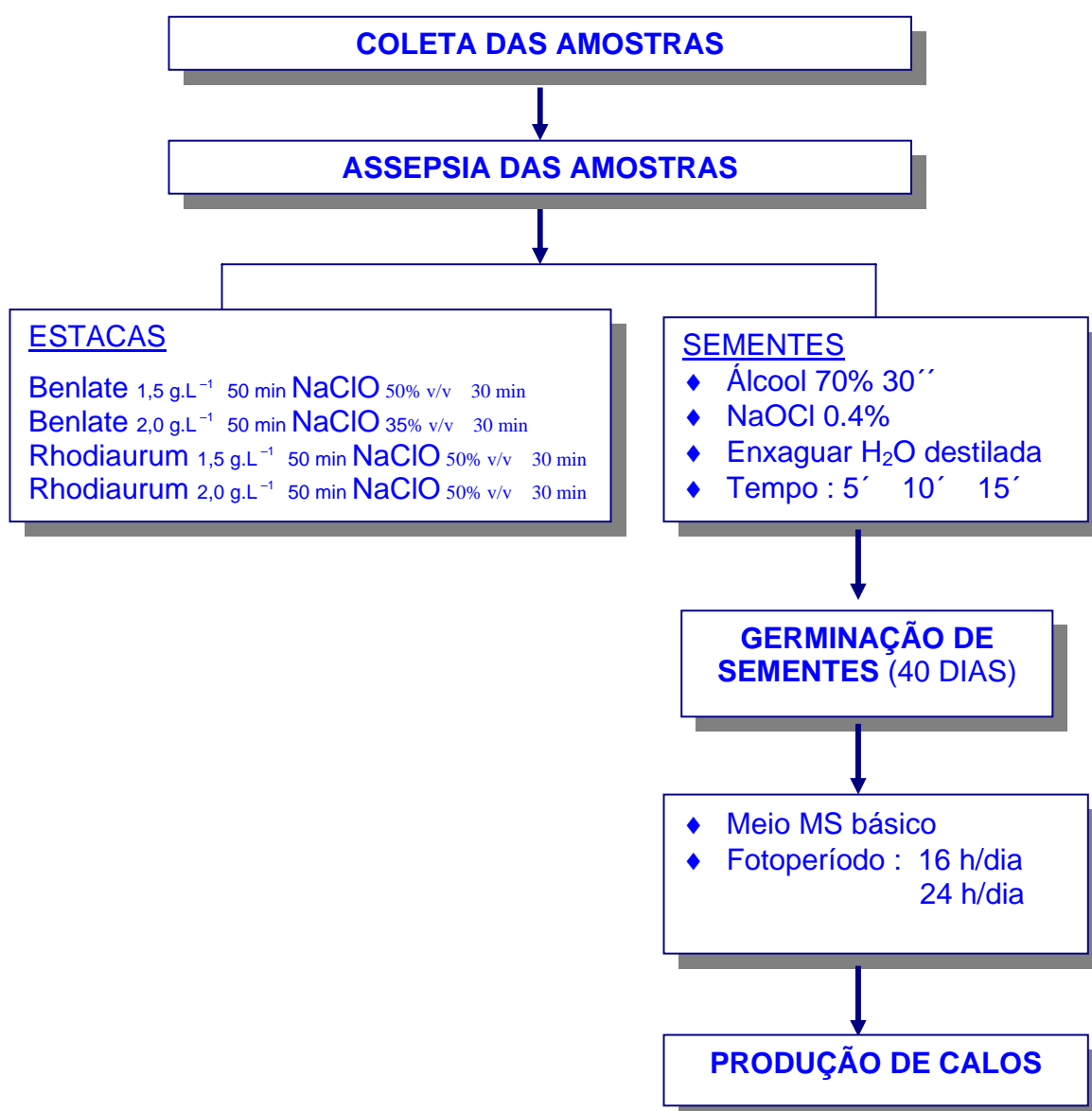
Figura 7. Fluxograma da saponificação e extração dos carotenóides em plântulas de *Pothomorphe umbellata*.

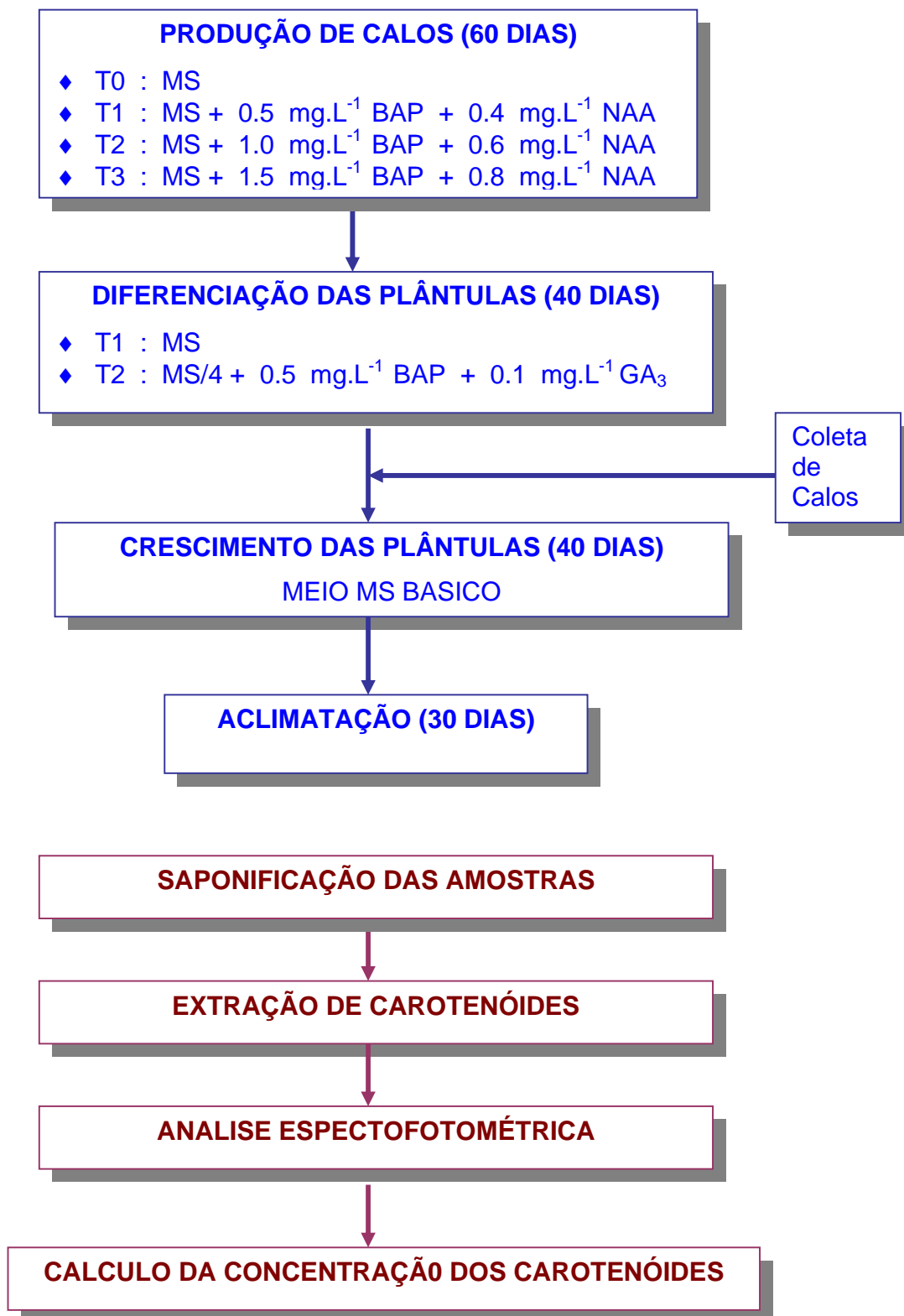


4.4. Fluxograma das Atividades

As etapas de desenvolvimento do trabalho são apresentadas na Figura 8.

Figura 8. Fluxograma das atividades desenvolvidas com plântulas de *Pothomorphe umbellata*.





V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pela escassa bibliografia encontrada sob a introdução e multiplicação *in vitro* de *Pothomorphe umbellata* e outras espécies de seu gênero foi decidido usar como explantes estacas e sementes de *Pothomorphe umbellata*, por serem explantes que apresentam alta proporção de tecido meristemático e embrionário, com capacidade de expressar totipotência (Mantell et al., 1994). O material escolhido foi proveniente de um local com alta incidência de contaminação, tanto por bactérias como por fungos.

5.1 Primeira etapa: Micropropagação

5.1.1 Assepsia

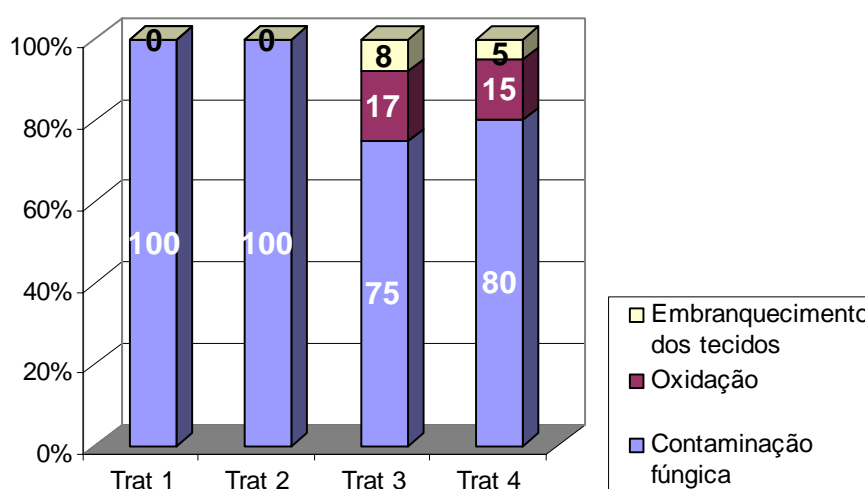
5.1.1.1. Assepsia das estacas

A fase inicial deste trabalho consistiu na desinfestação das estacas de *Pothomorphe umbellata*. Como o material estava muito contaminado, foi submetido a testes de desinfestação. Tanto o Carbonato “Benlate”” Metil [1-(butilamino)carbonil]-1H-

benzimidazol carbamato) como o “Rhodiaurum” não mostraram diferenças como descontaminante fúngico, mas sim no tempo de ação. Nos tratamentos I e II, observou-se que a contaminação ocorreu entre segundo e quarto dia, e nos tratamento III e IV, os primeiros indícios da contaminação fúngica iniciou aos 5 dias (Figura 9). Cabe-se destacar que foi feita uma tentativa por fazer a desinfestação usando gemas laterais, mas elas morreram por oxidação aos 5-7 dias de inoculadas.

Nos tratamentos I e II, a contaminação foi de 100%, mas nos tratamentos III e IV observa-se outras características que não foram notadas nos demais, devido a alta contaminação. Os tecidos das gemas apicais apresentaram um embranquecimento na parte basal da microestaca, provavelmente devido a alta concentração do hipoclorito de sódio. Além disso, observou-se que as microestacas mais velhas apresentaram oxidação total dos tecidos.

