



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**ROSANA SILVA CORPES**

**Produção e avaliação da atividade antioxidante de metabólitos secundários  
de *Piper divaricatum* G. Meyer sob diferentes condições de cultivo**

**BELÉM-PA  
2015**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**ROSANA SILVA CORPES**

**Produção e avaliação da atividade antioxidante de metabólitos secundários  
de *Piper divaricatum* G. Meyer sob diferentes condições de cultivo**

Dissertação de Mestrado apresentada  
ao Programa de Pós-Graduação em  
Biotecnologia, como parte das  
exigências para a obtenção do grau de  
Mestre em Biotecnologia, sob a  
orientação da professora Dra. Joyce  
Kelly do Rosário da Silva

Bolsista:



BELÉM-PA  
2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFPA

---

Corpes, Rosana Silva, 1987-  
Produção e avaliação da atividade antioxidante de  
metabólitos secundários de *Piper divaricatum* G. Meyer sob diferentes  
condições de cultivo / Rosana Silva Corpes. - 2015.

Orientadora: Joyce Kelly do Rosário da Silva.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará  
Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em  
Biotecnologia, Belém, 2015.

1. Piperaceae. 2. Antioxidantes. 3. Metabólitos. 4. Essências e óleos  
essenciais. 5. Piperaceae Cultivo. I. Título.  
CDD 22. ed. 583.25

**Produção e avaliação da atividade antioxidante de metabólitos secundários  
de *Piper divaricatum* G. Meyer sob diferentes condições de cultivo**

**ROSANA SILVA CORPES**

**BANCA EXAMINADORA:**

---

**Profª Dra. Joyce Kelly do Rosário da Silva**  
Orientadora (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - UFPA)

---

**Pesq. Dra. Ilmarina Campos de Menezes**  
Membro (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA)

---

**Prof. Dr. Alberdan Silva Santos**  
Membro (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - UFPA)

---

**Profª Dra. Luciana Pereira Xavier**  
Membro (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - UFPA)

“Se pensarmos pequeno, coisas pequenas teremos. Mas se desejarmos fortemente o melhor e principalmente lutarmos pelo melhor, o melhor irá se instalar em nossa vida.”

Carlos Drummond de Andrade

A minha mãe Alda Corpes e ao meu pai Manoel Corpes por estarem sempre ao meu lado e me fornecerem todo apoio necessário durante minha formação.

Aos meus irmãos pelo apoio e companheirismo, inclusive nos momentos difíceis.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado força e sabedoria para superar momentos muito difíceis nesta trajetória estudantil. .

As minhas irmãs Rosiane Corpes, Rosiene Corpes, Rosilene Corpes e Roseni Corpes pelo carinho e companheirismo.

Aos meus irmãos Messias Corpes, Emanuel Corpes, Raimundo Corpes e Rivelino Corpes pelo incentivo e proteção.

Aos meus sobrinhos Jefferson Thalyson Corpes e Joyce Thamyres Corpes pelo carinho e incentivo.

A CAPES pela bolsa concedida e ao CNPq pelo suporte financeiro.

A professora Dra Joyce Kelly do R. da Silva pela orientação e por todas as suas contribuições para o desenvolvimento deste trabalho.

A Dra. Ilmarina Campos de Menezes pelo companheirismo, amizade e valiosa orientação na etapa de estabelecimento do cultivo *in vitro*, desenvolvida na EMBRAPA.

A professora Dra Eloísa Andrade pelo auxílio nas análises para identificação dos compostos voláteis realizadas no Museu Paraense Emílio Goeldi.

A professora Dra. Alessandra Ramos da Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará por suas sugestões e contribuições no decorrer deste trabalho.

A todos os meus amigos e colegas da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), em especial ao Orlando Rodrigues Junior, Jéssica Costa, Dávia Leite e Nayara Gondim pelo incentivo e credibilidade em meu potencial de trabalho.

A todos os meus amigos e colegas do Laboratório de Engenharia de Produtos Naturais (LEPRON), da Universidade Federal do Pará, em especial a Lidiene Monteiro, Erisléia Meireles, Joyce Solange Oliveira e Shirley da Luz pelo auxílio e contribuição nas etapas experimentais.

Ao Sr. Ferdinando Nascimento e Rafaela Pinheiro pelo apoio técnico, companheirismo e simpatia, tornando a rotina de laboratório muito agradável.

A todas as pessoas que colaboraram de maneira direta ou indireta para realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

RESUMO

1-INTRODUÇÃO.....	15
2-OBJETIVOS.....	17
2.1 Objetivos Gerais.....	17
2.2 Objetivos Específicos.....	17
3-REVISÃO DA LITERATURA.....	18
3.1 Cultivo <i>in vitro</i> de espécies de <i>Piper</i> .....	18
3.2.1 Produção de metabólitos em plantas.....	18
3.2.2 Espécies de <i>Piper</i> ricas em fenilpropanóides cultivadas <i>in vitro</i> .....	19
3.3 A Espécie <i>Piper divaricatum</i> G. Meyer.....	21
3.4 Micropropagação .....	23
3.5 Desinfestação <i>in vitro</i> de explantes.....	25
3. 5.2 Adição de antibióticos.....	26
3. 5.3 Adição de reguladores de crescimento.....	27
4-MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1 Coleta de material Vegetal. ....	29
4.1.2 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>P. divaricatum</i> a partir de ápices caulinares .....	29
4.1.3 Cultivo <i>in vivo</i> de <i>Piper divaricatum</i> a partir de microestacas.....	30
4.1.4 Monitoramento da Produção dos Metabolitos Secundários.....	31
4.1.5 Extração dos compostos voláteis.....	32
4.1.6 Análise da composição química dos óleos essenciais.....	32
4.1.7 Preparação dos extratos.....	32
4.1.8 Determinação do índice de fenólicos totais.....	33

4.1.9 Determinação da atividade antioxidante.....	34
5-RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5.1 Cultivo <i>in vitro</i> .....	35
5.2 Produção dos compostos voláteis de <i>P. divaricatum</i> no cultivo <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .....	39
5.3 Determinação de fenólicos totais e atividade antioxidante.....	45
5.4 Cultivo <i>in vivo</i> .....	48
6-CONCLUSÕES.....	49
REFERÊNCIAS.....	50

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b>	Compostos majoritários identificados nos tecidos de <i>P. cernuum</i> e <i>P. crassinervium</i> cultivadas <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .	20
<b>FIGURA 2</b>	Espécie <i>P. divaricatum</i> G. Meyer cultivada no Bosque Camilo Viana, UFPA	21
<b>FIGURA 3</b>	Estruturas das principais substâncias identificadas em <i>P. divaricatum</i>	22
<b>FIGURA 4</b>	Estrutura dos principais reguladores de crescimento utilizados no cultivo <i>in vitro</i> de tecidos vegetais	28
<b>FIGURA 5</b>	Calo de <i>P. divaricatum</i> da UFPA cultivado em meio ½ MS + ANA 0,5 mg.mL <sup>-1</sup> .	38
<b>FIGURA 6</b>	Ápices caulinares de <i>P. divaricatum</i> oriundos de micro estacas cultivadas em casa de vegetação. (A) e (B) Cultivo em meio MS + rifampicina (100 mg.mL <sup>-1</sup> ); (C) Cultivo em meio MS + BAP 0,5 mg.mL <sup>-1</sup> .	38
<b>FIGURA 7</b>	Produção dos fenilpropanóides nas folhas dos espécimes de <i>P. divaricatum</i> durante o cultivo <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> . (A) PDI, (B) PDII.	39
<b>FIGURA 8</b>	Variação do TCF nas amostras de <i>P. divaricatum</i> cultivadas <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> aos 30, 60 e 90 dias de crescimento.(A) Folhas do espécime PDI, (B) Folhas do espécime PDII, (C) Raízes do espécime PDI, (D) Raízes do espécime PDII.	45
<b>FIGURA 9</b>	Variação da atividade antioxidante das amostras de <i>P. divaricatum</i> cultivadas <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> aos 30, 60 e 90 dias de crescimento. (A) Folhas do espécime PDI, (B) Folhas do espécime PDII, (C) Raízes do espécime PDI, (D) Raízes do espécime PDII.	46
<b>FIGURA 10</b>	Segmentos nodais de <i>Piper divaricatum</i> UFPA e EMBRAPA com enraizamento aos 30, 60 e 90 dias no substrato vermiculita.	48

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b>	Tratamentos mostrando a concentração do meio de cultura, reguladores de crescimento e antibióticos utilizados no cultivo <i>in vitro</i> de <i>P.divaricatum</i>	30
<b>TABELA 2</b>	Amostras obtidas a partir do cultivo <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> dos espécimes I e II de <i>P. divaricatum</i> nos diferentes períodos de crescimento	31
<b>TABELA 3</b>	Valores médios do crescimento dos ápices caulinares de <i>P. divaricatum</i> em função do meio de cultivo e reguladores de crescimento	37
<b>TABELA 4</b>	Compostos voláteis produzidos nas folhas no período de 30 a 90 dias no cultivo <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> para o espécime PDI	41
<b>TABELA 5</b>	Compostos voláteis produzidos nas folhas no período de 30 a 90 dias no cultivo <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> para o espécime PDII	42
<b>TABELA 6</b>	Compostos voláteis produzidos nas raízes no período de 30 a 90 dias no cultivo <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> para o espécime PDI.	43
<b>TABELA 7</b>	Compostos voláteis produzidos nas raízes no período de 30 a 90 dias no cultivo <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> para o espécime PDII.	44

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANA	Ácido Naftaleno Acético
AIB	Ácido Indolilbutírico
AIA	Ácido 1 H-indol-3-acético
BAP	Benzilaminopurina
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
DPPH	1,1-difenil-2-picrildrazila
2,4 D	2,4 –Diclorofenoxiacético
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
GA3	Ácido Giberélico
IR	Índice de Retenção
ITEC	Instituto de Tecnologia
LEPRON	Laboratório de Engenharia de Produtos Naturais
MS	Meio Murashige e Skoog
½ MS	Meio Murashige e Skoog com a metade da concentração de sais
PDI	<i>P. divaricatum</i> coletado na UFPA
PDI	<i>P. divaricatum</i> coletado na EMBRAPA
PDI <sup>F</sup>	<i>P. divaricatum</i> coletado na UFPA folhas cultivadas <i>in vivo</i>
PDI <sup>F</sup> *	<i>P. divaricatum</i> coletado na UFPA folhas cultivadas <i>in vitro</i>
PDI <sup>R</sup>	<i>P. divaricatum</i> coletado na UFPA raízes cultivadas <i>in vivo</i>
PDI <sup>R</sup> *	<i>P. divaricatum</i> coletado na UFPA raízes cultivadas <i>in vitro</i>
PDI <sup>IF</sup>	<i>P. divaricatum</i> coletado na EMBRAPA folhas cultivadas <i>in vivo</i>
PDI <sup>IF</sup> *	<i>P. divaricatum</i> coletado na EMBRAPA folhas cultivadas <i>in vitro</i>
PDI <sup>IR</sup>	<i>P. divaricatum</i> coletado na EMBRAPA raízes cultivadas <i>in vivo</i>
PDI <sup>IR</sup> *	<i>P. divaricatum</i> coletado na EMBRAPA raízes cultivadas <i>in vitro</i>
TCF	Teor de Compostos Fenólicos
UV	Ultravioleta
UFPA	Universidade Federal do Pará

## RESUMO

Muitas espécies do gênero *Piper* apresentam ampla distribuição na Amazônia e diversas aplicações biológicas devido a grande diversidade estrutural de seus metabólitos secundários. A espécie *Piper divaricatum*, é endêmica da Amazônia e produz em seu óleo essencial elevadas concentrações de metileugenol (50 – 90%), um fenilpropanóide com propriedade antioxidante e fungicida. Devido às suas potenciais aplicações, o objetivo deste estudo foi o estabelecimento do cultivo *in vitro* e a comparação da biossíntese dos metabólitos secundários e propriedades antioxidantes com o cultivo *in vivo*. Para o estabelecimento do cultivo *in vitro* foram utilizados ápices caulinares cultivados em meio Murashige e Skoog, acrescido do regulador de crescimento BAP 0,5 mg.mL<sup>-1</sup>. Para o cultivo *in vivo*, foram propagadas microestacas em casa de vegetação no substrato vermiculita e adição de solução nutritiva de Murashige e Skoog. Os compostos voláteis identificados nas folhas das plântulas cultivadas *in vivo* foram metileugenol,  $\beta$ -elemeno e *E*- $\beta$ -ocimeno, os quais não diferiram do cultivo *in vivo*, com exceção dos 90 dias. O cultivo *in vitro* das raízes não se mostrou eficiente para produção de fenilpropanóides e apresentou um perfil bastante diferenciado em relação ao cultivo *in vivo* de terpenos. De uma maneira geral, para as plantas cultivadas *in vitro* não houve diferença estatística significativa no teor de compostos fenólicos e na atividade antioxidante das folhas. No entanto, a atividade antioxidante das raízes foi bastante expressiva. Os resultados obtidos reforçam a hipótese de que plantas regeneradas *in vitro* podem sintetizar metabólitos semelhantes a planta-mãe e manter suas propriedades biológicas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Piperaceae, micropropagação, cultivo *in vitro*, metileugenol, compostos fenólicos, atividade antioxidante.

## ABSTRACT

Many species of the genus *Piper* are widely distributed in the Amazon and various biological applications because of large structural diversity of its secondary metabolites. The species *Piper divaricatum*, is endemic in the Amazon and produces in its essential oil high concentrations of methyleugenol (50-90%), an phenylpropanoid with antioxidant and fungicidal properties. Because of its potential applications, the objective of this study was to establish the *in vitro* cultivation and comparing the biosynthesis of secondary metabolites and antioxidant properties with the *in vivo* cultivation. For establish the *in vitro* culture were used shoot apexes on Murashige e Skoog medium with addition of regulator BAP 0.5 mg.mL<sup>-1</sup>. For *in vivo* cultivation, micropiles were propagated in the greenhouse in vermiculite and adding nutritious Murashige e Skoog solution. The volatile compounds identified in the leaves of seedlings grown *in vivo* were methyleugenol,  $\beta$ -elemene and E- $\beta$ -ocimene, which did not differ from *in vivo* cultivation, with the exception of 90 days. The *in vitro* culture of roots was not efficient to produce phenylpropanoids and presented a very different profile compared to the *in vivo* cultivation of terpenes. In general, for plants *in vitro* cultivated there was no statistically significant difference in the phenolics compounds content and antioxidant activity in the leaves. However, the antioxidant activity of roots was significant. The results support the hypothesis that *in vitro* regenerated plants can synthesize metabolites similar the matrix plant and maintain their biological properties.