Figura 9: Características da contaminação, oxidação e embranquecimento de tecidos nas microestacas de *Pothomorphe umbellata* submetidas a processos de desinfestação.



A dificuldade maior na etapa na desinfestação é se obter um tecido descontaminado sem conduzi-lo a morte quando isolado. Tem-se várias substâncias com ação germicida que são utilizadas para desinfestar os explantes. O Benlate (Benomyl) é indicado como fungicida de alto espectro de ação e é pouco tóxico a cultura. Um desinfestante considerado como adjuvante (facilita ação de outros produtos) é o etanol, utilizado geralmente entre 70-80% pela sua eficiência e porque a maiores concentrações pode desidratar rapidamente aos tecidos (Grattapaglia & Machado citado por Torres et al., 1998).

Juntamente com o etanol, o cloro é o princípio ativo mais utilizado dentro das soluções desinfestantes e a forma mais utilizada é de hipoclorito de sódio (NaClO), mas também tem se utilizado o hipoclorito de cálcio (CaClO) que se apresenta menos tóxico para os tecidos. Outra forma de cloro também utilizado é o cloreto de mercúrio II (HgCl_2) o qual é recomendado para materiais vegetais provenientes do campo com alta probabilidade de contaminação (Rathore et al., 1992). Uma das desvantagens do uso do HgCl_2 é seu alto grau de toxicidade. É utilizado em menores concentrações que os hipocloritos de sódio e de cálcio (Grattapaglia & Machado citado por Torres et al., 1998). Atualmente, a combinação de álcool e hipoclorito de sódio é mais usada e tem-se mostrado eficiente (Nicoloso et al., 2001). A ação do cloro sob os microorganismos caracteriza-se pela oxidação das paredes celulares dos mesmos, que causa rompimento e conseqüentemente, eliminando-os (<http://www.gqc.com.br/iqc/hipoclorito.htm>).

Todos os testes realizados com microestacas não produziram nem plantas nem calos. As microestacas com tecidos embranquecidos que não morreram, após aproximadamente 15 dias, apresentaram vestígios de bactérias. Estas microestacas foram submergidas em antibiótico (Oxitetraciclina HCl) a $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ por 15 minutos, mas as gemas

não resistiram e morreram por oxidação após 3 dias. Resultados contrários foram obtidos por Souza (2002) em plântulas de *Dioscorea alata* L., provavelmente devido a resistência dos tecidos vegetais.

Os antibióticos são substâncias produzidas por vários microorganismos que suprimem o crescimento de outros microorganismos e eventualmente os destroem. Entre a classificação pelo mecanismo de ação estão os inibidores da síntese de proteínas como “Oxitetraciclina HCl”, que é um bacteriostático; provavelmente, o tratamento mais apropriado deveria ter sido utilizado outro tipo de bactericida, tal como “Rifampicina” (Catálogo Duchefa, 1996)

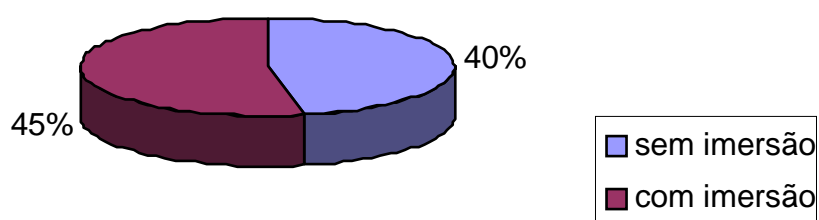
As gemas mais resistentes à desinfestação foram as laterais da porção mediana (segundas e terceiras da microestaca). As gemas apicais foram muito fracas para suportar a alta concentração do hipoclorito e o tempo da exposição ao desinfestante. As últimas gemas por serem muito lenhosas, oxidaram-se com maior facilidade.

Muitas vezes a contaminação por bactérias, fungos e leveduras presentes no meio de cultura não é causada só pela presença endógena da planta ou pela procedência, mas também pela manipulação do material vegetativo utilizado, ou pela desinfestação inadequada dos materiais do laboratório. A contaminação endógena, geralmente é causada pelas bactérias presentes nos tecidos vegetais. Os métodos de desinfestação nem sempre eliminam os microorganismos associados aos tecidos vegetais, muitos deles permanecem latentes no interior das células e nos espaços intercelulares ou vasos condutores ficando protegidos dos agentes químicos (Capó, 1998).

5.2.1. Assepsia das sementes

As sementes de *P. umbellata* apresentam um tegumento grosso, que poderia dificultar a saída da radícula no momento da germinação. O tratamento com sementes submetidas a imersão em água destilada por aproximadamente 12 horas, não mostrou diferença na germinação daquelas não embebidas. As sementes que não foram imersas em água apresentaram uma porcentagem de 40% de germinação e as sementes em imersão 45% (Figura 10).

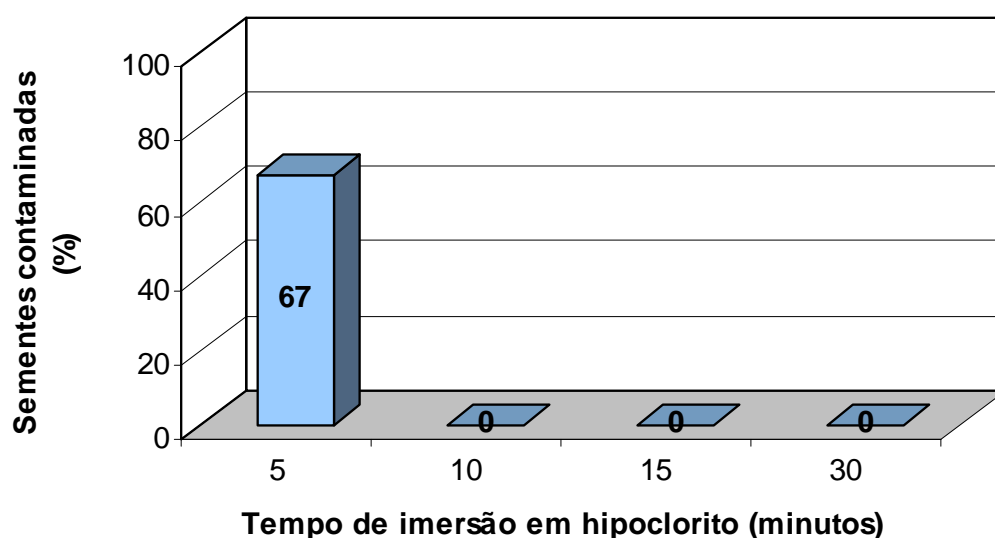
Figura 10: Porcentagem de germinação de sementes de *Pothomorphe umbellata* com e sem imersão em água destilada.



A desinfestação das sementes foi realizada em câmara de fluxo laminar, para evitar qualquer contaminação externa que poderia interferir nos resultados.

Observou-se que sementes desinfestadas em solução de hipoclorito comercial (Q-Boa) na concentração de 20% por 5 minutos apresentaram contaminação de 67%, e aquelas tratadas em solução semelhante nos tempos 10, 15 e 30 minutos não mostraram contaminação (Figura 11). Assim, foi importante aumentar o tempo de tratamento com hipoclorito nestas sementes.

Figura 11: Taxa de contaminação por bactérias em sementes de *Pothomorphe umbellata* após o tratamento de desinfestação com hipoclorito comercial.



Aos 5 dias após da semeadura observou-se a saída da radículas, e entre os 7-8 dias, as primeiras folhas.

A contaminação, principalmente por bactérias observada no tempo de 5 minutos, ocorreu após 10 dias, o que pode ter sido devido a diversos fatores como origem exógena, manipulação ou pouco tempo de exposição ao desinfestante. O crescimento da

plântula após a germinação mostrou desenvolvimento normal; entretanto, após os 10 dias as poucas plântulas formadas morreram (Figura 12).

Não foi encontrada diferença significativa ($p < 0.05$) entre o número de sementes germinadas nos tratamentos de 5, 10, 15 e 30 minutos (45 %), em teste de Tukey (Quadro 6).

Quadro 6. Avaliação final das sementes de *Pothomorphe umbellata* germinadas aos 7 dias após a semeadura.

Tratamento	Sementes germinadas
5 minutos	40 a
10 minutos	45 a
15 minutos	45 a
30 minutos	42,5 a
CV%	5,55%

As médias seguidas da mesma letra na vertical não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

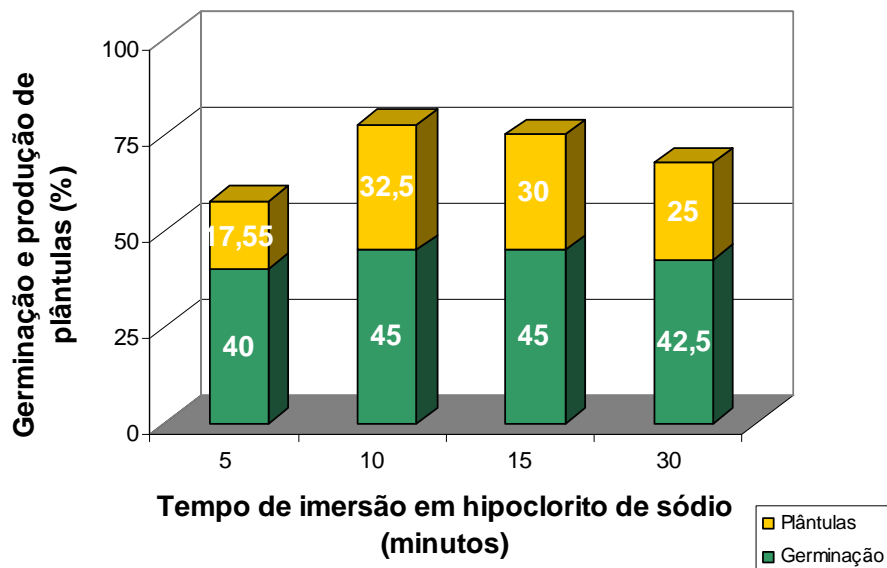
Após 30 dias, notou-se que o número de sementes germinadas não variou em nenhum dos tratamentos; a diferença foi observada nas plântulas germinadas. Nos tratamentos 10 e 15 minutos observou-se o maior número de plântulas (32,5 e 30 plântulas respectivamente). Não ocorreu diferença significativa entre os tratamentos 10, 15 minutos ($p < 0,05$) em Testes de Tukey (Quadro 7).

Quadro 7. Avaliação final das plântulas de *Pothomorphe umbellata* produzidas após a germinação aos 30 dias após a semeadura.

Tratamento	Plântulas
10 minutos	32,5 a
15 minutos	30 a
30 minutos	25 b
CV%	13,093%

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

Figura 12: Germinação e produção de plântulas de *Pothomorphe umbellata* submetidas a diferentes tempos de desinfestação.