**KEY-WORDS:** Piperaceae, micropropagation, *in vitro* culture, methyleugenol, phenolic compounds, antioxidant activity.

## 1- INTRODUÇÃO

Este trabalho tem como foco principal o estudo dos metabólitos presentes no óleo essencial da espécie *Piper divaricatum* que pertence a família Piperaceae, sendo classificada como endêmica da região amazônica.

O reino vegetal é responsável pela maior parcela da diversidade química conhecida e registrada na literatura e muitas famílias de plantas têm uma distribuição global (VIEGAS Jr et al, 2006). No entanto, poucas têm a rica história etnobotânica e etnofarmacológica das Piperáceas, que ao longo dos séculos são utilizadas na medicina popular e na culinária, e apresentam um baixo risco para a saúde humana (IWU,1993). As espécies com ocorrência na Amazônia brasileira são reportadas como fungicidas (*Piper arboreum* e *P. tuberculatum*), bactericida (*P. marginatum*), antioxidante (*P. aduncum*) e antitumoral (*P. aleyreanum*) entre outras (SILVA et al, 2002; DUARTE et al, 2007; REGASINI et al, 2008; SILVA et al, 2014).

A diversidade de classes metabólicas presentes nos extratos e óleos essenciais tornam as espécies de *Piper* uma fonte bastante promissora de matérias primas (MOREIRA et al, 1998; MAIA et al, 1998). Dentre os metabólitos dos óleos essenciais podemos destacar os fenilpropanóides, dilapiol, safrol, apiol, miristicina, eugenol e metileugenol que ocorrem em grandes quantidades em *P. aduncum*, *P. callosum*, *P. krukoffii* e *P. divaricatum* (ANDRADE, GUIMARAES & MAIA, 2009; SILVA et al, 2011; SILVA et al, 2010).

Os estudos dos óleos essenciais de *P. divaricatum*, reportam o predomínio da classe dos fenilpropanóides, onde o tipo químico metileugenol e eugenol é o mais comum no estado do Pará (ANDRADE, GUIMARÃES E MAIA, 2009; SILVA et al, 2010). Tendo em vista que a produção de metabólitos em plantas pode sofrer variação devido a sazonalidade, ritmo circadiano, desenvolvimento da planta, luminosidade, disponibilidade hídrica, regime de cultivo e temperatura (GOBBO-NETO ; LOPES, 2006). Este trabalho abordará o monitoramento da produção dos metabólitos secundários em *P. divaricatum* sob diferentes condições de cultivo e estes foram designados como cultivo *in vivo* e cultivo *in vitro*.

Como método de cultivo *in vitro*, elegeu-se a micropropagação, devido a mesma representar uma alternativa promissora para a multiplicação de espécies de interesse e produção de metabólitos secundários de alto valor e importância industrial (FILHO, 1995). Estudos recentes indicam elevado potencial fungicida *in vitro* de *P. divaricatum* e tolerância *in vivo* contra o fitopatógeno *Fusarium solani* f. sp. *piperis*, causador da fusariose em pimenteira-do-reino (*P. nigrum*) (SILVA et al, 2014; MEIRELES, 2014). Estas aplicações

reforçam a importância de métodos alternativos para produção em larga escala desta espécie, visando sua aplicação biotecnológica ou até como trato cultural.

Neste sentido, o objetivo do presente estudo foi monitorar a produção de metabólitos secundários provenientes de plantas de *P.divaricatum* em diferentes regimes de cultivo, bem como avaliar a atividade antioxidante dos extratos.

## 2- OBJETIVOS

### 2.1 - OBJETIVO GERAL

- Monitorar a produção de metabólitos secundários de *P. divaricatum* em cultivos *in vitro* e *in vivo* visando a sua aplicação biotecnológica.

### 2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer um protocolo para micropropagação de *P. divaricatum*
- Comparar a produção dos metabólitos secundários através do cultivo *in vitro* e *in vivo* em diferentes estágios de crescimento.
- Monitorar a produção de compostos fenólicos e atividade antioxidante nos extratos

### 3-REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1- Cultivo *in vitro* de espécies de *Piper*

Nos últimos 50 anos, houve um desenvolvimento acelerado nos estudos acerca de metabólitos secundários de plantas. Estes compostos são conhecidos por desempenharem um papel importante na adaptação ao meio ambiente e também representam uma fonte importante de substâncias farmacologicamente ativas. O uso da cultura de células de planta para a produção de substâncias de interesse contribuiu grandemente para avanços em diversas áreas da fisiologia e bioquímica vegetal. Diferentes estratégias, usando sistemas de cultura *in vitro*, foram estudadas com o objetivo de aumentar a produção de metabólitos secundários (FUMAGALI, 2008).

Os fenilpropanóides são um importante grupo de metabólitos secundários que contribuem para diversas funções fisiológicas/ecológicas nas plantas, incluindo a defesa contra micro-organismos e insetos, e também como chamarizes a polinizadores (USIA et al., 2005). O óleo essencial de *P. divaricatum* é caracterizado por tipos químicos: metileugenol + eugenol e miristicina (ANDRADE, GUIMARAES & MAIA, 2009). Apesar de poucos estudos acerca desta espécie, são reportadas atividade antioxidante, antimicrobiana e fungicida (SILVA et al, 2010).

Métodos de cultivo *in vitro*, como micropropagação, representam uma alternativa promissora para a multiplicação de espécies de interesse e produção de metabólitos secundários de alto valor e importância industrial (FILHO, 1995).

#### 3.2.1 Produção de metabólitos em plantas

As plantas são fontes valiosas de uma vasta gama de metabólitos secundários, que são usados como produtos farmacêuticos, agroquímicos, aromas, fragrâncias, corantes, biopesticidas e aditivos alimentares (RAO, RAVISHANKAR, 2002). Estima-se que acima de 80% dos compostos naturais conhecidos tem sua origem em plantas e muitos são de difícil obtenção por síntese química (PHILLIPSON, 1990; BALANDRIN e KLOCKE, 1988; FOWLER e SCRAGG, 1988).

Propriedades bioativas presentes em extratos vegetais e óleos essenciais, produzidos pelas plantas, como uma consequência do metabolismo secundário, mostraram-se eficientes no controle do crescimento de uma ampla variedade de microrganismos, incluindo fungos filamentosos, leveduras e bactérias, o que evidencia o potencial das plantas no combate a esses organismos patogênicos (DUARTE, 2006).

A identificação de novos compostos químicos, a partir de plantas nativas ou medicinais, possibilita a obtenção de substâncias capazes de controlar ou inibir o desenvolvimento dos fitopatógenos (SILVA et al., 2009).

Os metabólitos secundários desempenham papéis importantes na bioquímica e fisiologia dos vegetais. Muitas classes de produtos naturais constituem grupos importantes de metabólitos secundários, estando envolvidos em muitos processos fisiológicos de plantas, particularmente naqueles que respondem ao estímulo ambiental. A composição de metabólitos secundários nos tecidos da planta pode influenciar diretamente na qualidade e toxicidade dos alimentos produzidos para humanos e animais (STOBIECKI et al., 2003).

As culturas celulares de plantas podem acelerar a síntese de grandes quantidades de metabólitos secundários dentro de um curto período, o que o torna favorável a produção em plantas, para as quais o acúmulo destes metabólitos pode variar, desde uma estação (plantas anuais) ou diversos anos (plantas perianuais) (CROTEAU et al., 2000; SANTOS et al., 2007). Muitas estratégias podem ser utilizadas para induzir ou aumentar a produção de metabólitos secundários, uma das maneiras mais efetivas, é a adição de compostos precursores ou intermediários ao meio de cultivo (SILVESTRINI et al., 2002; SHEPHERD, 1995).

### **3.2.2 Espécies de *Piper* ricas em fenilpropanóides cultivadas *in vitro***

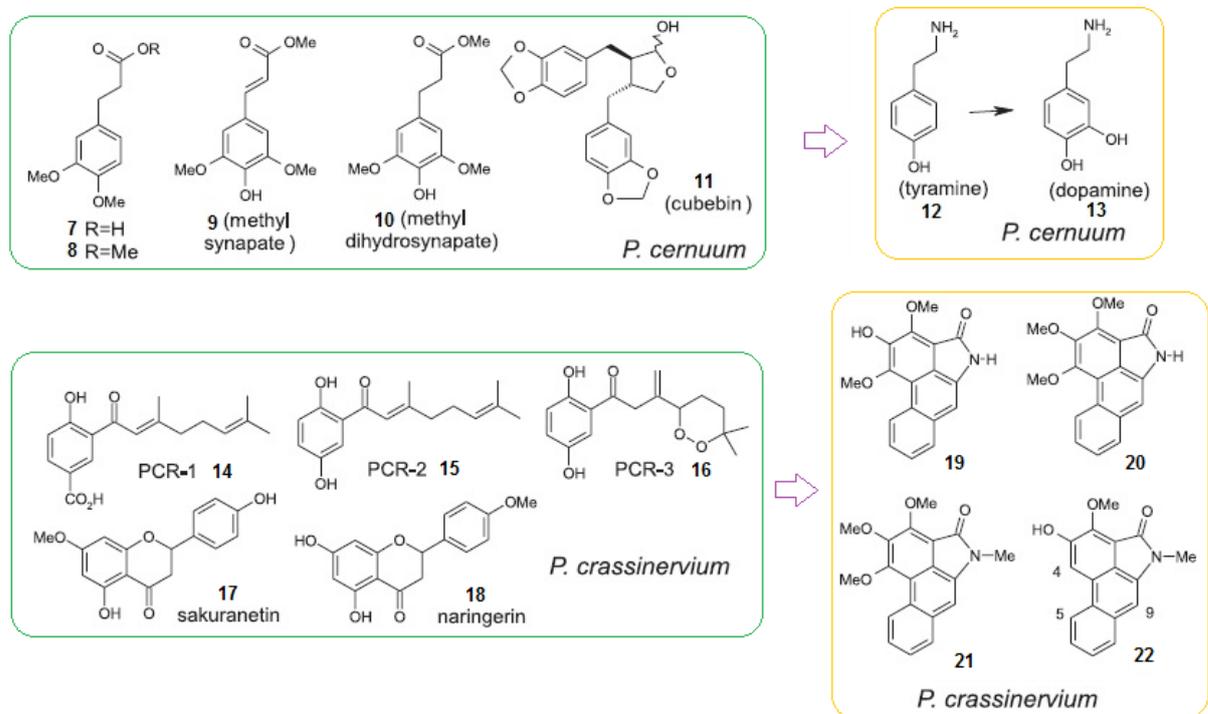
A expressão de muitas vias metabólicas secundárias pode ser facilmente alterada por fatores externos, como os níveis de nutrientes, fatores de estresse, luz e reguladores de crescimento. Muitos dos componentes de meios de cultura de células vegetais são importantes para determinar o crescimento e acumulação de metabólitos secundários (STAFFORD et al., 1986;. MISAWA, 1985).

Muitas espécies de plantas cultivadas *in vitro* produzem metabólitos secundários em maior quantidade quando comparadas às plantas-mães. No entanto, ainda existem problemas na produção destes, por culturas celulares provenientes da instabilidade das linhagens,

crescimento lento e problemas de *scale-up* (RAVISHANKAR, VENKATARAMAN, 1993).

As espécies *P. cernuum* e *P. crassinervium* foram cultivadas por suspensão celular e mostraram divergência na produção de metabólitos secundários no cultivo *in vivo* e *in vitro* (Figura 1) (DANELUTTE et al, 2005). O extrato de *P. cernuum*, cultivado *in vivo* foi previamente fracionado e foram identificados vários derivados do ácido cinâmico (**7**, **8**, **9**, **10,11**) (MOREIRA, GUIMARÃES, KAPLAN, 2000; D'ABROSCA et al, 2004; TAKAYA et al, 2003). A cultura *in vitro* de calos de *P. cernuum*, utilizando folhas como explantes em meio MS, suplementado com 2,4-D (0,2 mg.mL<sup>-1</sup>) e GA3 (0,5 mg.mL<sup>-1</sup>) como reguladores de crescimento, resultou na produção de tiramina (**12**) e dopamina (**13**) (DANELUTTE et al, 2005). Para *P. crassinervium* explantes de brotos em meio MS, acrescidos de ANA (1,0 mg.mL<sup>-1</sup>) e BAP (0,2 mg.mL<sup>-1</sup>), produziram várias aristolactamas (**19**, **20**, **21** e **22**) como majoritárias. Os metabólitos isolados de *P. crassinervium* cultivados *in vivo* foram ácidos benzóicos prenilados (**14**, **15**, **16**) e flavonóides (**17,18**) (DANELUTTE et al, 2005).

**FIGURA 1.** Compostos majoritários identificados nos tecidos de *P. cernuum* e *P. crassinervium* cultivadas *in vitro* e *in vivo*.



Metabólitos produzidos *in vivo*

Metabólitos produzidos *in vitro*

FONTE: DANELUTTE et al, 2005 (MODIFICADO).

O cultivo *in vitro* por suspensão celular de *P. solmsianum* e *P. aduncum* apresentou diferenças nas respostas morfogênicas e conseqüentemente na produção de metabólitos (BALBUENA et al, 2006). A comparação do perfil químico das plantas cultivadas *in vitro* e *in vivo* mostrou uma ativação da via dos fenilpropanóides em *P. solmsianum* e diferentes origens biossintéticas em *P. aduncum*. O cultivo *in vitro* provocou diferenciação e maior acúmulo de metabólitos nas raízes em ambas espécies (BALBUENA et al, 2006). Alguns relatos de cultivo *in vitro* encontrados para *P. hispidinervum* (pimenta longa) mostraram alta obtenção de safrol através da indução de calos, com adição de ácido 2,4 - diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido naftalenoacético (ANA) e benzilaminopurina (BAP) ao meio MS (SANTIAGO et al, 2003; VALLE, 2003).