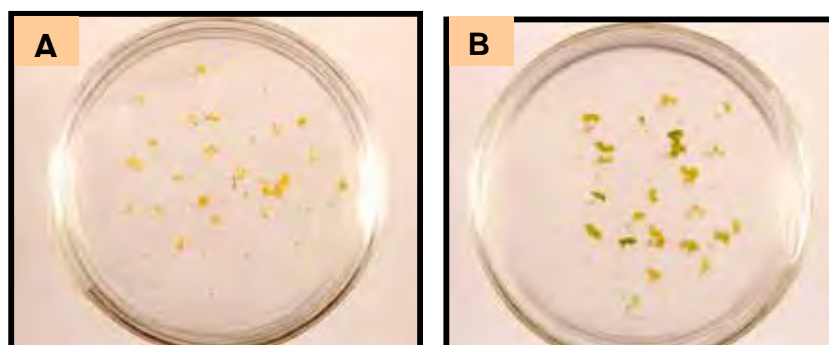


5.1.2. Germinação das sementes

As sementes germinadas apresentaram diferenças quanto ao tratamento com fotoperíodo a que foram submetidas (Figura 14). As plântulas obtidas em luz contínua,

apresentaram amarelecimento foliar e baixo desenvolvimento, por outro lado, aquelas germinadas em fotoperíodo de 16 horas mostraram maior tamanho e coloração verde intensa nas folhas (Figura 13 e 15, Quadro 8).

Figura 13: Germinação de sementes de *Pothomorphe umbellata* aos 30 dias após de semeadura. **A:** Luz contínua. **B:** Fotoperíodo 16h/dia.



Não se encontrou diferença significativa entre as sementes germinadas na luz contínua e a 16 h/dia ($p > 0,05$). As sementes germinadas no escuro mostraram baixa porcentagem de germinação, sendo de essa forma, possivelmente fotoblásticas positivas.

Quadro 8. Germinação das sementes de *Pothomorphe umbellata* submetidas a luz, escuro e 16 h/dia aos 30 dias após a semeadura.

Tratamento	Plântulas
Luz	23,88 a
Escuro	9,44 b
16 h/dia	23,66 a
CV%	10,59%

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

Figura 14. Porcentagem de germinação de sementes de *Pothomorphe umbellata* submetidas a diferentes fotoperíodo (luz, 16h/dia e escuro)

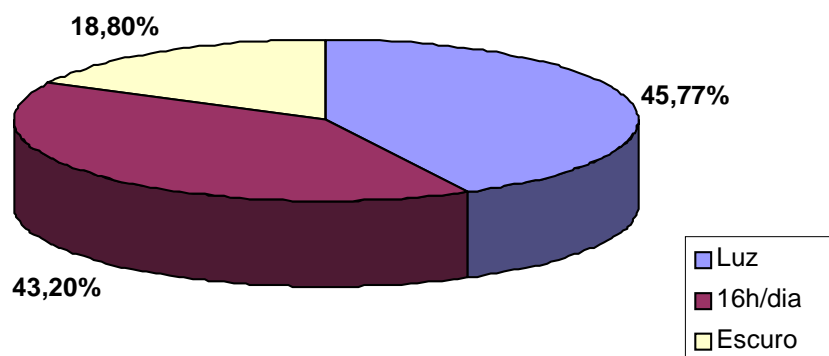


Figura 15: Plântulas de *Pothomorphe umbellata* obtidas em tratamento com 16 h/dia, aos 45 após a semeadura.



5.1.3. Produção de calos

Neste experimento utilizou-se benzilaminopurina (BAP) e ácido naftaleno acético (NAA) para a indução de calos.

Um dos principais problemas enfrentados neste trabalho foi a falta de bibliografia sobre o gênero *Pothomorphe umbellata*, portanto, utilizou-se as informações de *Piper hispidinervium*, pertencente a mesma família.

São várias as citocininas e auxinas que podem agir na indução e proliferação das gemas axilares. O tipo de citocinina e a sua concentração, são os fatores que mais influenciam o sucesso a multiplicação *in vitro*. O BAP tem sido muito eficaz para promover a indução de brotações adventícias, além de ser a mais barata de todas (Hu & Wang, 1983). A razão da eficiência do BAP pode estar na capacidade dos tecidos vegetais de metabolizar os hormônios naturais mais rapidamente do que os reguladores vegetais sintéticos (Grattapaglia & Machado citado por Torres et al., 1998). Entre as auxinas, NAA é o regulador vegetal que tem demonstrado maior concomitância com o BAP para a proliferação das gemas e algumas raízes adventícias (Pereira et al., 2000).

Na primeira avaliação, aos 30 dias, observou-se que a produção de calos das plântulas germinadas ainda não estava muito definida para nenhum dos tratamentos.

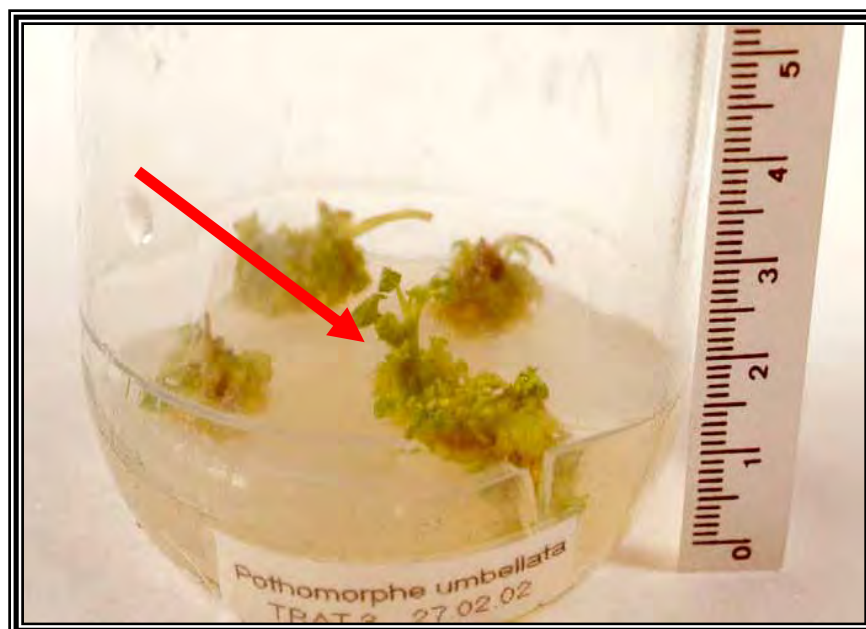
Aos 45 dias, plântulas do tratamento T1 apresentaram baixa produção de calos, ocorrendo só na base da plântula e sem presença de brotações ou formações de gemas, porém mostraram formação de algumas plântulas (6 plântulas/27 calos). Os tratamentos T2 (11 plântulas/27 calos) e T3 (8 plântulas/27 calos) apresentaram maior indiferenciação celular e ambos tratamentos não apresentaram raízes. No tratamento T2 (NAA 0.6 mg.L⁻¹, BAP 1.0 mg.L⁻¹) observou-se maior número de brotos (Figura 16, Quadro 9).

Quadro 9: Produção de plântulas a partir de calos de *Pothomorphe umbellata* aos 45 dias.

Tratamento	Plântulas/calos
T1	6 b
T2	11 a
T3	8 ab
CV%	30,19%

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

Figura 16 : Produção de calos de *Pothomorphe umbellata* do tratamento T2 aos primeiros 45 dias.



Plântulas mantidas em tratamento T0 (testemunha) mostraram folhas grandes e bom desenvolvimento das raízes. Aos 60 dias, a plântula apresentou 3,8 brotos/plântula. Os tratamentos T1 (1,425 cm) e T3 (1,46 cm) não mostraram diferença significativa em relação a avaliação do diâmetro dos calos (Figura 17). O tratamento T2 (1,72 cm) obteve a maior significância (Quadro 10).

Notou-se uma correlação positiva entre o diâmetro dos calos e o número de plantas formadas (Quadro 10).

Quadro 10. Avaliação do diâmetro dos calos de *Pothomorphe umbellata* após 60 dias da indução.

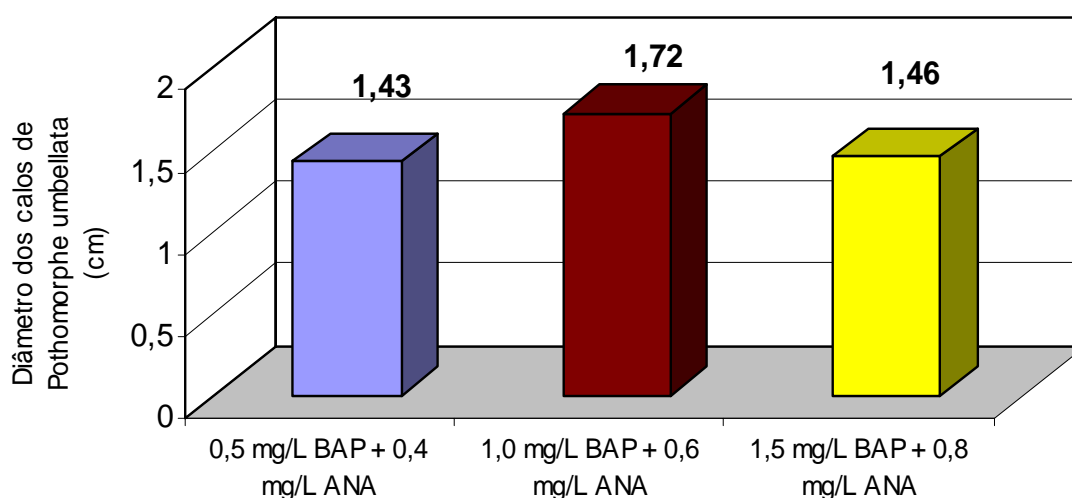
Tratamento	Plântulas
T1	1,425 b
T2	1,72 a
T3	1,463 b
CV%	9,44%

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

O melhor resultado obtido por Pereira et al. (2000) foi NAA 0,5 mg.L⁻¹, BAP 0,5 mg.L⁻¹, onde obtiveram 3,6 gemas/calos. Segundo os resultados de Pescador et al. (2000) o melhor tratamento em plântulas de *Piper hispidinervium*, foi utilizando NAA 0,8 mg.L⁻¹ em combinação com BAP 1,5 mg.L⁻¹, onde observaram uma associação na resposta morfogênica entre as concentrações mais elevadas dos reguladores, quando comparados com a testemunha. O mesmo fato não foi observado em *Pothomorphe umbellata*, cujo melhor

tratamento foi T2 (NAA 0,6 mg.L⁻¹, BAP 1,0 mg.L⁻¹), onde se encontrou o maior número de brotos por calo.

Figura 17. Diâmetro dos calos de *Pothomorphe umbellata*, após 60 dias.



5.1.4. Diferenciação das plântulas

Após a formação dos brotos, o material vegetal foi transferido para meio de alongação proposto por Pereira et al. (2000) e para meio MS.