### 3.3 - A Espécie *Piper divaricatum* G. Meyer

A espécie *P. divaricatum* (Figura 2) é conhecida na Amazônia brasileira como “pau-da-angola”, “jaborandi-manso” ou “betre”. Trata-se de um arbusto com até 9,0 m de altura, dotado de glândulas e glabro. Folhas com bainha curta; lamina oblongo-elíptica ou lanceolada, de 8,0-14,0 cm de comprimento e 3,0-7,0 cm de largura. Espigas eretas ou pêndulas, até 6,0 cm de comprimento e 5,0-8,0 mm de diâmetro, alcançando na frutificação até 1,0 cm de diâmetro. Encontra-se distribuída na América do Sul nos países Bolívia, Brasil (AM, AP, BA, CE, ES, GO, MT, MS, MG, PA, PE, RJ, RO, RR), Colômbia, Equador, Guiana, Peru, Suriname (YUNCKER, 1973, GUIMARÃES & GIORDANO, 2004).

**FIGURA 2.** Espécie *P. divaricatum* G. Meyer cultivada no Bosque Camilo Viana, UFPA

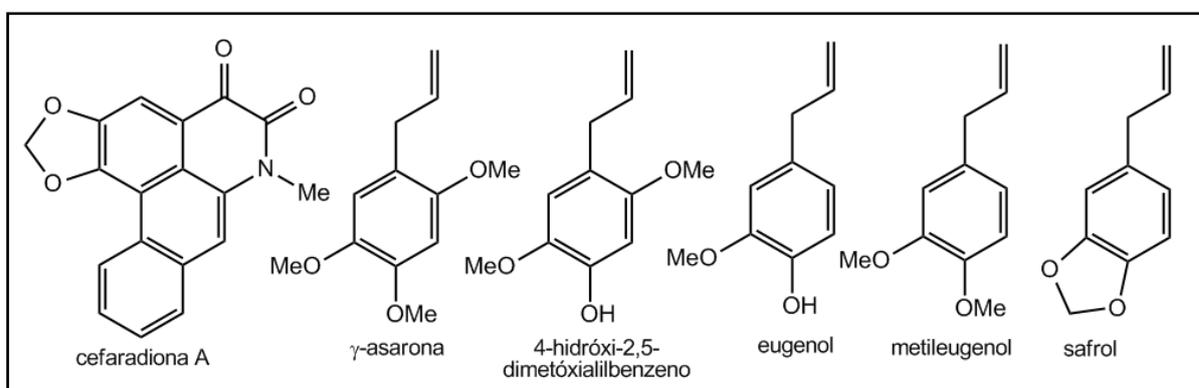


Fonte: Autor (2014)

É empregada na medicina popular como inseticida e contra dores reumáticas e cólicas (AVELLA, DÍAZ & DÍAZ, 1994; PECKOLT & PECKOLT, 1888). Do ponto de vista químico existem poucos estudos: o fracionamento do extrato etanólico dos galhos resultou no isolamento de um alcalóide 4,5-dioxoaporfínico e os fenilpropanóides  $\gamma$ -asarona e 4-hidróxi-2,5-dimetóxililbenzeno (AVELLA, DÍAZ & DÍAZ, 1994).

Recentemente, foi relatado um novo tipo químico rico em safrol (98,0%), com ocorrência em Itabuna, estado da Bahia (BARBOSA et al, 2012). As estruturas dos principais compostos identificados em *P. divaricatum* encontram-se na figura 3.

**FIGURA 3.** Estruturas das principais substâncias identificadas em *P. divaricatum*



Fonte: Autor (2014).

O óleo essencial de *P. divaricatum* apresenta propriedades antioxidantes no combate de radicais livres DPPH e inibidor da peroxidação lipídica no sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico (SILVA et al., 2010). Além disso, apresentou atividade fungicida *in vitro* contra os fitopatógenos *Cladosporium cladosporioides*, *C.sphareospermum* e *Fusarium solani* f. sp. *piperis* (SILVA et al., 2010; SILVA et al., 2014). Clones de um espécime coletado na cidade de Breves, ilha do Marajó (PA) cultivados em casa de vegetação até seis meses de idade foram inoculados com esporos de *F. solani* f. sp. *piperis*, fitopatógeno que provoca a fusariose em *P. nigrum*. Os sintomas foram avaliados por 100 dias e *P. divaricatum* mostrou total tolerância à fusariose (MEIRELES, 2014).

Em virtude de suas aplicações e ocorrência restrita, o estudo dos metabólitos secundários produzidos em diferentes condições de cultivo se faz necessário, pois a micropropagação pode se tornar viável, uma vez que as sementes levam cerca de dez meses para atingir o estágio de maturação (dados não publicados). Para tal é necessário que se

tenha reprodutibilidade para se otimizar o processo. Desta forma, a utilização da cultura de tecidos para *P. divaricatum* torna-se uma importante estratégia para sua aplicação em programas de melhoramento ,juntamente com *Piper nigrum* para a clonagem e multiplicação de plantas em larga escala em um curto intervalo de tempo. Dentre as perspectivas, está seu possível uso no controle da fusariose em *P. nigrum*, atuando como porta-enxerto ou na proteção do solo dos pimentais.

### 3.4 - Micropropagação

A cultura de tecidos vegetais, também denominada de cultura *in vitro*, micropropagação ou cultura axênica é uma importante ferramenta para estudos básicos e aplicados, bem como para aplicações comerciais (LIMA; MORAES, 2006). O termo cultura de tecidos é geralmente usado para cultivos assépticos de células, tecidos ou órgãos que estão sob condições físicas e químicas controladas *in vitro* (THORPE, 2007). Os primeiros ensaios de cultura de células vegetais foram relatados em 1756, contudo, a base teórica foi proposta por Haberlandt em 1902, botânico alemão que materializou os conceitos embutidos na teoria celular proposta por Schwann e Schleider (KERBAUY, 1997; THORPE, 2007).

A cultura de tecidos em plantas pode ser estabelecida rotineiramente sob condições estéreis a partir de vários explantes, tais como folhas, caules, raízes e meristemas. Esta técnica tem sido empregada para produção *in vitro* de metabólitos secundários de várias plantas medicinais (HUSSAIN et al, 2012). É uma ferramenta com alto potencial de aplicação no melhoramento vegetal, e pode ser utilizada desde a multiplicação de material genético, para a troca e a avaliação de germoplasma, até a produção de mudas livres de vírus. Sua aplicação também se estende ao aumento da variabilidade genética mediante a produção de variantes somaclonais e como fase essencial para a obtenção de plantas transgênicas. (ANDRADE, 2002).

A micropropagação possibilita a multiplicação por via assexuada, resultando em um grande número de clones. Genótipos superiores podem ser multiplicados sem modificação genética, fator importante para a manutenção de características agrônômicas. A técnica ainda pode proporcionar maior precocidade na produção e abreviar o tempo necessário à liberação de uma nova cultivar (BUENO; MENDES; CARVALHO, 2006).

O protocolo de cultivo *in vitro* consiste em etapas como: isolamento de pequenos fragmentos do tecido vivo (explantes), desinfestação e cultivo asséptico por períodos indefinidos em um meio de cultura apropriado. O objetivo é obter uma nova planta idêntica a

original, ou seja, realizar uma clonagem vegetal que é definida como uma propagação assexuada de células ou organismos, de modo a obter um novo indivíduo, mantendo-se o genótipo idêntico aquele do ancestral comum (TORRES et al. 2000).

Para que este processo de clonagem seja obtido, uma importante característica vegetal deve ser mencionada, a totipotencia. Células totipotentes são aquelas que podem se diferenciar em qualquer tipo de tecido.

A diferenciação é um termo qualitativo, que reflete um processo de especialização celular, e ocorre quando uma célula em divisão produz duas novas células que serão destinadas a assumir características anatômicas e funções diferentes (ALBERTS, 2010). Podemos citar como exemplo, os estádios iniciais de desenvolvimento da plântula, nos quais a divisão do zigoto produz células que produzirão as raízes e outras que darão origem à parte aérea (ALBERTS, 2010).

Em muitos casos, uma célula madura (diferenciada ou especializada), poderá ser estimulada a funcionar como uma célula meristemática, um fenômeno conhecido como desdiferenciação (HOPKINS,2000). A habilidade para desdiferenciar-se demonstra que células diferenciadas (maduras) retêm toda a informação genética requerida para o desenvolvimento de uma planta inteira, uma propriedade conhecida como totipotência (FERRI,1985).

Segundo GUEDES (2008), a micropropagação apresenta vantagens à propagação convencional para a grande maioria das plantas, tais como:

- a) Aumento da taxa de multiplicação;
- b) Obtenção em larga escala de uma única fonte de explante ou qualquer outro tecido da planta potencialmente responsivo;
- c) Manutenção da planta original após a retirada de explantes, um fator de considerável importância se tratando de plantas raras;
- d) Maior número de plantas obtidas em menor espaço de tempo;
- e) Propagação contínua ao longo do ano, baixo custo, uma vez estabelecido e otimizado seu protocolo e armazenamento;

As vantagens citadas garantem ao produtor um acesso a plantas de alta qualidade genética e produtividade uniforme, promovendo assim um impacto no mercado de plantas (GRATTAPAGLIA, MACHADO, 1998).

Um dos parâmetros essenciais na cultura de tecidos vegetais são as formulações utilizadas no meio de cultura, os quais podem ser adicionados reguladores vegetais com a finalidade de suprir possíveis deficiências endógenas dos explantes e auxiliar no desenvolvimento dos tecidos (GRATTAPAGLIA, MACHADO, 1998; CALDAS et al., 1998). Além disso, as vias metabólicas básicas são conservadas nas células cultivadas *in vitro*, embora alguns processos, como a fotossíntese, possam ser inativados pelas condições de cultivo e pelo estado de diferenciação das células (CALDAS et al., 1998). Contudo, vale ressaltar que o sucesso na micropropagação de qualquer espécie vegetal é orquestrado por três fatores: o genótipo, a fonte de explante (folha, raiz, caule, meristema, embrião) e a condição da cultura (meio de cultura, luz, temperatura, recipiente) (ANDRADE, 2002).

Diversas formulações de meios básicos têm sido utilizadas, e podemos destacar o meio MURASHIGE e SKOOG (1962), abreviado como MS e suas modificações, que apresentam bons resultados para diversas espécies (PASQUAL, 2001). A composição é constituída por macro e micronutrientes, vitaminas, fonte de carboidrato (geralmente, sacarose) e aminoácidos (BERTOZZO, 2010). Além disso, para evitar ou reduzir as perdas de materiais em função de contaminações endógenas ou provenientes do ambiente, são empregados diversos métodos de esterilização, assim como cuidados na assepsia dos ambientes de manuseio e de incubação dos cultivos (BERTONCELLI, HASSE, OLIVEIRA, 2009).

### **3.5 - Desinfestação *in vitro* de explantes**

A contaminação por micro-organismos é um dos principais problemas para a aplicação da micropropagação e pode ser um fator limitante para o estabelecimento e cultivo *in vitro* de certas espécies (RIBAS et al., 2003). Os microorganismos são facilmente transmitidos de um material para o outro e na maioria dos casos, a presença de fungos e bactérias ocorre poucos dias após a inoculação ou em sua minoria na fase de produção (GRATTAPAGLIA, MACHADO, 1998). Por este motivo, várias pesquisas são desenvolvidas para a prevenção ou eliminação dos contaminantes, e abrangem desde o desenvolvimento de protocolos de assepsia, cuidados com as plantas-matrizes, até o uso de produtos antimicrobianos, adicionados ao meio de cultura (PEREIRA et al., 2009).

Quando as condições do meio de cultura (nutrição, pH) tornam-se favoráveis aos micro-organismos endofíticos, ocorre uma competição por nutrientes minerais e carboidratos, que podem comprometer a multiplicação e o desenvolvimento dos explantes

(MONTARROYOS, 2000). Estes micro-organismos também produzem metabólitos fitotóxicos, tais como os ácidos láctico, acético e cianeto (PEREIRA; MATTOS; FORTES, 2003)

Os pré-tratamentos aplicados na planta matriz são essenciais para o sucesso da assepsia, principalmente quando se trata de micro-organismos endógenos (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Várias substâncias com ação germicida, como o etanol, hipoclorito de sódio e de cálcio são utilizadas para desinfestar explantes. Além dos citados, outros agentes como água oxigenada, nitrato de prata e cloreto de mercúrio podem ser utilizados e sua ação será influenciada pelo tipo e idade do explante, concentração da solução e tempo de oxidação (DONNI et al., 2005). Para manter a consistência do tecido a ser desinfestado a relação entre a concentração da solução e tempo de exposição deve ser inversamente proporcional, uma vez que a oxidação do tecido, causada pelos agentes utilizados na desinfestação, vai influenciar na regeneração do explante.

### 3.5.2 - Adição de antibióticos

Após a assepsia para eliminação dos microorganismos superficiais, os explantes podem ser transferidos para o meio de cultura contendo antibióticos, usados para controlar contaminações bacterianas endógenas (WENDING, DUTRA, ROSSI, 2006). As bactérias endógenas impõem consideráveis limitações mesmo na fase inicial da propagação *in vitro*, podendo resultar na inviabilidade do experimento, perdas econômicas e de material genético (SOUZA et al. 2006).

Dentre os antibióticos mais usados estão cefalexina, ampicilina, estreptomicina, rifampicina, kasugamicina, carbenicilina, cefalosporinas, neomicina, canamicina, cloranfenicol e tetraciclina (WENDING, DUTRA, ROSSI, 2006). Além da eliminação de bactérias na cultura de tecidos, os antibióticos podem em alguns casos auxiliar no desenvolvimento do tecido vegetal (HOLFORD, NEWBURY, 1992; MAMIDALA, NANNA, 2009).

A baixa eficiência da descontaminação somente com NaClO pode ser atribuída à sua ação superficial no tecido vegetal. A rifampicina, por sua vez pode ser utilizada como alternativa ao NaClO, devido a sua capacidade de controlar bactérias endógenas (TORRES *et al.* 1998). A rifampicina foi eficaz no controle de bactérias endógenas em gemas laterais do mamoeiro (CORNÉLIO; HARIDASAN, 1995). Na micropropagação da cana-de-açúcar, a amoxicilina foi o antibiótico mais eficiente na inibição de *Acetobacter diazotrophicus*,

enquanto o uso de amoxicilina e cefuroxima sódica não foi eficiente para eliminar a bactéria *Herbaspirillum* spp (DONATO et al., 2005).

### 3.5.3 - Adição de reguladores de crescimento

Os reguladores de crescimento são substâncias de origem natural ou sintética que aplicados em plantas alteram o balanço hormonal e influenciam no desenvolvimento e crescimento (ESPINDULA, 2010). Geralmente, os reguladores são aplicados com a finalidade de aumentar a produção e a qualidade ou facilitar a colheita. A aplicação de reguladores vegetais têm mostrado grande potencial de incremento na produtividade de algumas culturas, porém sua adoção não é uma prática rotineira em culturas que não atingiram alto nível tecnológico (ESPINDULA, 2010; FERRARI et al., 2008; LAMAS, 2001).

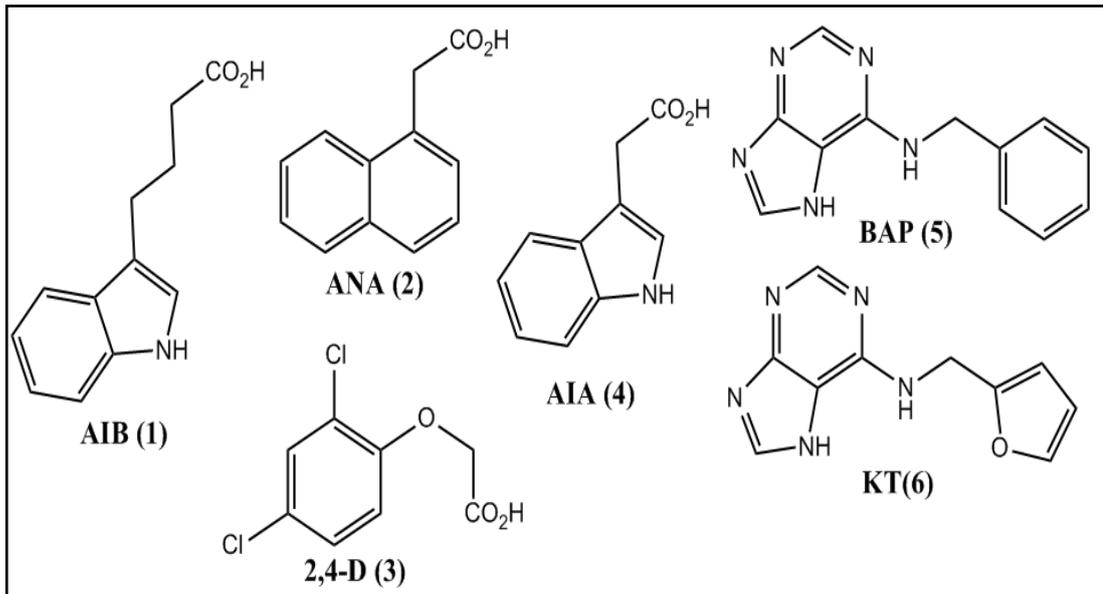
Os reguladores de crescimento agem como sinalizadores químicos na regulação do crescimento e desenvolvimento de plantas. Regularmente, ligam-se a receptores na planta e desencadeiam mudanças no metabolismo celular que podem afetar a iniciação ou modificação do desenvolvimento de órgãos ou tecidos. Normalmente atuam no metabolismo de giberelinas e podem reduzir o alongamento de entrenós de plantas de acordo com o estágio fenológico de aplicação e da dose empregada (TREHARNE et al., 1995). Vários autores reportam mudanças nas plantas causadas pela aplicação de reguladores de crescimento, principalmente em cereais de inverno, como alteração na arquitetura das plantas, nos componentes de produção e na produtividade da cultura, mesmo se não ocorrer acamamento da cultura (FERNANDES, 2009; RODRIGUES; VARGAS, 2002; ZAGONEL et al., 2002).

Os hormônios vegetais são produzidos nas plantas em pequenas quantidades e apesar disto, produzem efeitos significativos nos locais de produção ou em outros sítios de ação (TAIZ & ZEIGER, 2009). Além dos hormônios produzidos naturalmente, existem os análogos sintéticos, também conhecidos como reguladores vegetais que possuem vasta aplicação na agricultura e silvicultura moderna (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Dentre os reguladores vegetais mais utilizados estão as auxinas, como o ácido indolilbutírico (**AIB, 1**), ácido naftalenoacético (**ANA, 2**), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (**2,4-D, 3**), ácido 1*H*-indol-3-acético (**AIA, 4**), dentre outros. A principal função das auxinas na cultura de tecidos vegetais é regular a divisão e alongamento celular e também, induzir a formação do sistema radicial (TAIZ & ZEIGER, 2009). Além das auxinas, as citocininas como o benzilaminopurina (**BAP, 5**) e cinetina (**KT, 6**) também são empregadas visando a

proliferação de brotações nos explantes (TOMBOLATO & COSTA, 1998). Na figura 4, temos a ilustração dos principais reguladores de crescimento utilizados no cultivo *in vitro*.

**FIGURA 4.** Estrutura dos principais reguladores de crescimento utilizados no cultivo *in vitro* de tecidos vegetais.



**Fonte:** Autor (2015)

## 4 - MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios de cultivo *in vitro* foram desenvolvidos no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, Pará. Os experimentos de extração, metabólitos secundários e atividade biológica foram realizados no Laboratório de Engenharia de Produtos Naturais, ITEC/UFPA.

### 4.1 - Coleta do material Vegetal

Para realização dos experimentos, foram tomados como fonte de explantes ápices caulinares oriundos de micro estacas provenientes de *P. divaricatum*, cultivados no bosque Camilo Viana/ UFPA (**Pd-I**) e em casa de vegetação na Embrapa Amazônia Oriental (**Pd-II**).

#### 4.1.2. Cultivo *in vitro* de *P. divaricatum* a partir dos ápices caulinares

Para o estabelecimento, do protocolo de regeneração de *P. divaricatum*, foram utilizados como explantes, os ápices caulinares oriundos de micro estacas obtidas do banco ativo de germoplasma (BAG) da Embrapa Amazônia Oriental, e de plantas cultivadas no bosque Camilo Viana/ UFPA.

As microestacas foram cultivadas em casa de vegetação no substrato vermiculita. Os ápices caulinares, provenientes das micro estacas, foram excisados, e em seguida foram submetidos a assepsia inicial por imersão em etanol 70% e hipoclorito de sódio nas concentrações de 1,5 e 2,0%, seguida de sucessivas lavagens com água destilada estéril. Posteriormente, foram imersos em solução de sulfato de estreptomicina nas concentrações 0,1, 0,2 e 0,3% (m/v), e solução de rifampicina nas concentrações 0,1, 0,2 e 0,3% (m/v). Adicionalmente, foi utilizado o fungicida Derosal nas concentrações 0,2 e 0,5% (m/v) em diferentes intervalos de tempo.

Os meios selecionados para o cultivo foram o MS e ½ MS com e sem adição dos antibióticos estreptomicina, amoxicilina e rifampicina. Além disso, houve também a adição dos reguladores de crescimento BAP e ANA 0,5 mg /mL. O agente solidificante foi o Phytigel na concentração de 2,0 g.L<sup>-1</sup> e o pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. A fase de estabelecimento foi realizada em sala de crescimento, com temperatura 25 ± 3°C e fotoperíodo de 16 horas luz a uma intensidade luminosa de 30μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>. Cada tratamento

foi composto por três repetições e encontram-se representados na tabela 1.

**Tabela 1.** Tratamentos mostrando a concentração do meio de cultura, reguladores de crescimento e antibióticos utilizados no cultivo *in vitro* de *P.divaricatum*.

Tratamento	Meios de Cultura		Reguladores de Crescimento (0,5 mg.mL <sup>-1</sup> )		Antibióticos (mg.mL <sup>-1</sup> )				
	MS	½ MS	BAP	ANA	Estreptomicina		Amoxicilina		Rifampicina
					100	200	100	200	100
T0	X								
T1	X				X				
T2	X						X		
T3		X			X				
T4		X					X		
T5	X					X			
T6	X							X	
T7	X		X		X				
T8	X		X				X		
T9		X		X	X				
T10		X		X			X		
T11	X								X

#### 4.1.3 - Cultivo *in vivo* de *Piper divaricatum* a partir de micro estacas

Para o cultivo, foram utilizados segmentos nodais (microestacas) das plantas matrizes **PDI** e **PDII**, os quais foram transferidos para bandejas plásticas de polipropileno com 24 células. Cada microestaca possuía apenas um nó e possuía cerca de 6 cm de comprimento. Para cada célula foi colocado um segmento nodal e acrescentado vermiculita como substrato. As bandejas foram irrigadas duas vezes ao dia para atingir a umidade desejável. A cada 3 dias, foram adicionados 10 mL de solução nutritiva à base de MS sem regulador de crescimento. As plântulas regeneradas a partir das microestacas foram utilizadas para o monitoramento dos metabólitos secundários, bem como fonte de novos explantes. Para as plântulas utilizadas como explantes, foi feita a assepsia com fungicida Derosal 0,2%, a cada 7 dias.

O cultivo foi realizado em casa de vegetação na EMBRAPA (Belém, PA) e as folhas e raízes das plântulas foram coletadas aos 30, 60 e 90 dias de crescimento para o monitoramento dos metabólitos secundários e atividade antioxidante.

#### 4.1.4 - Monitoramento da Produção dos Metabólitos Secundários

A biomassa (folhas e raízes) dos espécimes cultivados (**Pd-I** e **Pd-II**) *in vitro* e *in vivo* foi coletada aos 30, 60 e 90 dias de crescimento e foram monitorados os compostos voláteis, compostos fenólicos e atividade antioxidante. As amostras foram codificadas de acordo com a tabela 2.

**Tabela 2.** Amostras obtidas a partir do cultivo *in vitro* e *in vivo* dos espécimes I e II de *P. divaricatum* nos diferentes períodos de crescimento.

<u>Amostra</u>	<u>Procedência</u>		<u>Cultivo</u>		<u>Parte da planta</u>		<u>Dias de coleta</u>		
	UFPA	EMBRAPA	<i>In vitro</i> *	<i>In vivo</i>	Folhas	Raízes	30	60	90
Pd-IF30	X			X	X		X		
Pd-IF30*	X		X		X		X		
Pd-IR30	X			X		X	X		
PdI-R30*	X		X			X	X		
Pd-IF60	X			X	X			X	
Pd-IF60*	X		X		X			X	
Pd-IR60	X			X		X		X	
PdI-R60*	X		X			X		X	
Pd-IF90	X			X	X				X
Pd-IF90*	X		X		X				X
Pd-IR90	X			X		X			X
PdI-R90*	X		X			X			X
Pd-IIF30		X		X	X		X		
Pd-IIF30*		X	X		X		X		
Pd-IIR30		X		X		X	X		
PdII-R30*		X	X			X	X		
Pd-IIF60		X		X	X			X	
Pd-IIF60*		X	X		X			X	
Pd-IIR60		X		X		X		X	
PdII-R60*		X	X			X		X	
Pd-IIF90		X		X	X				X
Pd-IIF90*		X	X		X				X
Pd-IIR90		X		X		X			X
PdII-R90*		X	X			X			X

#### 4.1.5 - Extração dos compostos voláteis

As folhas e raízes de *P. divaricatum* (3 g) foram colocadas em um balão de 250 mL e adicionados 100 mL de água destilada. Em outro balão de 5 mL foram adicionados 3mL de n-pentano. Os balões foram conectados ao extrator de Likens-Nickerson, aparato apropriado para microextração e destilação simultânea. A temperatura da água de condensação foi mantida a 10°C e após 2 h de extração, a fração orgânica foi coletada e analisada por Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) para identificação dos voláteis.

#### 4.1.6 - Análise da composição química dos óleos essenciais

A análise quantitativa da composição química do material foi analisada por CG-FID (Cromatografia Gasosa acoplada a detector com Ionização de chamas), equipamento FOCUS (Thermoelectron) equipado com coluna capilar DB-5 (30m x 0,25 mm x 0,25µm), nitrogênio como gás de arraste (fluxo de 1,2 mL/min), injeção splitless (splitflow 20:1) temperaturas do injetor e detector 250°C e aquecimento da coluna de 60 a 240°C (variação de 3°C/min). A análise qualitativa foi feita nas mesmas condições por CG-EM (Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas), equipamento DSQ II, gás de arraste: Hélio, fonte de íons: 70 e V (impacto eletrônico), temperatura da fonte de íons e da linha de transferência de 200°C.

Cada composto foi identificado através da comparação de seu espectro de massas (massa molecular e o padrão de fragmentação) com os espectros existentes na biblioteca do sistema (Willey, NIST) e na literatura (ADAMS, 2007). Os índices de retenção (IR) foram determinados através a partir de uma série de hidrocarbonetos homólogos (C<sub>8</sub>-C<sub>24</sub>) injetados nas mesmas condições cromatográficas das análises das amostras.

#### 4.1.7 - Preparação dos extratos

As folhas e raízes de *P. divaricatum* (2,0 g) foram extraídas com 100 mL de acetato de etila por 72 horas e a cada 24h colocados em ultrassom por 10 minutos. Posteriormente, os extratos líquidos foram concentrados em evaporador rotativo.