Os resultados variaram muito dependendo do tratamento. Calos do tratamento T1 transferido para meio MS (T1 - MS), tal como foi mencionado nos resultados anteriores, apresentaram o menor número de gemas (Quadro 11), as quais foram desenvolvidas após os primeiros 60 dias da transferência para meios de diferenciação. O tratamento T1 - MS induziu em média 3,5 plântulas/calos, enquanto que na transferência para meio sugerido por Pereira (T1 - MS/4) só se obtiveram 2,6 plântulas/calos. Os tratamentos T2 -

MS e T2 - MS/4 mostraram as maiores significâncias (5 plântulas/calos e 5,33 plântulas/calos, respectivamente), em relação aos outros tratamentos (Figura 18, Quadro 11).

No tratamento T3 - MS, as plântulas se desenvolveram mais que no tratamento T3/MS/4, apesar de não ter sido observado diferença significativa entre o número de plântulas produzidas entre ambos tratamentos (3,28 plântulas/calos e 3,33 plântulas/calos, respectivamente). Cabe ressaltar que a altura média das plântulas produzidas foram iguais ou menores que 1 cm. Provavelmente, este resultado foi obtido pela ação da combinação de $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ BAP + $0,6 \text{ mg.L}^{-1}$ ANA, o qual se manteve nos resultados nos anteriores experimentos.

Quadro 11. Avaliação da produção das plântulas de *Pothomorphe umbellata* produzidas após 100 dias a indução dos calos.

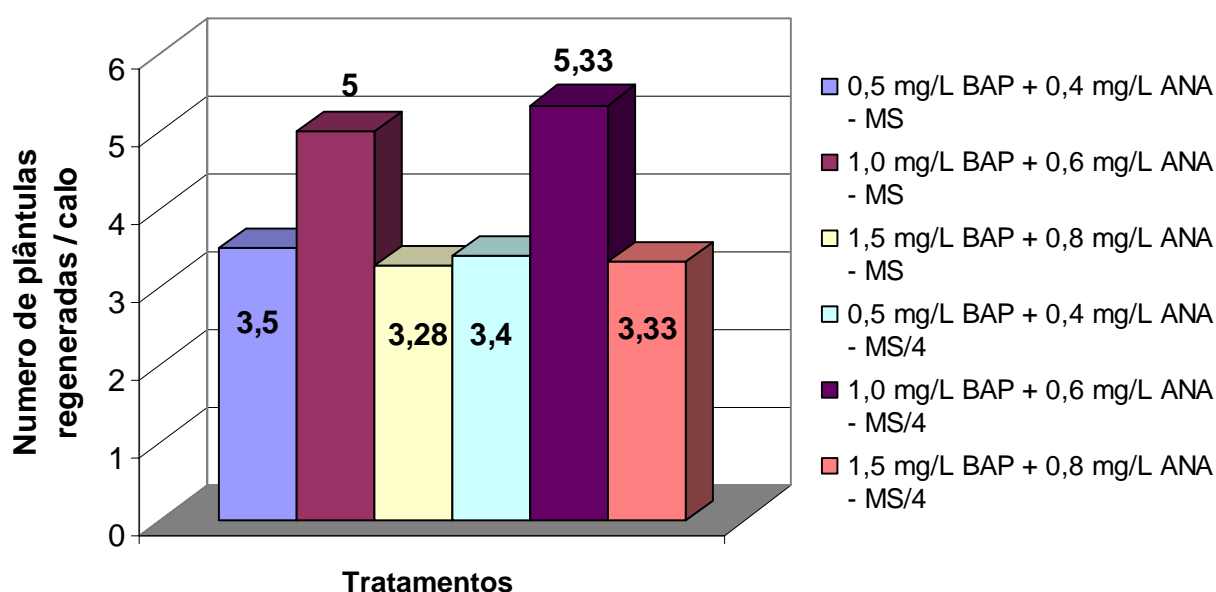
Tratamento	Plântulas
T1 - MS	3,5 b
T2 - MS	5,0 a
T3 - MS	3,28 b
T1 - MS/4	2,6 c
T2 - MS/4	5,33 a
T3 - MS/4	3,33 b
CV%	38,02 %

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

Segundo Pereira et al. (2000), a combinação do ácido giberélico (GA_3) e BAP não só promove a alongação dos brotos, como também sua iniciação.

A diminuição na quarta parte da concentração do meio MS e a concentração da sacarose em 10% utilizada foi para evitar a vitrificação dos brotos (Bonga & Adenkas, 1992).

Figura 18. Número de plântulas/calos de *Pothomorphe umbellata*, produzidas após 60 dias.



Vale lembrar que as concentrações dos reguladores vegetais podem mudar de acordo com o genótipo da planta e devem ser determinados conforme cada espécie (Borda, 2000). De modo geral, para obter maior taxa de multiplicação, as concentrações das citocininas devem ser superiores que às das auxinas. Quando ocorre o contrário, isto é as citocininas estão em concentrações inferiores às das auxinas, é comum o surgimento das raízes (Arellano & Pinto, 1993).

De acordo com Naik et al. (1999), o desenvolvimento das brotos pode não ser induzido em meio MS. Em plântulas de *Punica granatum* L. (romã), a adição de

citocininas ao meio MS foi essencial para induzir a quebra de dormência das gemas e a formação de múltiplos brotos nos explantes. O meio MS contendo 1.0 mg.L^{-1} de BAP induziu a brotação em 93% das gemas, em aproximadamente 15 dias. Porém, neste trabalho os brotos também podem ser induzidos em meio MS, e este é um fator de espécie e genótipo, tal como foi mencionado por Arello & Pinto (1993) e Borda (2000).

5.1.5. Crescimento das plântulas

As plântulas de *Pothomorphe umbellata* após serem avaliadas foram transplantadas em meio MS, para verificar seu desenvolvimento.

Tem-se demonstrado que as citocininas tem um efeito residual de uma subcultura a outra. Esse efeito é considerado positivo quando se trata de um processo de rejuvenescimento *in vitro* de espécies lenhosas pelas seguidas exposições a citocinina (Grattapaglia & Machado citado por Torres et al., 1998).

De acordo com nossos resultados, encontrou-se variação entre os valores do número e altura das plântulas/calos de *Pothomorphe umbellata*. Notou-se que o número de plântulas/calos encontradas no tratamento T2, no meio MS/4 transferidas a MS apresentaram os maiores resultados (17,25 plântulas/calos), porém a menor altura (0,70 cm).

Pode-se observar que os maiores números de plântulas foram obtidos no tratamento em meio nomeado “MS/4” obtendo-se entre 10,66 - 17,55 plântulas.

O número de nós não mostrou diferença significativa entre os tratamentos. Em relação a altura, o melhor tratamento foi encontrado para aquelas plantas obtidas em meio T1-MS/4 transferidas para MS (1,19 cm).

As plântulas dos tratamentos T2 – MS/4-MS e T3 – MS/4-MS, mostraram caules mais débeis e fracos. Plântulas desenvolvidas em meio MS - MS apresentaram melhor estado fisiológico e maior vigor, apesar de não ter sido observado o maior número de plântulas (Quadro12).

Quadro 12. Avaliação do número de plântulas/calor, número de nós e da altura em plântulas de *Pothomorphe umbellata* após 100 dias da indução.

	Número plântulas / calor	Nós	Altura
T1 - MS/MS	4,17 d	2,83 a	0,98 b
T2 - MS/MS	4,8 d	2,88 a	1,03 b
T3 - MS/MS	5 d	2,45 a	1,05 b
T1 - MS/4 - MS	10,66 c	2,93 a	1,19 a
T2 - MS/4 - MS	17,25 a	2,51 a	0,70 c
T3 - MS/4 - MS	15,83 ab	2,61 a	0,88 c

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

7.1.6. Aclimação

No primeiro dia da aclimação foram realizadas avaliações biométricas da altura da planta (da base do caule até a gema apical), número de folhas e diâmetro das plantas, as quais foram classificadas em pequenas, médias e grandes.

Além de serem poucos os trabalhos de micropropagação em espécies de *Piper nigrum*, também são poucos os mostram aclimação na família Piperaceae. Embora existam algumas informações apresentadas no trabalho de Pereira et al. (2000), onde os autores transplantaram plântulas de *P. umbellata* para caixas Styrofoam, utilizando substrato

Plantimax, com umidade de 70%; decidiu-se testar outro procedimento mais prático, mais barato e que ficasse ao alcance de pesquisadores e agricultores.

O substrato utilizado mostrou boa capacidade de retenção de umidade, permitindo boa drenagem de água e boa aeração para o sistema radicular. Deve-se ressaltar a simplicidade e praticidade do substrato utilizado, o qual foi feito com restos vegetais em 90% e esterco de aves em 10%. Além disso, foram utilizadas garrafas de refrigerante (2 L) tipo PET, o qual além de ser ecologicamente correto, diminuiu os custos.

De acordo com Grattapaglia & Machado citado por Torres et al. (1998), a etapa de transplântio é uma etapa crítica, em primeiro lugar porque a planta passa de um reduzido fluxo respiratório, devido a baixa intensidade de luz e elevada umidade relativa para um ambiente que demanda um incremento na taxa da transpiração, ficando muito susceptível ao estresse hídrico. Segundo, porque a planta passa de um existência heterotrófica, na qual dependia do suplemento da sacarose, para um estado autotrófico. Terceiro, porque a planta passa de um ambiente asséptico para outro onde o ataque de microorganismos saprofíticos e patogênicos é comum, e finalmente, porque a planta passa de uma condição de alta disponibilidade de nutrientes para outra onde precisa rapidamente incrementar a absorção de sais.

Em trabalhos preliminares, além de todos os fatores mencionados por Grattapaglia & Machado citado por Torres et al. (1998), um dos passos importantes para o sucesso da aclimação são os passos prévios ao transplântio. Antes de serem abertos os frascos contendo as plântulas, foi providenciada uma vasilha com água, onde foram colocadas todas as plântulas para evitar a desidratação, mantendo a umidade. Nesta fase, foram retirados delicadamente os restos do meio de cultura, sem prejudicar as raízes.

Foram feitos testes prévios com plântulas de *P. umbellata*, onde foram podadas as raízes, devido ao grande comprimento e por estarem muito ramificadas. Porém, após 7 dias, apenas 20% sobreviveu, o que pode ter sido provocado pela poda das extremidades das raízes, onde foram retirados os meristemas, prejudicando dessa forma o crescimento e o desenvolvimento da planta. As plântulas passaram de um estado de alta disponibilidade nutricional para uma condição autotrófica, o que teria forçado a planta apresentar um rápido alongamento e desenvolvimento das raízes, para absorver os nutrientes necessários (Grattapaglia & Machado citado por Torres et al., 1998), e se estas não pudessem se desenvolver, morreriam.

As plantas mais desenvolvidas de *Pothomorphe umbellata* apresenta raízes adventícias que vão desde a base do caule, aproximadamente, até nos últimos três entrenós. Foram estes os prováveis motivos pelas quais sobreviveu o 20% de plântulas, já que as raízes superiores não foram afetadas pela poda, e puderam se alongar em busca dos minerais do substrato.