#### 4.1.8 - Determinação do índice de fenólicos totais

Foi preparada a curva de calibração com o padrão fenólico ácido gálico nas concentrações de 0,5; 1, 2 ; 4 ; 6 ; 8 e 10 mg.L<sup>-1</sup>. Alíquotas de cada solução (500 µL) foram misturadas com 250 µL do reagente Folin-Ciocalteu 1N e 1250 µL de carbonato de sódio (75,0 g.L<sup>-1</sup>). Após 30 minutos, em ambiente escuro a absorbância da reação foi lida a temperatura de 25°C a 765 nm, utilizando um espectrofotômetro UV - visível. Os extratos foram solubilizados em metanol a concentração inicial de 40 mg.mL<sup>-1</sup> e diluídos em água de modo a induzir uma absorbância final entre 0,3 e 0,7 (λ: 765 nm). O teor de fenólicos foi expresso em miligramas de ácido gálico equivalente (AGE) por grama de extrato. De acordo com a equação:

$$EAG_{\text{mg/g}} = (\text{Abs}_A \times D \times \alpha \times d) / C_A$$

Onde:

Abs<sub>A</sub> = absorbância da amostra; D= diluição da amostra; α= coeficiente angular da reta de calibração, d= diluição na reação, C<sub>A</sub>= concentração da amostra (g.L<sup>-1</sup>)

#### 4.1.9 - Determinação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi determinada pelo método do sequestro de radicais DPPH (Brand-Williams et al, 1995). Para os testes com extratos foi preparada uma solução de DPPH<sup>\*</sup> 60 µM em MeOH com absorbância inicial de aproximadamente  $0,62 \pm 0,02$  ( $\lambda = 517$  nm), a temperatura ambiente. Alíquotas de 50 µL de extrato na concentração de (20 mg.mL<sup>-1</sup>) foram misturadas com 1950 µL da solução do radical DPPH<sup>\*</sup> e no teste em branco as amostras foram substituídas por metanol. A absorbância das amostras foi lida de maneira a observar o efeito da concentração sobre o radical DPPH, a leitura da absorbância foi monitorada no tempo zero e em intervalos contínuos de 30 min até completar duas horas de reação. A porcentagem de inibição dos radicais DPPH<sup>\*</sup> ( $I_{DPPH}$ ) para cada amostra, após 120 min foi calculada de acordo com a equação:

$$I_{DPPH}(\%) = \left[ 1 - \left( \frac{Abs_A}{Abs_B} \right) \right] \times 100$$

Onde:

Abs A e Abs B são as absorbâncias da amostra e do controle (branco) no término da reação, respectivamente.

Para comparação com o padrão Trolox foi construída uma curva de calibração (concentração *versus* inibição) nas concentrações de 1,5; 1,0 ; 0,75 ; 0,5 ; 0,25 mg.mL<sup>-1</sup>. Desta forma, os valores de inibição de cada amostra foram convertidos em mg do equivalente Trolox/ g de matéria seca (mg ET/g).

## 5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 - Cultivo *in vitro*

Nos ensaios iniciais para o estabelecimento do cultivo *in vitro* de *P. divaricatum*, houve adição de antibióticos e fungicidas na etapa de assepsia e ao meio de cultura no preparo dos explantes. As etapas que demonstraram maior eficiência na diminuição da contaminação foram: associação de hipoclorito de sódio 0,2% (NaClO) por 20 minutos seguido de solução de rifampicina 3,0%, por 30 minutos. O fungicida Derosal na concentração de 0,5% por 120 minutos apresentou maior eficiência no controle do crescimento de fungos nos explantes.

Problemas de contaminação e oxidação foram encontrados durante o estabelecimento do cultivo *in vitro* das cultivares de *P. nigrum*, “Apra”, “Bragantina” e “Kottanadan”. A cultivar “Apra” mostrou contaminação por bactérias endógenas nos meristemas provenientes de plantas adultas e oxidação de 13% dos meristemas, após sete dias de inoculação (SILVA, 2011).

No cultivo *in vitro* da bananeira (*Musa* sp.), a assepsia dos explantes em NaClO a 1%, seguido da imersão em rifampicina a 300 mg. L<sup>-1</sup>, promoveu uma redução significativa na contaminação bacteriana quando comparada à imersão apenas em NaClO a 1%. A utilização de NaClO em concentrações maiores que as usuais não causou oxidação excessiva que impedisse o estabelecimento dos ápices caulinares (LIMA; MORAES, 2006). Para o cultivo de *Nicotiana tabacum*, o antibiótico agrimicina foi adicionado ao meio de cultura na concentração de 32,0 mg.L<sup>-1</sup> e apresentou 100% no controle da contaminação bacteriana (NAUE et al., 2007).

Nos ensaios com *Piper divaricatum*, o tratamento T0, sem a assepsia com fungicidas e sem adição de antibióticos ao meio de cultivo, os explantes apresentaram 100% de contaminação e perda total dos explantes. Nos tratamentos T1, T2, T3, T4, T7, T8, T9 e T10, nos quais foram usados estreptomicina ou amoxicilina, na concentração de 100 mg.mL<sup>-1</sup> a contaminação foi reduzida apenas para 33,3%. Nos tratamentos T5 e T6 o aumento na concentração dos antibióticos estreptomicina e amoxicilina para 200 mg.mL<sup>-1</sup> permitiu uma redução de 50% na contaminação dos explantes.

A rifampicina na concentração  $100 \text{ mg.mL}^{-1}$  foi o antibiótico que apresentou os melhores resultados na contenção de bactérias endogênicas, promovendo explantes livres de contaminação. A rifampicina, pertence ao grupo das rifamidas, é indicada para controlar bactérias gram-positivas (POLLOCK *et al.* 1983) e gram-negativas (HALDEMAN *et al.* 1987). É considerada eficiente para o controle e supressão da contaminação endofítica (POLLOCK *et al.* 1983, HALDEMAN *et al.* 1987, VIANNA *et al.* 1997) com baixa ou nenhuma toxicidade em cultivos *in vitro* (FISSE *et al.* 1987, POLLOCK *et al.* 1983).

Nos casos de contaminação por micro-organismos, a melhor medida a ser tomada é o descarte do material. Contudo, na necessidade de manutenção do material vegetal contaminado, torna-se imprescindível efetuar o controle curativo com o uso de antibióticos específicos. Esta medida, nem sempre resulta no controle completo da contaminação e torna-se necessária a combinação de antibióticos alternativos, tanto para utilização em meio de cultura ou banho dos explantes ou na forma de pulverização das plantas matrizes no campo (PEREIRA *et al.* 2003).

Para o estabelecimento da micropropagação foi observado que o meio de cultivo MS (T1, T2, T5, T6 e T11) e  $\frac{1}{2}$  MS (T3 e T4) sem adição de reguladores de crescimento, não apresentaram diferença estatística significativa no desenvolvimento dos ápices caulinares ( $1,52 \pm 0,21 \text{ cm}$ ) (Tabela 3, p.37).

A adição de reguladores de crescimento nos tratamentos T7, T8, T9, T10 promoveu um crescimento de cerca de 60%. Nos tratamentos (T9 e T10) em  $\frac{1}{2}$  MS acrescidos do regulador ANA a  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ , houve a formação de calos que se diferenciaram em raízes aos 60 dias após 3 subcultivos (Fig.5, p.38). Nos tratamentos (T7 e T8) com MS e adição de BAP  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$  os explantes tiveram significativo crescimento da haste caulinar e das folhas, favorecendo multiplicação de novos explantes aos 90 dias, após o terceiro subcultivo (Fig. 6, p.38).

**Tabela 3** Valores médios do crescimento dos ápices caulinares de *P. divaricatum* em função do meio de cultivo e reguladores de crescimento.

Tratamento	Meios de Cultura		Reguladores de Crescimento (0,5 mg.mL <sup>-1</sup> )		Crescimento em altura dos ápices (cm)
	MS	½ MS	BAP	ANA	
T0	X				-
T1	X				1,43 ± 0,25 <sup>a</sup>
T2	X				1,36 ± 0,21 <sup>a</sup>
T3		X			1,46 ± 0,15 <sup>a</sup>
T4		X			1,33 ± 0,21 <sup>a</sup>
T5	X				1,57 ± 0,21 <sup>a</sup>
T6	X				1,80 ± 0,20 <sup>a</sup>
T7	X		X		2,47 ± 0,15 <sup>b</sup>
T8	X		X		2,63 ± 0,21 <sup>b</sup>
T9		X		X	2,36 ± 0,15 <sup>b</sup>
T10		X		X	2,33 ± 0,15 <sup>b</sup>
T11	X				1,66 ± 0,21 <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup> letras diferentes representam diferença estatística significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

A maioria dos estudos *in vitro* concentram-se em *P. nigrum*, devido a sua importância comercial (SALVARO, 2010). Para as espécies *P. betle*, *P. longum*, *P. nigrum*, *P. methysticum* e *P. solmsianum*, o cultivo *in vitro* induziu várias respostas morfogênicas (PHILIP et al., 1992; BHAT et al., 1992, BHAT et al., 1995; SMITH et al., 2002; BALBUENA et al., 2009; VÁSQUEZ et al., 2010). Por outro lado, a indução da embriogênese somática foi frequentemente relatada para *P. nigrum* e *P. columbrinum* (YUSUF et al., 2001; NAIR, GUPTA, 2006).

As espécies *P. hispidinervum* e *P. aduncum* também já tiveram seus protocolos de regeneração desenvolvidos com sucesso, a partir de segmentos nodais de brotos oriundos de sementes germinadas *in vitro* (RAPOSO et al., 2012).

No cultivo *in vitro* de *P. nigrum*, grande parte dos estudos utilizaram como explante os ápices caulinares e segmentos nodais (BHAT et al., 1995). Os ápices caulinares cultivados em meio MS e BAP (0,5 mg.L<sup>-1</sup>) apresentaram maiores taxas de multiplicação das brotações na ausência do carvão ativado usado como controlador da oxidação do meio de cultura (MOURA et al., 2008). Alguns estudos relatam o uso do carvão ativado como um fator negativo nas taxas de multiplicação dos explantes, e por outro lado pode ser benéfico para o aumento do vigor e o número de raízes diminuindo a oxidação dos explantes (COSTA et al., 2006).

Segundo MOURA et al., (2008) a adição de BAP em concentrações abaixo de (0,5 mg.L<sup>-1</sup>) é mais eficiente na indução de brotações e formação de explantes para a pimenta-

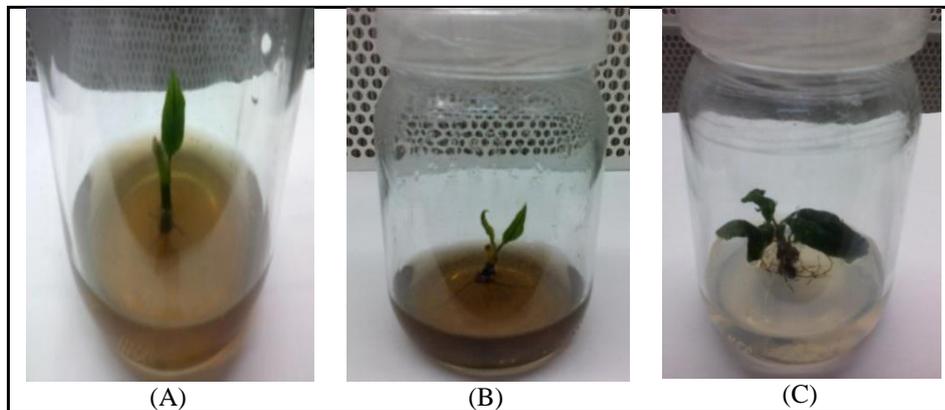
do-reino cv. bragantina e não se estende aos demais genótipos. A comparação entre os meios de cultura, MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) e WPM (LLOYD & MCCOWN, 1986) acrescidos de BAP ( $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ) mostrou um maior número de brotações para o meio WPM, porém com algumas anomalias (SILVA et al, 2003).

**FIGURA 5.** Calo de *P.divaricatum* da UFPA cultivado em meio  $\frac{1}{2}$  MS + ANA  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ .



**FONTE:** Autor (2015)

**FIGURA 6.** Ápices caulinares de *P. divaricatum* oriundos de micro estacas cultivadas em casa de vegetação (A) e (B) Cultivo em meio MS + rifampicina ( $100 \text{ mg.mL}^{-1}$ ); (C) Cultivo em meio MS + BAP  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ .



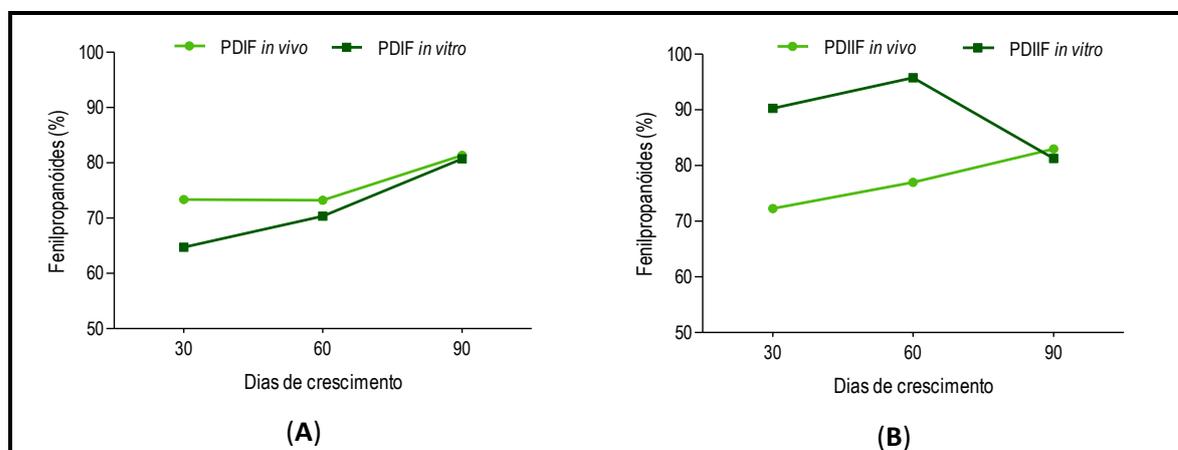
**FONTE:** Autor (2015)

## 5.2 - Produção dos compostos voláteis de *P. divaricatum* no cultivo *in vitro* e *in vivo*

A composição química dos óleos essenciais das folhas e raízes dos espécimes PDI e PDII foi analisada por CG-EM e resultou na identificação em média de 96,1% e 81,4% da composição total das folhas e raízes, respectivamente. Os espécimes PDI e PDII mostraram compostos voláteis nas folhas semelhantes aos reportados na literatura para *P. divaricatum*, os quais destacam o predomínio de fenilpropanóides, em particular o metileugenol (SILVA et al., 2010; ANDRADE, GUIMARÃES e MAIA, 2009).

Para PDI cultivado *in vitro*, a produção de fenilpropanóides foi menor aos 30 dias de crescimento em relação ao cultivo *in vivo*. No entanto, não diferiu estatisticamente aos 60 e 90 dias (Figura 7A). O espécime PDII mostrou um comportamento contrário, aos 30 e 60 dias de crescimento houve maior produção em plantas cultivadas *in vitro* e aos 90 dias a produção foi equivalente ao cultivo *in vivo* (Figura 7B).

**Figura 7.** Produção dos fenilpropanóides nas folhas dos espécimes de *P. divaricatum* durante o cultivo *in vivo* e *in vitro*. (A) PDI, (B) PDII.



No espécime PDI, aos 30 dias de crescimento, as plantas regeneradas *in vitro* produziram como majoritários metileugenol (63,16%), E- $\beta$ -ocimeno (9,79) e  $\beta$ -elemeno (3,93). As principais diferenças em relação ao cultivo *in vivo* foi a diminuição na concentração de eugenol (4,89 – 1,24%) e  $\beta$ -elemeno (8,99 – 3,93%) e a ausência de eugenol acetato. Aos 60 dias de crescimento, no cultivo *in vitro* ocorreu uma diminuição na produção de hidrocarbonetos monoterpênicos (20,22 – 8,52%) como  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, mirceno, limoneno, Z- $\beta$ -ocimeno, E- $\beta$ -ocimeno, *allo*-ocimeno, e uma expressiva redução na concentração de E- $\beta$ -ocimeno (9,67 – 0,88%). Além disso, as plantas *in vivo*, emitiram o 2E-

hexenal (1,70%). Aos 90 dias, não foram observadas diferenças significativas entre os compostos tanto do ponto de vista qualitativo quanto quantitativo.

No espécime PDII, aos 30 e 60 dias de crescimento, as plantas regeneradas *in vitro* produziram como majoritários metileugenol (90,0%),  $\beta$ -elemeno (4,5%) e *E*- $\beta$ -ocimeno (3,7%). As principais diferenças em relação ao cultivo *in vivo* foi a ausência de monoterpenos, com exceção do *E*- $\beta$ -ocimeno e o aumento acentuado na concentração de metileugenol (60,8 - 90,0% e 76,5 - 95,8%). Da mesma forma que no espécime PDI, as diferenças entre o cultivo *in vivo* e *in vitro* foram minimizadas aos 90 dias.

**Tabela 4.** Compostos voláteis produzidos nas folhas no período de 30 a 90 dias no cultivo *in vitro* e *in vivo* para o espécime PDI.

Composto	IR	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>
		PDIF30	PDIF30*	PDIF60	PDIF60*	PDIF90	PDIF90*
2E-hexenal	846				1,70*	0,15	
$\alpha$ - pineno	932			3,91	2,87	0,19	0,04-
$\beta$ -pinene	974			3,79	2,96	0,09	
Mirceno	988		0,22*	0,89	0,62-	0,18	0,19
Limoneno	1024	0,37	0,05+	1,37	0,66-	0,43	0,14-
Z- $\beta$ -ocimeno	1032	0,29	0,27	0,46	0,39	0,23	0,26
E- $\beta$ -ocimeno	1044	<b>7,22</b>	<b>9,79+</b>	<b>9,67</b>	0,88-	<b>6,11</b>	<b>8,69+</b>
<i>allo</i> -ocimeno	1128		0,17*	0,13	0,14	0,07	0,12+
Carvacrol	1298				0,23*		
$\delta$ -elemeno	1335	0,06	0,02		0,04*	0,03	0,03
Eugenol	1356	4,89	1,24-	0,13	0,06-	0,22	0,78+
$\beta$ -elemeno	1389	<b>8,99</b>	3,93-	3,56	0,59-	<b>7,20</b>	4,73-
Metileugenol	1403	<b>63,54</b>	<b>63,16</b>	<b>72,99</b>	<b>69,56</b>	<b>80,95</b>	<b>79,67</b>
$\beta$ -cariofileno	1417	2,33	1,00-	1,25	2,30+	2,09	1,24-
$\beta$ -gurjuneno	1431	0,17	0,06-	0,02	0,09+	0,13	0,07-
$\gamma$ -elemeno	1434				0,06*		
$\alpha$ -humuleno	1452	0,30	0,05-	0,03	0,15+	0,14	0,07-
E-methylisoeugenol	1491			0,05	0,35+	0,01	0,01
<i>trans</i> - muurola-4(14),5-dieno	1493	1,77	1,21	0,44	1,13+	1,27	1,28
Eugenol acetato	1521	<b>6,45</b>					
(Z)-ou(E)-isoelemicina	1550	0,47	0,33-	0,07	0,40+	0,17	0,26+
2,4-di-tert-butilfenol	1561	0,07		0,07	0,23+	0,03	
selina-1,3,7(11)-trien-8-ona	1568				0,45*		
Espatulenol	1577				0,04*		
selin-11-en-4- $\alpha$ -ol	1658				0,06*		
Hidrocarbonetos monoterpênicos		7,88	10,5	20,22	8,52	7,30	9,44
Monoterpenos oxigenados					0,23		
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos		13,62	6,27	5,30	4,36	10,86	7,42
Sesquiterpenos oxigenados					0,55		
Fenilpropanóides		73,35	64,73	73,24	70,37	81,35	80,72
Outros		0,07		0,07	1,93	0,18	
<b>Total identificado</b>		<b>96,87</b>	<b>81,50</b>	<b>98,83</b>	<b>85,96</b>	<b>99,69</b>	<b>97,58</b>

IR: Índice de retenção da literatura, (ADAMS, 2007; NIST 2005). (\*)Compostos produzidos apenas no cultivo *in vitro*, (+) compostos com acréscimo na concentração superior a 30% em relação ao cultivo *in vivo*, (-) Compostos com diminuição na concentração superior a 30% em relação ao cultivo *in vivo*.

**Tabela 5.** Compostos voláteis produzidos nas folhas no período de 30 a 90 dias no cultivo *in vitro* e *in vivo* para o espécime PDII.

Composto	IR	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>
		PDIIIF30	PDIIIF30*	PDIIIF60	PDIIIF60*	PDIIIF90	PDIIIF90*
$\alpha$ - pinene	932	0,32					
$\beta$ -pinene	974	0,18					
Mirceno	988	0,50		0,27		0,09	
Limoneno	1024	0,60		0,61			
Z- $\beta$ -ocimeno	1032	0,70		0,28		0,09	0,05
E- $\beta$ -ocimeno	1044	<b>16,39</b>	3,66-	<b>9,70</b>		<b>5,75</b>	<b>4,43</b>
allo-ocimene	1128	0,30					
Carvacrol	1298	0,48		1,16	0,24-		
$\delta$ -elemeno	1335	0,04				0,02	0,03
Eugenol	1356	<b>8,24</b>	0,06-	0,38		0,13	0,60+
$\beta$ -elemeno	1389	2,45	4,50+	<b>5,24</b>	2,53-	<b>7,54</b>	<b>9,32</b>
Metileugenol	1403	<b>60,79</b>	<b>90,01+</b>	<b>76,54</b>	<b>95,75</b>	<b>82,69</b>	<b>80,53</b>
$\beta$ -cariofileno	1417	0,95	0,77-	1,77	0,32-	1,73	1,94
$\beta$ -gurjuneno	1431	0,04		0,04		0,09	0,11
$\alpha$ -humuleno	1452	0,06		0,06		0,09	0,11
<i>trans</i> -muuro-la-4(14),5-diene	1493	1,01	0,67-	0,89		1,30	1,49
eugenol acetato	1521	2,96					
2,4-di-tert-butilfenol	1561	0,04		0,04			
Z ou E isolelemicina	1568	0,27	0,22	0,06		0,16	0,14
selina-1,3,7(11)-trien-8-ona	1632				0,48*		
Hidrocarbonetos monoterpênicos		19,47	3,66	12,02	0,24	5,93	4,48
Monoterpenos oxigenados		0,48		1,16	0,24		
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos		4,55	5,94	8,00	2,85	10,77	13,00
Sesquiterpenos oxigenados					0,48		
Fenilpropanóides		72,26	90,29	76,98	95,75	82,98	81,27
Outros		0,04		0,04			
<b>Total identificado</b>		<b>96,80</b>	<b>99,89</b>	<b>98,20</b>	<b>99,56</b>	<b>99,68</b>	<b>98,75</b>

IR: Índice de retenção da literatura, (ADAMS, 2007; NIST 2005). (\*)Compostos produzidos apenas no cultivo *in vitro*, (+) compostos com acréscimo na concentração superior a 30% em relação ao cultivo *in vivo*, (-) Compostos com diminuição na concentração superior a 30% em relação ao cultivo *in vivo*.

Para o cultivo *in vitro* e *in vivo* das raízes dos espécimes PDI e PDII, a produção de fenilpropanóides foi baixa. Para PDI, aos 30 dias não foram detectados fenilpropanóides, a classe predominante foram hidrocarbonetos sesquiterpênicos. A produção de fenilpropanóides se iniciou a partir dos 60 (14,3%) e 90 (10,2%) dias, e houve predominância de monoterpenos oxigenados e hidrocarbonetos sesquiterpênicos, respectivamente. De uma maneira geral, hidrocarbonetos monoterpênicos foram detectados em altas quantidades no cultivo *in vivo* e ausentes no cultivo *in vitro*. No cultivo *in vitro* das raízes de PDI, os principais compostos

identificados foram  $\beta$ -cariofileno e  $\alpha$ -selineno (30 dias), carvacrol, metileugenol e selina-1,3,7(11)-trien-8-ona (60 dias), e  $\alpha$ -selineno e elemol (90 dias).

Para as raízes do espécime PDII, aos 30 e 90 dias de cultivo *in vitro* não foram detectados fenilpropanóides. No entanto, não houve diferença expressiva na composição química entre plantas cultivadas *in vitro* e *in vivo*. Os principais constituintes identificados no cultivo *in vitro* das raízes de PDII foram  $\alpha$ -selineno e elemol (30 dias), metileugenol e selina-1,3,7(11)-trien-8-ona (60 dias), e  $\alpha$ -selineno e elemol (90 dias).

**Tabela 6.** Compostos voláteis produzidos nas raízes no período de 30 a 90 dias no cultivo *in vitro* e *in vivo* para o espécime PDI.

Composto	<i>In vivo</i>		<i>In vitro</i>		<i>In vivo</i>		<i>In vitro</i>	
	IR	PDIR30	PDIR30*	PDIR60	PDIR60*	PDIR90	PDIR90*	
$\alpha$ -pineno	932			4,93		6,09		
Canfeno	946			2,13		4,06		
$\beta$ -pineno	974			0,99		1,51		
Mirceno	988			0,83		1,29		
$\alpha$ -felandreno	1002	8,79		<b>12,27</b>		<b>12,72</b>		
$\delta$ -3-careno	1008	9,76		<b>18,58</b>		<b>19,78</b>		
p-cimeno	1020			0,60		0,55		
Limoneno	1024	5,66		<b>13,36</b>		<b>14,80</b>		
Carvacrol	1298				<b>30,02*</b>	0,11		
Tridecano	1300					0,18		
$\beta$ -elemeno	1389			0,43		1,39		
Metileugenol	1403			0,40	<b>16,43+</b>		<b>10,22*</b>	
$\beta$ -cariofileno	1417	6,31	<b>39,61+</b>	2,63		3,96	4,20	
$\alpha$ -humuleno	1452					0,49		
$\beta$ -selineno	1489	<b>13,99</b>		3,41		4,39		
$\alpha$ -selineno	1498	<b>32,97</b>	<b>60,39+</b>	10,60		9,36	<b>38,20+</b>	
Elemol	1548	<b>10,14</b>		10,06		8,69	<b>38,90+</b>	
2,4-di-ter-butyl-fenol	1562	3,08		1,35		0,54		
Espatulenol	1577				5,81*			
selina-1,3,7(11)-trien-8-ona	1632				<b>20,56*</b>	0,35		
Hidrocarbonetos monoterpênicos		24,21		<b>53,69</b>		<b>60,80</b>		
Monoterpenos oxigenados					<b>30,02</b>	0,11		
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos		<b>53,27</b>	<b>100,0</b>	17,07		19,59	<b>42,2</b>	
Sesquiterpenos oxigenados		10,14			26,37	9,04	38,9	
Fenilpropanóides				0,40	16,43		10,22	
Outros		3,08		1,35		0,72		
<b>Total identificado</b>		90,70	100,0	72,51	72,82	90,26	91,32	

IR: Índice de retenção da literatura, (ADAMS, 2007; NIST 2005). (\*)Compostos produzidos apenas no cultivo *in vitro*, (+) compostos com acréscimo na concentração superior a 30% em relação ao cultivo *in vivo*, (-) Compostos com diminuição na concentração superior a 30% em relação ao cultivo *in vivo*.

**Tabela 7.** Compostos voláteis produzidos nas raízes no período de 30 a 90 dias no cultivo *in vitro* e *in vivo* para o espécime PDII.