Pelas sugestões de Grattapaglia & Machado citado por Torres et al. (1998), foram desenvolvidos outros testes prévios para determinar o grau do estresse hídrico nas plântulas de *Pothomorphe umbellata*. Para manter a umidade relativa interna, a plântula foi coberta com sacolas plásticas transparentes com buracos pequenos, para não interferir na incidência da luz. As plântulas não resistiram a brusca mudança da umidade e morreram em 10 dias.

Após estes resultados, substituiu-se a sacola plástica por um frasco transparente, o qual foi colocado individualmente em cada plântula após o transplante. Na etapa *in vitro*, os estômatos não são funcionais e respondem muito lentamente ao estresse

hídrico; a camada de cera protetora presente nas folhas é mínima ou as vezes inexistente e a conexão entre o sistema vascular do caule e as raízes adventícias ainda é precário para manter um fluxo respiratório adequado. Portanto, com este sistema manteve-se alta umidade relativa interna (Grattapaglia & Machado citado por Torres et al., 1998) e foi observado 100% de sobrevivência e grande crescimento das folhas.

Durante a aclimação, as plântulas permaneceram na casa de vegetação durante 30 dias.

A primeira avaliação foi realizada aos 30 dias após o transplântio. As plântulas classificadas como pequenas apresentaram altura menor ou igual a 2,0 cm, médias 2,1 - 4,0 cm e grandes, com altura maior que 4,1 cm. Não se observou influência da altura entre as plantas pequenas e medianas, as quais cresceram 0,55 e 0,76 cm respectivamente; porém, as plantas grandes apresentaram maior altura, com um aumento de 1,2 cm. Observou-se que a maior tamanho inicial da plântula maior foi o crescimento, o que provavelmente se deveu ao maior desenvolvimento das gemas apicais e a formação das folhas novas; por conseqüência uma maior altura. Resultados semelhantes foram observados em plantas de *Zingiber officinale* R. por Mogor, 2002.

Em relação ao número de folhas as plantas grandes também apresentaram maior número (aumento de 8 folhas/planta), provavelmente devido ao grande desenvolvimento em altura, com maior número entrenós, e aos 30 dias, cada entrenó apresentou uma folha nova, que mesmo sendo, pequena já estava bem definida (Figura 19). Entre as plantas pequenas (aumento de 3,2 folhas/planta) e médias (aumento de 3,6 folhas/planta) não se observou diferença (Quadro 13).

Quadro 13. Avaliação do número de folhas, diâmetro e da altura em plântulas de *Pothomorphe umbellata* após 30 dias da aclimação.

	Altura (cm)	Folhas (cm)	Diâmetro (cm)
Grandes (4,1 - <)	1,2	8	2,4
Médias (2,1 - 4,0)	0,76	3,2	1,1
Pequenas (2,1 - >)	0,53	3,66	1,3

Figura 19. Planta de *Pothomorphe umbellata* ressaltando o desenvolvimento das folhas por cada entrenó.



O diâmetro das folhas foi uma característica marcante entre as plantas. O desenvolvimento das folhas foi muito visível entre o início do transplântio e a avaliação. Nas plantas pequenas (1,3 cm de crescimento), médias (1,1 cm de crescimento) e grandes (2,4 cm de crescimento) observou-se a mesma característica, sendo que as plantas grandes

apresentaram maior diâmetro (Quadro 13). Pelo tamanho das folhas foi mais fácil identificar a abundância dos tricomas na superfície das folhas, nos três tratamentos. Segundo Moraes (1999), a principal estrutura secretora responsável pela produção de óleo são os tricomas, em forma de biruta e glândulas peroladas, uma vez que os idioblastos em geral estão repletos de carotenos, e estes não são voláteis (Figura 20).

5.2. Segunda etapa: Determinação de Carotenóides

5.2.1. Saponificação

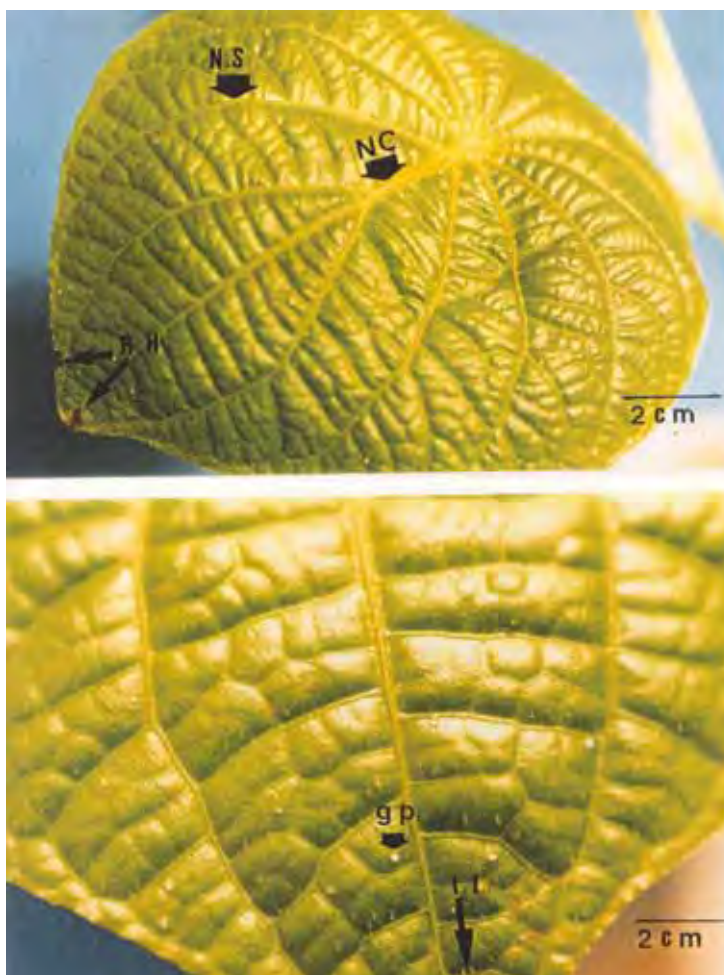
A saponificação é uma etapa importante na análise de carotenóides, porque é necessária para a remoção de lipídeos e clorofila, e para a hidrolisação dos ésteres de carotenóides que prejudicam na determinação final do teor de carotenóides (Davies, 1976).

Foram realizados testes prévios com plântulas de *P. umbellata*, analisando amostras com saponificação e sem saponificação. As amostras sem saponificação apresentaram valores inquantificáveis, mostrando uma tonalidade verde no extrato, provavelmente devido ao alto teor de clorofila, diferente ao tratamento com saponificação, cujo extrato mostrara uma cor levemente alaranjada.

A saponificação, tradicionalmente é realizada após a extração, mas parece provocar perdas de oxicarotenóides, durante o processo da lavagem do álcali (Bertoli, 1998). Além disso, quando a saponificação é feita na primeira etapa, o processo da extração passa por tantos passos e lavagens, que seria impossível que restasse algum resíduo do álcali que possa provocar perdas ou possa interferir na determinação final dos carotenóides.

Desta maneira, neste trabalho, a saponificação foi realizada anteriormente à extração.

Figura 20. Folha de *Pothomorphe umbellata* mostrando o detalhe dos tricomas tectores (t.t.), glândulas peroladas (g.p.), nervura central (n.c.) e a nervura secundária (n.s.) (Moraes, 1999).



5.2.2. Extração dos Carotenóides

Como os carotenóides são substâncias lipossolúveis, eles são extraídos com solventes orgânicos tais como hexano, acetona, éter de petróleo, etc.

Foram muitos os trabalhos que descreveram procedimentos para a extração dos carotenóides. Um dos trabalhos pioneiros foi de Zscheile & Porter (1947), que além de descreverem uma metodologia muito simples e rápida, desenvolveram uma equação baseada na matéria fresca em gramas da amostra, no fator de diluição, na absorbância, entre outros.

Um dos motivos pelos quais nossos resultados foram apresentados como $\mu\text{g/g}$ de carotenóides totais e não como $\mu\text{g/g}$ de β -caroteno, foi porque são vários os carotenóides da cadeia biosintética que são identificados a 450 nm no espectro de absorção, ou seja seria muito arriscado afirmar que só β -caroteno estaria presente, sendo que existe muita proximidade entre os carotenóides nesta faixa.

A importância da utilização do MgCO_3 na determinação dos carotenóides é seu poder neutralizante e antioxidante. Segundo Rodriguez-Amaya (1992), é recomendável analisar as amostras imediatamente após obtidas, neste caso não é necessário o uso destes antioxidantes. Porém, o armazenamento dos extratos ou frações, produz alteração nos carotenóides, os quais devem permanecer o tempo mínimo necessário em acetona, e logo devem ser transferidos para hexano ou éter de petróleo.

Segundo nossos resultados, o MgCO_3 aparentemente não alterou na determinação de carotenóides, provavelmente porque as amostras foram analisadas imediatamente após descongeladas. Um método amplamente utilizado para determinar o teor da provitamina A (carotenóides) é descrito pela AOAC, que pela sua simplicidade é muito atraente, porém tem sido muito criticado, por não ser apropriado para determinar provitamina A em alimentos, com a possível exceção das hortaliças verdes (Rodriguez-Amaya, 1992). Segundo este autor, as possíveis fontes de erro podem ser devidas sobretudo, que nesta

metodologia exige-se um volume fixo de solvente, sem tomar em conta o teor dos carotenóides, ou seja, eles propõem fazer a extração da amostra repetidas vezes até obter um extrato incolor. Além disso, o método mede a absorbância a 436 nm que não é o máximo de absorção do β -caroteno, como foi observado por Fontana et al. (2000).

Os calos de *Pothomorphe umbellata* não apresentaram tais problemas, já que o teor de carotenóides totais era baixo. Porém, nos extratos das plântulas, observou-se coloração nas primeiras extrações com acetona, foram feitas lavagens até ficar incolor. Este critério foi utilizado para tentar obter o real teor de carotenóides presentes nas plântulas.

Para melhor determinação da faixa correta da leitura dos carotenóides foi feito um espectro de absorção entre os comprimentos de 350-550 nm. As melhores absorbâncias foram encontradas entre 450-455 nm para β -caroteno (Figura 21).

Foram comparados duas formas para determinar o teor de carotenóides. A primeira foi usando a equação recomendada por Davies (1976) e Rodriguez et al. (1976), descrita em Ramos (1987), e a outra maneira foi usando a curva de calibração com o padrão de β -caroteno (Sigma, 95%. C.9750):

$$Y = 0,008765 X - 0,001821$$

Erro residual : 0,0415

Coefficiente de correlação : 0,9961

Esta técnica de extração apresentou um rendimento de 41.4% e um fator de correção de 2.415.