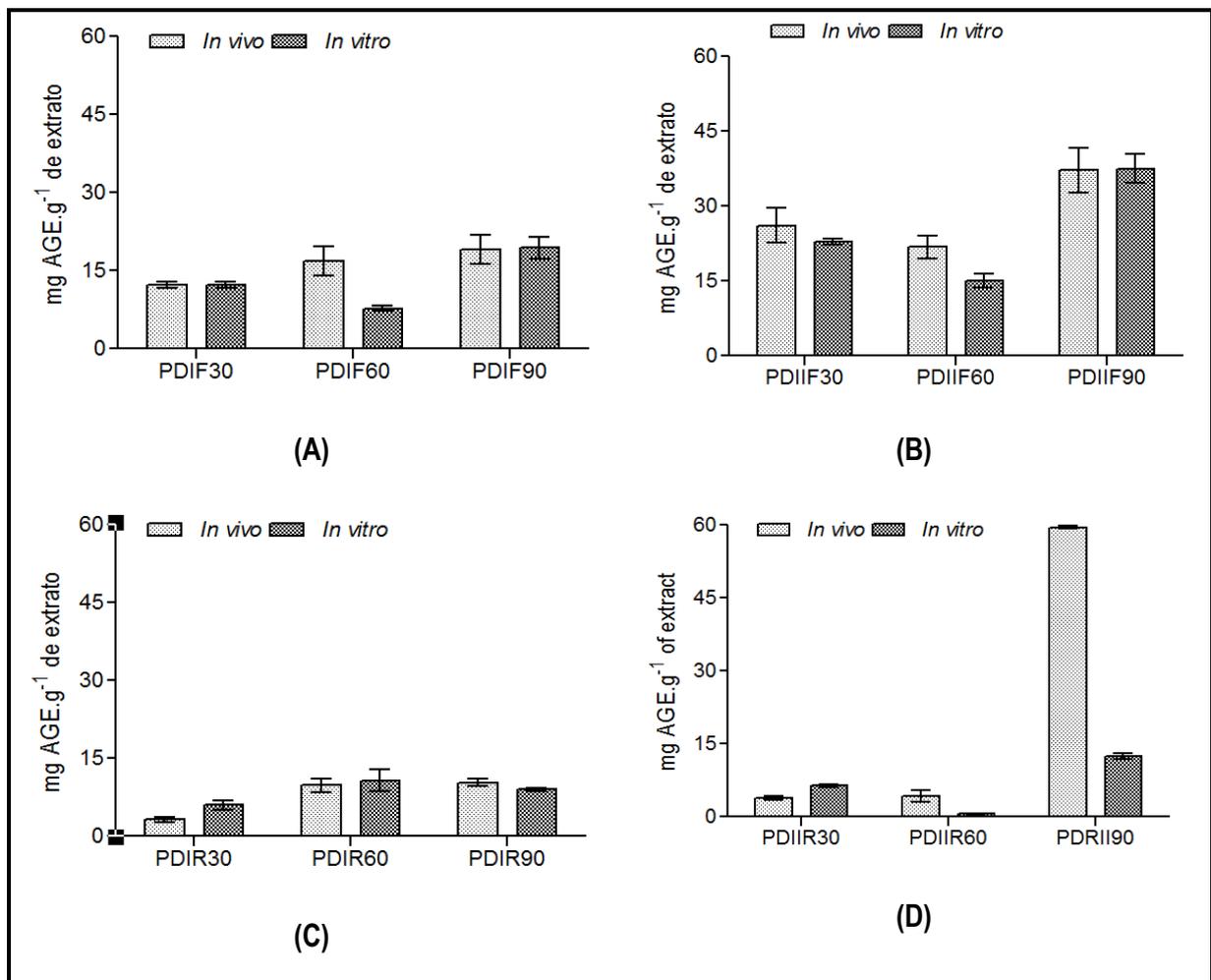
Composto	<i>In vivo</i>		<i>In vitro</i>		<i>In vivo</i>		<i>In vitro</i>	
	IR	PDIIR30	PDIIR30*	PDIIR60	PDIIR60*	PDIIR90	PDIIR90*	
$\alpha$ -pineno	932					3,26	0,26-	
Canfeno	946					0,57		
$\alpha$ -felandreno	1002			6,06	1,12-	2,81	<b>8,88+</b>	
$\delta$ -3-careno	1008			6,86	1,24-	3,92	8,75+	
Limoneno	1024			3,61	0,48-	3,64	3,25	
Carvacrol	1298	<b>15,08</b>		<b>10,19</b>	7,25-			
Tridecano	1300			0,26	2,35+			
$\delta$ -elemeno	1335	0,20						
$\beta$ -elemeno	1389	0,56		1,23	1,16	0,59		
Metileugenol	1403	<b>19,36</b>		<b>10,72</b>	<b>8,64</b>			
$\beta$ -cariofileno	1417	4,83	2,52-	4,76	2,48-	<b>7,42</b>	7,68	
$\gamma$ -elemeno	1434	3,47		1,10	1,91			
$\alpha$ -humuleno	1452				0,14*	1,52	0,92 -	
$\beta$ -selineno	1489	2,43		2,72	0,05-	4,95	0,79-	
<i>trans</i> -muurolo-4(14),5-diene	1493					0,70		
$\alpha$ -selineno	1498	11,23	<b>19,92+</b>	7,88		<b>22,67</b>	<b>23,64</b>	
Elemol	1548		<b>66,34*</b>	9,67	<b>2,79-</b>	<b>9,27</b>	<b>28,26+</b>	
2,4-di-ter-butylphenol	1562			2,57	7,55+			
Espatulenol	1577	3,93						
selina-1,3,7(11)-trien-8-ona	1632	<b>26,48</b>		<b>18,37</b>	<b>17,33</b>	1,18		
Hidrocarbonetos monoterpênicos				16,5	2,84	14,2	21,14	
Monoterpenos oxigenados		15,08		10,20	7,25			
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos		22,72	22,44	17,69	5,74	<b>37,15</b>	<b>33,03</b>	
Sesquiterpenos oxigenados		<b>30,41</b>	<b>66,34</b>	<b>28,04</b>	<b>20,12</b>	11,15	28,26	
Fenilpropanóides		19,36		10,72	8,64			
Outros				0,26	9,90			
<b>Total identificado</b>		87,57	88,78	83,40	54,49	62,50	82,43	

IR: Índice de retenção da literatura. (ADAMS, 2007; NIST 2005). (\*)Compostos produzidos apenas no cultivo *in vitro*, (+) compostos com acréscimo na concentração superior a 30% em relação ao cultivo *in vivo*, (-) Compostos com diminuição na concentração superior a 30% em relação ao cultivo *in vivo*.

### 5.3 - Determinação de fenólicos totais e atividade antioxidante

O teor de compostos fenólicos (TCF) determinado pelo método de Folin Ciocalteu mostrou variações nas folhas e raízes quando comparamos os dois espécimes de *P. divaricatum*. No estágio de 30 a 90 dias de crescimento foliar, houve variação de  $12,3 \pm 0,6$  a  $19,4 \pm 2,1$  mg AGE.g<sup>-1</sup> e  $15,1 \pm 1,4$  a  $37,2 \pm 3,0$  mg AGE.g<sup>-1</sup> para os espécimes PDI e PDII, respectivamente. De uma maneira geral, o TCF nas folhas de PDII foi maior em relação a PDI e ambos demonstraram uma diminuição em relação ao cultivo *in vivo* aos 60 dias. Em relação as raízes, o espécime PDI mostrou poucas variações ao longo dos 90 dias de crescimento ( $3,3 \pm 0,5$  a  $10,7 \pm 2,1$  mg AGE.g<sup>-1</sup>). No entanto, variações drásticas no cultivo *in vivo* foram observadas aos 90 dias para o espécime PDII.

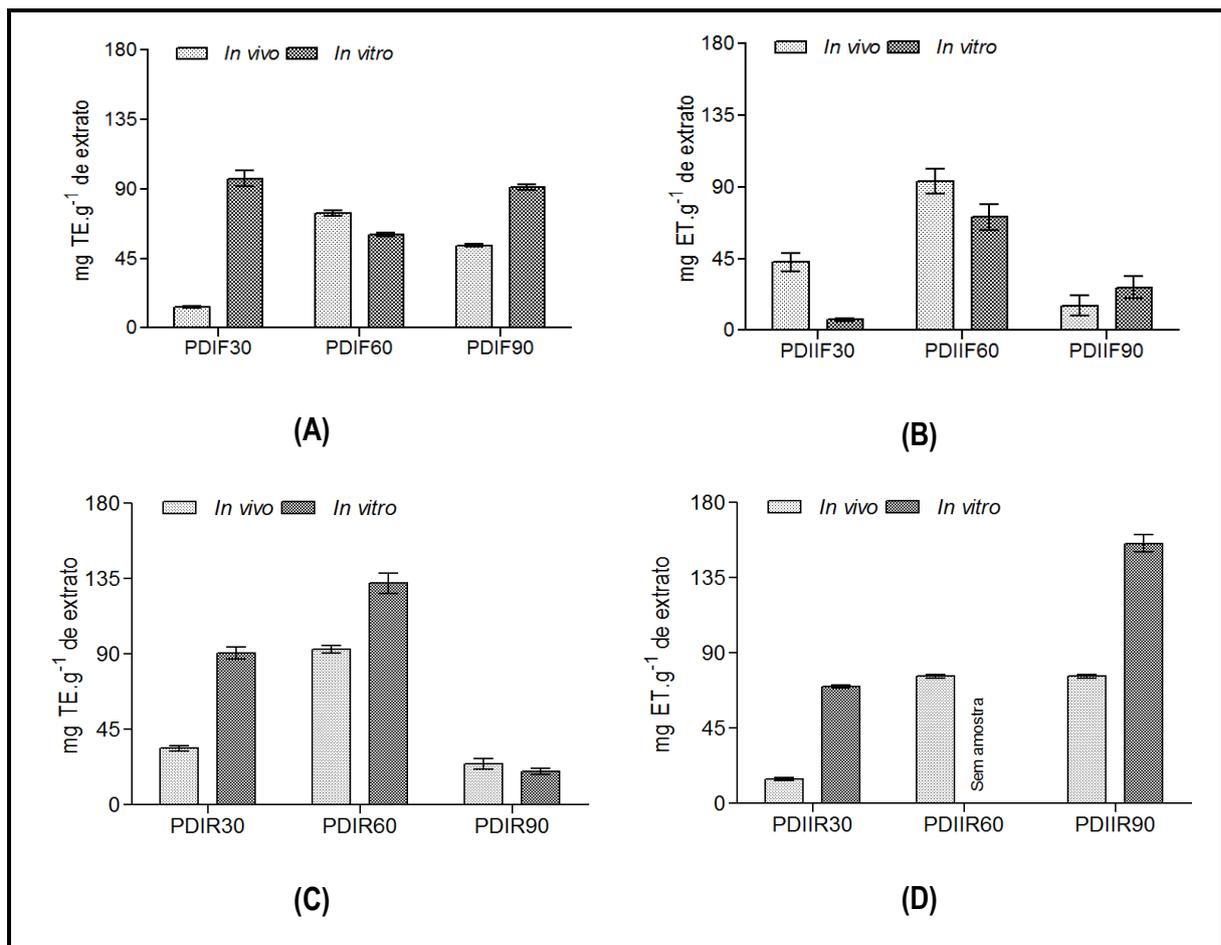
**Figura 8.** Variação do TCF nas amostras de *P. divaricatum* cultivadas *in vivo* e *in vitro* aos 30, 60 e 90 dias de crescimento. (A) Folhas do espécime PDI, (B) Folhas do espécime PDII, (C) Raízes do espécime PDI, (D) Raízes do espécime PDII.



A atividade antioxidante das folhas do espécime PDI foi bastante elevada em relação ao cultivo *in vivo* aos 30 ( $96,5 \pm 4,9 / 14,1 \pm 0,9$  mg TE.g<sup>-1</sup>) e 90 dias ( $53,3 \pm 1,1 / 90,9 \pm 1,9$  mg TE.g<sup>-1</sup>). No entanto, aos 60 dias houve uma ligeira diminuição ( $74,3 \pm 1,9 / 60,1 \pm 1,3$  mg TE.g<sup>-1</sup>). Para o espécime PDII, apenas aos 90 dias foi observada um maior atividade antioxidante nas folhas das plantas regeneradas *in vitro* ( $26,8 \pm 6,9 / 15,6 \pm 6,3$  mg TE.g<sup>-1</sup>).

Para o cultivo *in vitro* das raízes do espécime PDI, a atividade antioxidante foi maior aos 30 ( $90,5 \pm 3,7 / 33,7 \pm 1,5$  mg TE.g<sup>-1</sup>) e 60 ( $132,2 \pm 6,0 / 92,8 \pm 2,3$  mg TE.g<sup>-1</sup>) dias de cultivo com diminuição aos 90 dias ( $24,4 \pm 3,0 / 19,9 \pm 1,8$  mg TE.g<sup>-1</sup>); Para o espécime PDII este aumento foi observado aos 30 e 90 dias de cultivo *in vitro*.

**FIGURA 9.** Variação da atividade antioxidante das amostras de *P. divaricatum* cultivadas *in vivo* e *in vitro* aos 30, 60 e 90 dias de crescimento. (A) Folhas do espécime PDI, (B) Folhas do espécime PDII, (C) Raízes do espécime PDI, (D) Raízes do espécime PDII.



A composição dos metabólitos secundários de plantas medicinais pode ser influenciada pelo estágio de desenvolvimento, em que são coletadas (EL SENOUSY et al., 2014). Para os espécimes PDI e PDII, podemos observar um aumento de 60% na acumulação de compostos fenólicos nas folhas em função do tempo no cultivo *in vivo* e *in vitro* em relação aos 30 dias de crescimento. Ao longo do experimento, o TCF das folhas das plantas regeneradas *in vitro* não apresentaram diferenças estatísticas em comparação com as plantas *in vivo* com exceção aos 60 dias em ambos espécimes. Os resultados reforçam a informação de que plantas regeneradas *in vitro* podem acumular metabólitos secundários semelhantes aos encontrados na planta-mãe, especialmente aqueles que são sintetizados e / ou armazenados nas partes aéreas (SHILPA et al., 2010, AMOO et al., 2012).