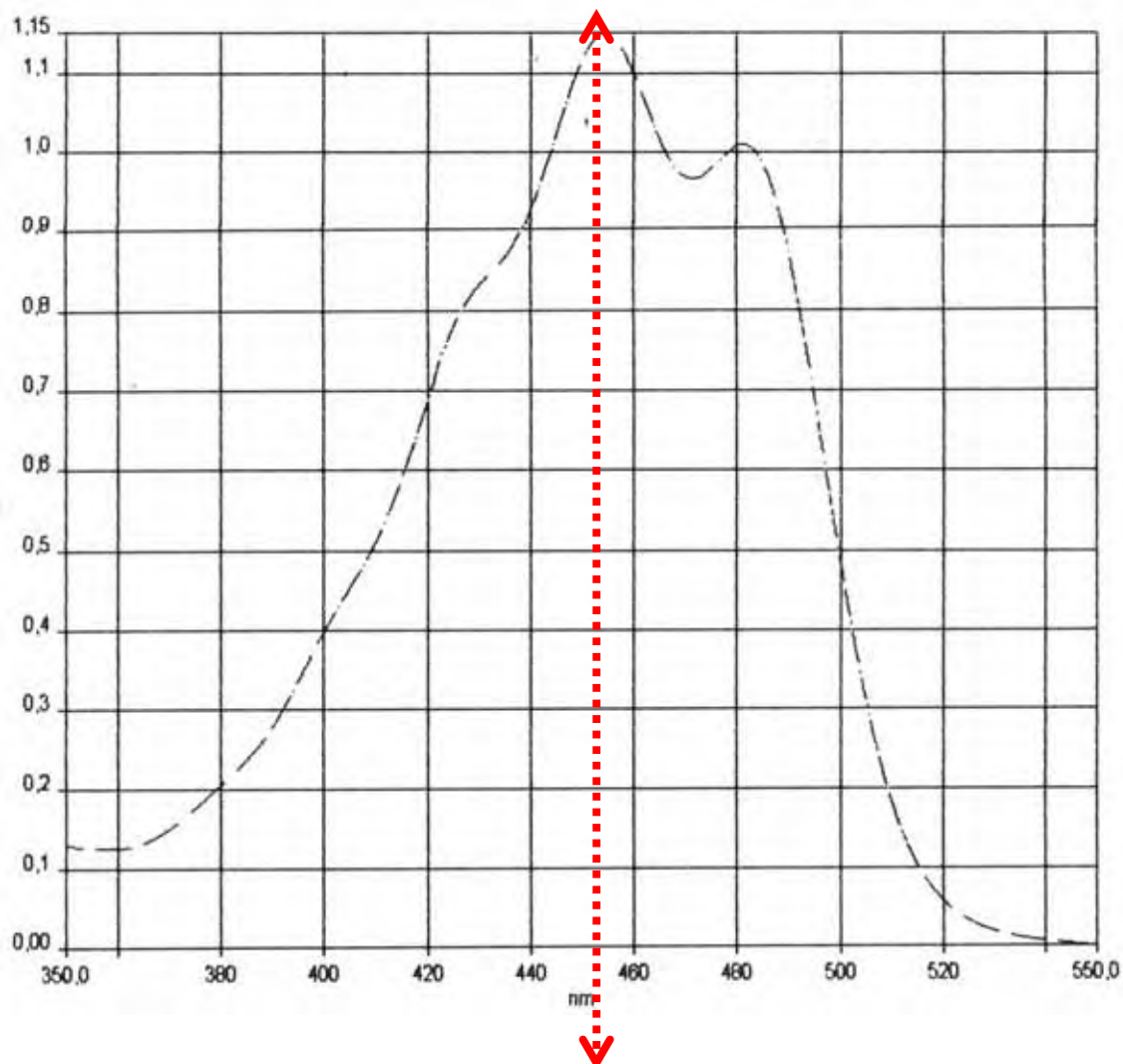
Quadro 14. Avaliação do teor de carotenóides em plântulas e calos de *Pothomorphe umbellata*.

	Plântulas	Calos
T0 (Testemunha)	65,05 a	-----
T1 - MS	22,97 b	11,95 a
T2 - MS	17,53 c	13,35 a
T3 - MS	11,69 d	14,39 a
T1 - MS/4	20,17 b	13,69 a
T2 - MS/4	22,82 b	11,95 a
T3 - MS/4	16,76 c	9,52 a
CV%	71.1%	13,99%

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

Os resultados variaram, por isso foi feita a determinação do teor dos carotenóides de espinafre (19,55 $\mu\text{g/g}$) como teste, que é um vegetal cujo teor de carotenóides já foi estabelecido por Sant'anna & Penteadó (1996). Segundo nossos resultados, o teor foi de 33,06 $\mu\text{g/g}$ carotenoides totais/g mat. fresca (equação Zscheile & Porter) e 100,435 μg carotenóides totais/g mat. fresca (equação curva de calibração). Os resultados mais próximos aos obtidos por Sant'anna & Penteadó (1996) foi a equação de Ramos (1987). Assim, resolveu-se utilizar este método de determinação.

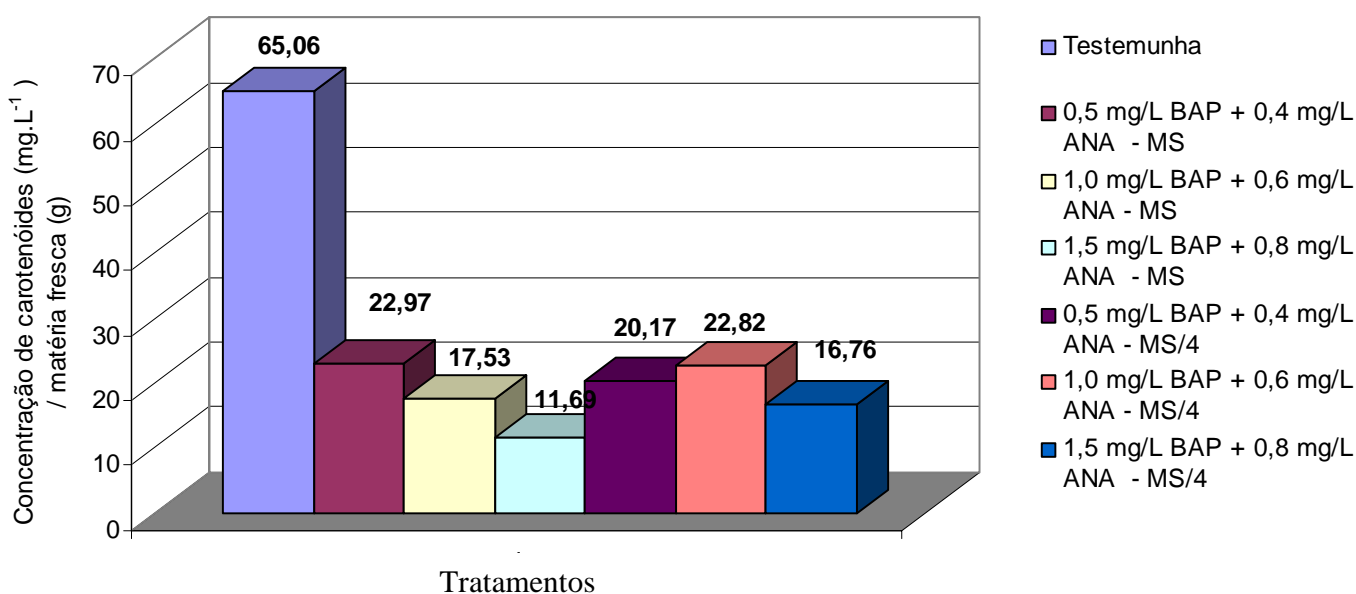
Figura 21. Espectro de absorção de β -caroteno



Os resultados dos carotenóides totais nas plântulas de *Pothomorphe umbellata* no tratamento T0 (testemunha) foi de 26,94 $\mu\text{g/g}$ de carotenóides totais/g mat. fresca. A diferença entre os tratamentos T2/MS, T2/MS, T3/MS, T1-MS/4 T2-MS/4 e T3-MS/4 não foi significativa ($p < 0,005$), sendo a testemunha aquele tratamento onde obteve-se os maiores valores. Não se tem informação se as auxinas (NAA) e/ou citocininas (BAP) ou a interação entre elas, possa diminuir a produção de pigmentos, sobretudo carotenóides, pois a

concentração dos carotenóides diminuiu consideravelmente nestes tratamentos (Figura 22, Quadro 14).

Figura 22. Teor de carotenóides totais (mg.L^{-1}) / matéria fresca (g) em plântulas de *Pothomorphe umbellata*.



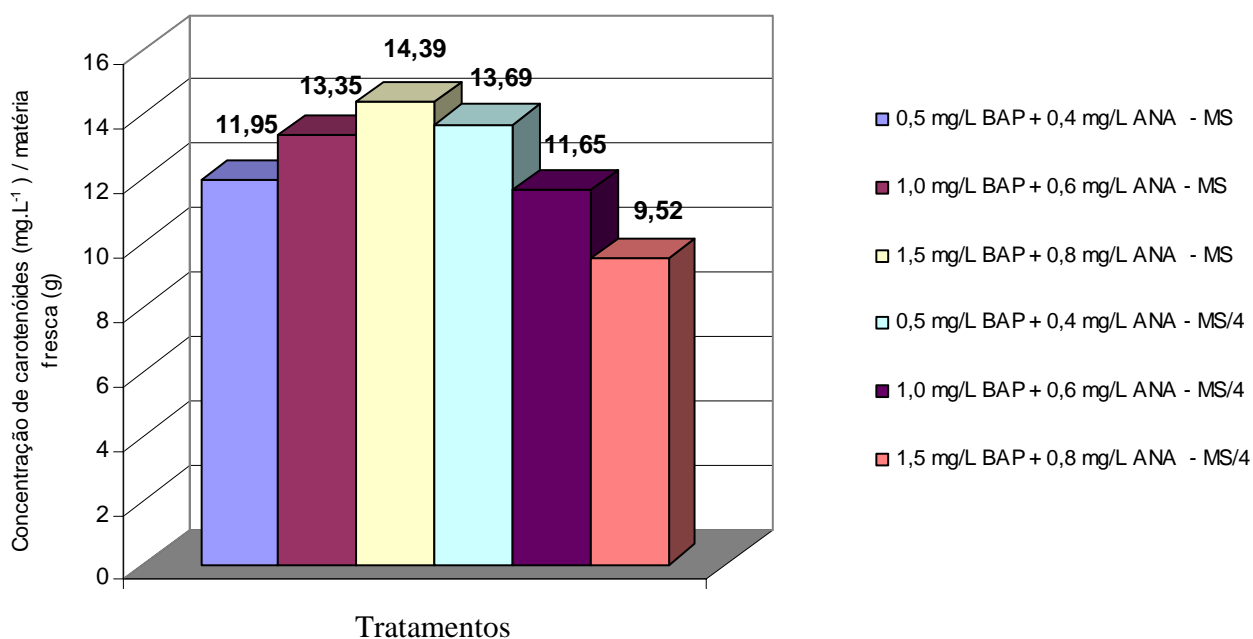
Os carotenóides totais nos calos em *Pothomorphe umbellata* não mostraram diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$) T2/MS, T3/MS, T1/MS/4. Os resultados oscilaram entre 0,9645 - 1,6397 μg de carotenóides totais/matéria fresca (Figura 23, Quadro 14).

De acordo com Salisbury & Ross (1992) em teste feitos em plântulas estioladas germinadas no escuro, foi encontrado a presença de alguns carotenóides dentro de etioplastos, que são as cavidades que contêm os carotenóides, mas não clorofila. Os autores afirmam que as plântulas estioladas têm uma coração amarela, porque não podem sintetizar a

maioria das enzimas e as proteínas estruturais requeridas para a formação do sistema tilacoidal e a maquinaria fotosintética.

Pelos resultados observados em múltiplas pesquisas, a probabilidade de se obter metabólitos secundários em calos (Ravishankar & Grewal, 1991), suspensões celulares (Scragg et al. 1990, Park et al., 1990), cultivo de raízes (Pradel et al. 1997) e brotos (Srividya et al., 1998) é muito alta, porém, segundo nossos resultados, não ocorreu este efeito; já que os calos apresentaram notadamente baixa concentração dos carotenóides.

Figura 23. Teor de carotenóides totais (mg.L^{-1}) / matéria fresca (g) em calos de *Pothomorphe umbellata*.



VI. CONCLUSÃO

- Plântulas de *Pothomorphe umbellata* desenvolvidas em meio MS ausente de reguladores vegetais apresentaram maiores teores de carotenóides quando comparados com calos.
- A desinfestação das estacas de *Pothomorphe umbellata* não produziram resultados positivos, devido à contaminação. A melhor desinfestação das sementes foi obtida com 20% de hipoclorito comercial por 15 minutos.
- Plântulas de *Pothomorphe umbellata* germinadas a 16h dia/ 8h escuro apresentaram maior tamanho e coloração verde intensa nas folhas.
- A produção de calos de *Pothomorphe umbellata* foi estimulada com o uso de NAA e BAP, e a combinação de $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ BAP e $0,6 \text{ mg.L}^{-1}$, produziu o maior número de plântulas, porém com menor altura.

VII. NECESSIDADES DE PESQUISA

- Comparar o teor de carotenóides nos calos de *Pothomorphe umbellata* produzidos a partir diferentes partes da plântula (folhas, caule, raiz).
- Fazer estudos anatômicos, tais como cortes histológicos, para determinar se acontece organogênese ou embriogênese na formação de calos.
- Avaliar o teor de carotenóides em suspensões celulares de *Pothomorphe umbellata*.
- Determinar carotenóides através da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

VIII. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

AOAC. OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF THE ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. 1990. p.1048.

AOAC. OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF THE ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. 1995, chapter 34, p.1.

ARELLO, E., PINTO, J. Propagação *in vitro* de *Kulmeyera coriacea* I. Efeito das diversas concentrações combinadas de BAP e NAA na multiplicação de brotos. *Pesq. Agrop. Bras.*, v.28, p.25-31, 1992.

ARMSTRONG, G.A. Genetics of eubacterial carotenoid biosynthesis: a colorful tale.

Annual. Rev. Microbiol, v.51, p.629-659, 1997.

ARMSTRONG, G.A., HEARST, J.E. Genetics and molecular biology of carotenoids pigment

biosynthesis . *FASEB J*, v.10, p.228-237, 1996.

BARANYAI, M., MATUS, Z., SZABOLCS, J. Determination by HPLC, of carotenoids in

paprika products. *Acta Alimentaria*, v.11, p.309-323, 1990.

BARROS, S., TEIXEIRA, D., AZNAR, A., MOREIRA JR. J., ISHU, I., FREITAS, P.

Antioxidant activity of ethanolic extract of *Pothomorphe umbellata* L. Miq. (pariparoba).

Ciencia e Cultura Journal of the Brazilian Association for the Advanced of Science, v.48,

n.1/2, p.114-116, 1996.

BARROSO, G. *Sistemática de Angiospermae do Brasil*. São Paulo: EPU/USP, 1988. 45p.

BARTLEY, G., SCOLNIX, P. Plant Carotenoids: Pigments for photoprotection, visual

attraction, and human health.. *The Plant Cell*, v.7, p.1027-1038, 1995.

BERG, M. *Plantas Medicinais na Amazônia: Contribuição ao seu Conhecimento Sistemático*.

Belém-Pará: CNPq/PTU., 1982, 126 p.

- BERTOLI, R. Carotenóides e atividade pro-vitamínica A em condimentos e alterações de dois tipos de cozimento. São Paulo, 1998. 73p. Dissertação. (Mestrado - Ciências Farmacêuticas/Ciências de Alimentos, Bromatologia). Universidade de São Paulo.
- BONGA, J., ADENKAS, P. Clonal Propagation. In: BONGA, J., ADENKAS, P. (eds) *In vitro Cultures of trees*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1992. p.107-108.
- BORDA, CH. Efecto de inductores de tuberización y fotoperiodo sobre la microtuberización de *Solanum tuberosum* L. *in vitro*. Lima, 2000. 44p. Dissertação Licenciatura em Biología. Universidad Federico Villarreal.
- BRITTON, G. General carotenoids methods. *Methods Enzymol.* p.113-149. 1985.
- BUCHANAN, B., GRUISSEM, W., JONES, R. (Eds). *Biochemistry & Molecular of Plants*. Oklahoma: John Wiley & Sons, 2002, 1200p.
- CAPÓ, Y. Contaminación microbiana en el cultivo *in vitro* de plantas. In: CAPÓ, Y., KOSKY, R., GONZÁLES, E., PÉREZ, P. (Eds) *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología*. Santa Clara: s.n., 1998. p.80-102.
- CATÁLOGO DUCHEFA, Biochemicals Plant Cell and Tissue Culture, 1996.

CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA La Papa En Cifras. Produccion, Uso, Consumo y Comercialización. 1995.

CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA. La Papa En Cifras. Produccion, Uso, Consumo y Comercialización, 1998.

CHEN, T., CHEN, B. Separation of carotenoids by High-Performance Liquid Chromatographic with polimeric and monomeric octadecylsilica stationary phases. *Chromatographia*, v.39, p.346-354. 1994.

CRAFT, N., WISE, S., SOARES J. JR. Optimization of na Isocratic High Performance Liquid Chromatographic separation of carotenoids. *J. Chromatogr.* p.171-176. 1992.

CRONQUIST, A. *The Evolution and Classification of Flowering Plants*. New York: Houghton – Mifflin, 1968. 396 p.

DAVIES, B.H. *Carotenoids*. In: GOODWIN, T.W. Chemistry and Biochemistry of plant pigments. London: Academic, Press, 1976. v.2. p.38-165.

DEUEL, H. Jr., SUMMER, E., JOHNSTON, C., POLGAR, A, ZECHEMEISTER, L. Stereochemical configuration and provitamin A activity. III. All-trans- β -caroteno and neo- β -caroteno U. In: FLORES, C., PENTEADO, M. Carotenóides com atividade pró-

vitamínica A em cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) do Estado de São Paulo. *Rev. Farm Bioquim. Univ. S. Paulo*, v.28, n.1, p.51-60, 1992.

DI STASI, L. Conceitos Básicos na Pesquisa de Plantas Mediciniais. In: _____. *Plantas Mediciniais: Arte e Ciência. Um guia de estudo interdisciplinar*. São Paulo: UNESP, 1995. p.23-8.

DI STASI, L., SANTOS, E., SANTOS, C., HIRUMA, C. *Plantas Mediciniais na Amazônia*. São Paulo: UNESP., 1989. 120 p.

DUGAS, T., MOREL, D., HARRISON, E. Dietary supplementation with beta-caroteno, but not with lycopene, inhibits endothelial cell-mediated oxidation of low-density lipoprotein. *Free Radical Biology and Medicine*, v.26, n.9/10, p.1238-44, 1999.

EHRINGHAUS, C. *Piper spp. Piperaceae in an indigenous Kaxinawá Community*. Acre, 1996. 133p. Dissertação (Diplomarbeit) Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaft. Universität Bayreuth – RFA. In: MORAES, M. DE. Caracterização Morfo – Anatômica e Fitoquímica da Caápeba do norte *Pothomorphe peltata* (L.) MIQ. – Piperaceae. Botucatu, 1999. 128p. Dissertação. (Doutorado - Ciências Biológicas/Botânica). Universidade Estadual Paulista.

FARMACOPEIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL. 2da edição. São Paulo. 1959, p. 449,660.

- FONTANA, J., MENDES, S., PERSIKE, D., PERACETTA, L., PASSOS, M. Carotenóides. Cores Atraentes e Ação Biológica. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*. n.13. p.40-53. 2000.
- FOUQUE, A. Les Plantes Médicinales présentes en Forêt Guyanaise. *Fruits*, v.35, n.12, p.759-768, 1980.
- GEORGE, E., SHERRINGTON, P. *Plant Propagation by tissue culture*. Eversley: Exegenetics Ltd., 1984. 709p.
- GEORGE, E. F. *Plant Propagation by tissue culture. The technology*. Edington: Exegenetics Ltd., 1993. 574p.
- GIACOMETTI, D. Impacto atual da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A. CALDAS, L. (Eds). *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 1990, p.18-25.
- GILES, K., FRIESEN, K. *Micropropagation*. s.l. : CRD Press. 1994. p. 111-128.
- GOTTLIEB, O., KOKETSU, M., MAGALHÃES, M., MAIA, J., MENDES, P., DA ROCHA, A., DA SILVA, M., WILBERT, V. Essential oils from the Amazon VII. *Acta Amazonica* 11:1. p.143-148, 1981.

GRATTAPAGLIA, D., MACHADO, M. Micropropagação. In: TORRES, A., CALDAS, L., BUSO, J. *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. v.I. Brasília: CBAB, 1998. p.183-260.

HENRIQUES, N. M., NAVALHO, J.C., VARELA, J.C., CANCELA, M.L. *Dunaliella*: uma fonte natural de beta-caroteno com potencialidades de aproveitamento biotecnológico. *Boletim de Biotecnologia* n°61 , p.12-18, 1998,

HOENE, F. O que vende os herbários da cidade de São Paulo. In: MORAES, M. DE. Caracterização Morfo – Anatômica e Fitoquímica da Caápeba do norte *Pothomorphe peltata* (L.) MIQ. – Piperaceae. Botucatu, 1999. 128p. Dissertação. (Doutorado - Ciências Biológicas/Botânica). Universidade Estadual Paulista.

HU, C. Y., WANG, P. G. Meristem, shoot tips and bud cultures. In: EVANS, D. A, SHARP, W.R., AMMIRATO, P. V., YAMADA, J. *Handbook of plant cell culture*. v.I. New York: Macmillan Publ., 1983. p.177-227.

KHACHIK, F., BEECHER, G., WHITTAKER, N. Separation, identification and quantification of the major carotenoids and chlorophyll constituents in extracts of several green vegetables by liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, v.34, n.4, p.603-616. 1986.

KIMURA, M., RODRIGUEZ-AMAYA, D., GODOY, H. Assessment of the saponification step in the quantitative determination of carotenoids and provitamins. *A. Food Chem.*, 35:187-195, 1990.

LABORATÓRIO OSÓRIO DE MORAES. Elixir de Capeba Composto KLYDONT.

LE CONDE, P. A Amazônia Brasileira III. In:____. *Arvores e Plantas Úteis*. Belém:: Clássica, 1934. 130 p.

LIAAEN-JENSEN, S. Isolation, reaction. In: ISLER, B. O. *Carotenoids*. Basel, Switzerland: Berkhauser Verlag, 1971, p.61-188.

LUZ, A., SILVA, J., ZOGHBI, M., ANDRADE, E., SILVA, M., MALA, J. Volatile Constituents of Brazilian Piperaceae, Part 5. The Oils of *Pothomorphe umbellata* and *P. peltata*. *J. Essent. Oil Res.*, v.11, p.479-481, 1999.

LUZ, J.M., PASQUAL, M., SOUZA, R. J. Cultura de Tecidos e biotecnologia em mandiquinha.-salsa. *Inf. Agropec.*, v.19, p.18-21, 1997.

MANTELL, S.H., MATTHEWS, J. A, MCKEE, R.A. Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução na engenharia genética em plantas. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1994, p.101-181.

- MARTINEZ, A.M. Carotenóides. Universidad de Antioquía. Facultad de Química Farmacéutica. Medellín. Agosto, 2001, p.9.
- MATSUBARA, K., SHIGEKAZU, K., YOSHIKA, T. MORIMOTA, T., FUJITA, Y., YAMADA, Y. High density culture of *Coptis japonica* cell increase berberine production. *J. Chem. Tech. Biotech*, v.46, p.61-69, 1989.
- MINAZZI-RODRIGUES, R., PENTEADO, M.C. Carotenóides com atividade pró-vitamínica A em hortaliças folhosas. *Rev. Farm. Bioquim. Univ. S. Paulo*, v.25, n.1, p.39-53, 1989.
- MING, L., GAUDENCIO, P., PADILHA, V. *Plantas Mediciniais: Uso Popular na Extrativista Chico Mendes - Acre*. Botucatu: UNESP, 1997. 54p.
- MINGUEZ-MOSQUERA, M., PEREZ-GALVEZ, A Color quality in paprika oleoresin. *J. Agric. Food. Chem.* v.46 p.5124-27, 1998.
- MOGOR, G. *Micropropagação “in vitro” de Zingiber officinale Roscoe (gingibre) e Xanthosoma sagittifolium (L.) Schott (Taioba)*. Botucatu 2002. 73p. Tese (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.
- MORAES, M. DE. Caracterização Farmacognóstica da Droga e do Extrato Fluido de *Pothomorphe umbellata* L. (Miq). São Paulo, 1983. 112p. Dissertação. (Mestrado - Ciências Farmacêuticas/Controle de Qualidade de Drogas e Medicamentos). Universidade de São Paulo.

MORAES, M. DE, GLOMBITZA, K-W., OLIVEIRA, F. *Isolamento do Caroteno Prolycopeno das folhas de Pothomorphe umbellata (l.) Miq.- Piperaceae.* In: RESUMOS XLV CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA. São Leopoldo - R.S. p.187, 1994.

MORAES, M. DE. *Isolamento de Prolycopeno das folhas de Pothomorphe peltata (l.) Miq.- Piperaceae.* In: RESUMOS XIV SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL. Florianópolis - SC. p.187, 1996.

MORAES, M. DE. Caracterização Morfo – Anatômica e Fitoquímica da Caápeba do norte *Pothomorphe peltata (L.) MIQ. – Piperaceae.* Botucatu, 1999. 128p. Dissertação. (Doutorado - Ciências Biológicas/Botânica). Universidade Estadual Paulista.

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue culture. *Annual Review of Plant Physiology.* v.25, p.135-166, 1974.

MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* v.15, p.473-497, 1962

NAIK, S., PATTNAIK, S.; CHAD, P. *In vitro* propagation of promegranate (*Punica granatum* L. cv. Ganesh) through axillary shoot proliferation from nodal segments of mature tree. *Sci. Hortic.* v.79, p.175-183, 1999.

NICOLOSO, F., ERIG, A, MARTINS, C., RUSSOWSKI, D. Micropropagação do Ginseng Brasileiro (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen). *Rev. Bras. Pl. Med*, v.3, n.2, p.11-18, 2001.

OLIVEIRA, E.D. DE., SANTO, A.C., WILSON, E.D. Vitaminas Lipossolúveis. In: _____. *Nutrição Básica*. São Paulo: Sarvier, 1989. p.157-168.

OLIVEIRA, F., AKISUE, G. Farmacobotânica: Curso de identificação de drogas vegetais. São Paulo, FCF - USP s/ed. v.1 p.4-5. 1982.

OLIVIER, J., PALOU, A. Chromatographic determination of carotenoids in foods. *Journal of Chromatography A*, v.881, p.543-555, 2000.

PARK J., GILES, K., SONGSTAD, D. Industrial production of Sanguinarine from the cell suspension culture of *Pavonia somniferum*. *Proc. APBiotechnology*. pp184-187, 1990.

PECKOLT, T. H., PECKOLT, G. Historia das plantas medicinais e úteis do Brasil. In: MORAES, M. DE. Caracterização Farmacognóstica da Droga e do Extrato Fluido de *Pothomorphe umbellata* L. (Miq). São Paulo, 1983. 112p. Dissertação. (Mestrado - Ciências Farmacêuticas/Controle de Qualidade de Drogas e Medicamentos). Universidade de São Paulo.

PEREIRA, A.M., BERTONI, B.W., APPEZZATO-DA-GLORIA, B., ARAUJO, A.R., JANUÁRIO, A.H., LOURENÇO, M. V., FRANÇA, S.C. Micropropagation of

- Pothomorphe umbellata* via direct organogenesis from leaf explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.60, p.47-53, 2000.
- PESCADOR, R., ARAUJO, P.S., MAAS, C.H., REBELO, R.A., GIOTTO, C.R., WENDSBAUSEN, R. Jr., LARGURA, G., TAVARES, L.B.B. Biotecnologia da *Piper hispidinervium* – Pimenta Longa. *Biotecnología Ciência & Desenvolvimento*, n.15. p.18-23. 2000
- PHILLIPSON, V. A matter of some sensitivity. *Phytochemistry*, v.38, n.6, p.1319-1343, 1995.
- PRADEL, H.; DUMKELEHMANN, U.; LUCKNER, M. Hairy root cultures of *Digitalis lanata*. Secondary metabolism and plant regeneration. *J. Plant Physiol.* v.151, p. 209-215. 1997.
- RAMOS, M. Desidratação do Piqui (*Caryocar brasiliense*, Camb). Avaliação do processo através dos teores de carotenóides totais. São Paulo, 1987. 120p. Dissertação. (Mestrado - Ciências Farmacêuticas/Tecnologia de Alimentos). Universidade de São Paulo.
- RATHORE, T., DEORA, N., SHEKHAWAT, N. Cloning of *Maytenus emarginata* (Willd) Ding Hou – a tree of the Indian Desert, through tissue culture. *Plant Cell Reports.* v.11, p.449-451, 1992.

RAVISHANCAR, G.; GREWEL, S. Development of media for growth of *Dioscorea deltoidea* cells and *in vitro diiogenin* production: influence of media constituents and nutrient stress. *Biotechnology Letf.* v.13, n.2, p.125-130, 1991.

RIEDEL, O . Subsídios para o estudo farmacognóstico de *Heckeria umbellata* (L.) Kunth. Curitiba, *Trib. Farmac*, v.9, n.12, p.269-283, 1941.

ROCK, C., FADA, R., JACOB. R., BOWEN, P. Update on the biological characteristics of the antioxidants micronutrients: vitamin C, vitamin E and the carotenoids. *J. Am. Diet. Assoc*, v.96, n.7, p.693-702, 1996.

RODRIGUEZ, D., RAYMUNDO, L., LEE, T., SIMPSON, K., CHISCHESTER, C. Carotenoid pigments changes in ripening *Momordica charantia* fruits. *Ann. Bot*, v.40, p.615-624., 1976.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Os carotenóides como precursores de vitamina A . *Bol. Soc. Bras. Ciên. Technol. Aliment*, v.19, n.4, p.227-42, 1985.

SALISBURY, F., ROSS, C. *Plant Physiology*. 4ta Edición. México:Grupo Editorial Iberoamericana. S.A. 1992. 682.p.

SANT'ANNA, Z. DE, PENTEADO, M. Alterações dos carotenóides decorrente do cozimento convencional e em forno microondas de três hortaliças. *Rev. Farm. Bioquim. Univ. S. Paulo.* v.32, n.1, p.52-58, 1996.

SARALEGUI, H. Revisión del género *Pothomorphe* Miq. (Piperaceae) en Cuba. *Revista del Jardín Botánico Nacional*, v.19, p.41-44, 1998.

SCRAGG, A., ASHTON, S., YORK, A., BOND, P., STEPAN-SARKISSIAN, G., GREY, D. Grow of *Catharanthus roseus* suspension for maximum biomass and alkaloid accumulation. *Enzyme Microb. Technol.* v.12, p.192-198, 1990.

SOUZA, C. C. *Influência de poliaminas no desenvolvimento de plantas de inhame (Dioscorea alata L.) cultivadas in vitro*. Botucatu 2002. 84p. Tese (Mestrado em Botânica) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.

SRIVIDYA, N., SRIDEVI, B., SATYANARAYANA, P. Azadirachtin and nimbin content in *in vitro* cultured shoots and roots of *Azadirachta indica* A. Juss. *Ind. J. Plant Physiol*, v.3, n.2, p.129-134, 1998.

STRASBURGER, E., NOLL, F., SCHIMPER, A. *Tratado de Botánica*. Espanha: Marin, 1968. 552 p.

TAGLIACOZZO, G.M.D. Fitormônios e seus efeitos biológicos *in vitro* e *in vivo*. In: TOMBOLATO, A.F., COSTA, A.M.M. (Coords). Micropropagação de plantas ornamentais. *Bol. Téc. Instit. Agron.* Campinas, n.174, p.1-72, 1998.

TEXEIRA, J. Embriogênese Somática. Brasília: Embrapa – Cenargem, 1994. 7p.

VARIYAR, P., BANDYOPADHYAY, T. On the carotenoids of ripened pepper berries *Piper nigrum* L. *J. Food Sci. Technol.*, v.27, n.5, p.294-295, 1990.

WITHERS, L., WILLIAMS, J. Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas. v.I. In: TORRES, A., CALDAS, L., BUSO, J. *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. Brasília: CBAB, 1998. p. 297-330.

YAMANO, S., ISHII, T., NAKAGAWA, M., IKENAGA, H., MISAWA, N. Metabolic engineering for production of beta-carotene and lycopene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, v.58, p.1112-1114, 1994.

ZSCHEILE, F.P., PORTER, J.W. Analytical Methods for carotenes of *Lycopersicum* Species and Strains. *Analytical Chemistry*, v.19, n.1, p.47-51, 1947.

WEB: <http://www.cotianet.com.br/eco/HERB/capeba.htm>, agosto 2002.

WEB: <http://www.gqc.com.br/iqc/hipoclorito.htm>, julho 2002.