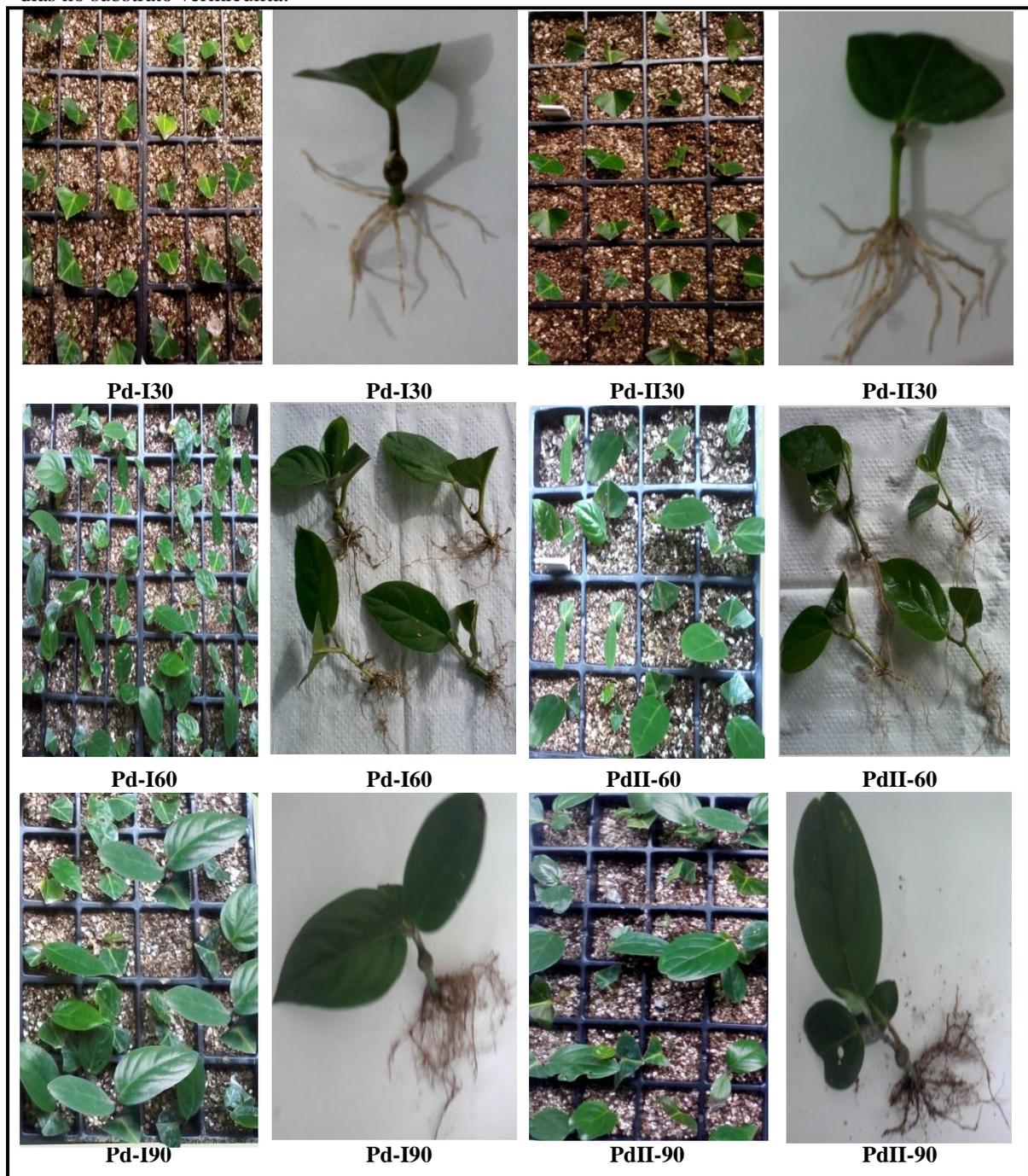
Os compostos fenólicos são comumente encontrados em plantas comestíveis e não comestíveis e apresentam múltiplos efeitos biológicos, incluindo a atividade antioxidante (THIRUVENGADAM et al., 2014). Diferentes tipos e concentrações de reguladores de crescimento de plantas têm sido relatados para regular os processos de desenvolvimento e modificar a concentração dos metabólitos secundários em várias espécies (PALACIO et al, 2008; BASKARAN et al, 2012).

No cultivo *in vitro* de *Cucumis anguria* (maxixe), o teor de compostos fenólicos, flavonóides e potencial antioxidante foram significativamente maiores do que nas plantas *in vivo*. Para tal, foi utilizado no cultivo o meio MS suplementado com sacarose a 3% contendo uma combinação de TDZ 3,0 mM, AIB 1,0 mM e espermidina 75mM e para o desenvolvimento das raízes foi utilizado AIB 1,0 mM e putrescina 50 µM (THIRUVENGADAM, CHUNG, 2015). O mesmo efeito foi observado para o cultivo *in vitro* de *Coleonema pulchellum* (Rutaceae). No entanto, além dos reguladores de crescimento de plantas, foram utilizados indutores orgânicos (OES) como hidrolisado de caseína, hemoglobina, glutamina e mebendazol (BASKARAN et al, 2014)

#### 5.4 - Cultivo *in vivo*

No cultivo *in vivo*, os segmentos nodais de *P. divaricatum* apresentaram enraizamento no substrato vermiculita com acréscimo de soluções nutritivas sem a adição de reguladores de crescimento e umidade apropriada (Figura 10). Foi possível observar que as micro estacas coletadas na EMBRAPA (**Pd-II**) apresentaram seu desenvolvimento um pouco mais lento em relação as coletadas na UFPA (**Pd-I**)

**FIGURA 10.** Segmentos nodais de *Piperdivaricatum* UFPA e EMBRAPA com enraizamento aos 30, 60 e 90 dias no substrato vermiculita.



FONTE: Autor (2015)

## 6 - CONCLUSÕES

- ✓ Quanto a propagação vegetativa de *P. divaricatum*, foram obtidos resultados satisfatórios no substrato vermiculita com a adição de solução nutritiva de MS. Esta também pode ser uma alternativa eficiente de propagação desta espécie.
- ✓ A adição dos reguladores de crescimento ANA e BAP na concentração  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$  proporcionaram resultados satisfatórios para o cultivo *in vitro* de *P. divaricatum*.
- ✓ Os metabólitos secundários nos cultivos *in vivo* e *in vitro* não apresentaram diferenças qualitativas nas folhas
- ✓ Ocorreram mudanças expressivas nos metabólitos das raízes
- ✓ Os resultados sugerem que a propagação em larga escala de *P. divaricatum* pode ser obtida por ambas tecnologias com a manutenção do perfil químico dos compostos bioativos existentes na parte aérea.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. Identification of Essential Oil Components by GasChromatography / Mass Spectrometry. **AlluredPublishingCorporation**, United States, 804p, 2007.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 5ª Edição. Editora Artmed.2010.
- AMOO S.O, AREMU A.O, VAN STADEN J. *In vitro* plant regeneration, secondary metabolite production and antioxidant activity of micropropagated *Aloe arborescens* Mill. **Plant Cell Tissue**.v.111, n.3 p. 345–58, 2012.
- ANDRADE, S. R. M de. **Princípios da cultura de tecidos Vegetais**. Planatina: Embrapa Cerrados, 2002. 15p.
- ANDRADE, E. H. A.; GUIMARÃES, E. F.; MAIA, J. G. S. **Variabilidade química em óleos essenciais de espécies de Piper da Amazônia**, Belém, FEQ/UFPA, 448p, 2009.
- AVELLA, E.; PEÑA, L.A ; PUENTES de Diaz, A.M. "Memorias V Congreso Colombiano de Fitoquímica" Medellín, Colombia, 168p, 1994.
- BALBUENA, T. S., & Floh, E. I. S. Aspectos morfogénéticos e metabólitos secundários em *Piper solmsianum* e *Piper aduncum*. **Journal of Chemical Ecology**. v.31, n.7, p.1567-1578, 2006.
- BALBUENA, T. S. et al . *In vitro* morphogenesis and cell suspension culture establishment in *Piper solmsianum* C.DC.(Piperaceae). **Acta Botanica Brasilica**. v.23, n.1, p. 274 - 281, 2009.
- BALANDRIN, M. J, KLOCKE, J. A. Medicinal, aromatic and industrial materials from plants. Biotechnology in agriculture and forestry. **Medicinal and aromatic plant**, vol. 4. Berlin: Springer-Verlag, p. 1–36, 1988.
- BASKARAN, P., MOYO, M., VAN STADEN, J. *In vitro* plant regeneration, phenolic compound production and pharmacological activities of *Coleonema pulchellum*. **South African Journal of Botany**, v. 90,p. 74-79, 2014.

BASKARAN, P., NCUBE, B., VAN STADEN, J. *In vitro* propagation and secondary product production by *Merwill aplumbea* (Lindl.) Speta. **Plant Growth Regulation** v. 67, p. 235–245, 2012.

BARBOSA, R.I et al. Reproductive phenology of the main tree species in the Roraima savanna, Brazilian Amazon. **Ecotropica**, v.18 p.81-91, 2012.

BERTOZZO, Fernanda; MACHADO, Isaac Stringueta. Meios de cultura no desenvolvimento de ápices caulinares de mamoneira (*Ricinus communis* L.) *in vitro*. **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 6, p. 1477-1482, 2010 .

BERTONCELLI, D. J., HASSE, I., OLIVEIRA, M.C. Desinfestação e Estabelecimento *in vitro* de Explantes de *Jacarandamimosaeifolia* D. Don. III Seminário: Sistemas de Produção Agropecuária. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2009.

BHAT, S.R. et al. Plant regeneration from various explants of cultivated *Piper* species. **Plant Cell Reports**, v.14, n.6 p.398-402, 1995.

BHAT, S.R. KACKARA and CHANDELKPS. Plant regeneration from callus cultures of *Piper logum* L. by organogenesis. **Plant Cell Reports**. v.11, n.10, p.525-528. 1992.

BUENO, L. C. de S.; MENDES, A.N.G.; CARVALHO, S.P. Melhoramento genético de plantas: princípios e procedimentos. 2. Ed. Lavras: UFLA, 2006. 319 p.

CABRAL, E.L.; BARBOSA, D.C.A.; SIMABUKURO, E. A. Armazenamento e germinação de sementes *Tabebuia aurea* (Manso) Benth. EHook. F. Ex. S. Moore. **Acta Botânica Brasilica**, v. 17, n 4, p. 609-617, 2003.

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

CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, p.183-260,1998.

COSTA, F. H. S. et al. Efeito da interação entre carvão ativado e N6 - benzilaminopurina na propagação *in vitro* de bananeira, cv. Grand Naine (AAA). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 2, p. 280-283, 2006.

CORNÉLIO, I. N.; HARIDASAN, P. Desinfestação de gemas laterais de mamoeiro (*Caricapapaya* L.) provenientes de vários locais do Distrito Federal. In: V Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal. Resumos. Lavras: UFLA. p. 136, 1995.

CROTEAU R, KUTCHAN TM, LEWIS NG. Natural Products (Secondary Metabolites). In: Buchanan B., Grissem W., Jones R. (Eds.) **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**, Rockville: American Society of Plant Physiologists, p.1250-1318,2000.

D'ABROSCA, B et al. Low Molecular Weight Phenols from the Bioactive Aqueous Fraction of *Cestrum parqui*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 13, p. 4101–4108, 2004.

DANELUTTE, A.P. et al. Divergence of secondary metabolism in cell suspension cultures and differentiated plants of *Piper cernuum* and *Piper crassinervium*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v16, n.6,p. 1425-1460, 2005.

DONNI, L.P., et al. Preparo de laminas foliares de Aráceas ornamentais: desinfestação com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. **Arquivos do Instituto Biológico**. v.72, n.4, p. 517-522, 2005.

DONATO, V.M. et al. Plantas de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro* com antibióticos. **Ciência e Agrotecnologia**, v.29: p. 134-141, 2005.

DUARTE, M. C. T., et al. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. **Journal of Ethnopharmacolog**, v.111, n.2, p.197–201, 2007.

EL SENOUSY, A.S. et al. Developmental changes in leaf phenolics composition from three artichoke cvs. (*Cynarascolymus*) as determined via UHPLC–MS and chemometrics. **Phytochemistry**.v.108 p. 67–76, 2014.

ESPINDULA, M. C. et al. Efeitos de reguladores de crescimento na elongação do colmo de trigo. **Acta Scientiarum. Agronomy**. Maringá, v. 32, n. 1, p. 109-116, 2010.

FERRI, M. G. **Fisiologia Vegetal**, v. 1 e 2. 2<sup>nd</sup>ed. São Paulo: EPU, 1985,361p.

FERRARI, S. et al. Desenvolvimento e produtividade do algodoeiro em função de espaçamentos e aplicação de regulador de crescimento. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 30, n. 3, p. 365-371, 2008.

FERNANDES, E. C. **População de plantas e regulador de crescimento afetando a produtividade de cultivares de trigo**. Dissertação (Mestrado em Agronomia). 2009. 99f. Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2009.

FILHO, C. F. D. Cultura de Tecidos de Plantas. Micropropagação. Jaboticabal: FUNEP, 1995. 25 p.

FISSE, J., A. BATLLE ; J. PERA. Endogenous bacteria elimination in ornamental explants. **Acta Horticulturae**, v. 212 n.1 p. 87-90, 1987.

FOWLER, M. W, SCRAGG, A. H. Natural products from higher plants and plant cell culture. **Plant cell biotechnology**. NATO ASI Series, v. 18. Berlin: Springer-Verlag, p. 165–77, 1988.

FRANÇA, S.C. Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas. In: SIMÕES, C.M.O. et al. (Org). Farmacognosia: da planta ao medicamento. **Rev. Porto Alegre** v.5, n. 2, p.105-124, 2003.

FUMAGALI et al. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecido de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Angiosperma*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v. 18, n.4, p. 627-641, 2008.

GOBBO-NETO, Leonardo; LOPES, Norberto P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova** [online]. vol.30, n.2, p. 374-381. 2007.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; GUEDES, R. da S. **Embriogênese somática e regeneração de plantas de dendezeiro**. Dssertação (Mestrado em Agronomia 126f.) – Centro de Ciências Biológicas e da Natureza, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, AC, 2008.

GUIMARÃES, E. F.; GIORDANO, L.C.S. Piperaceae do nordeste brasileiro I: Estado do Ceará. **Rodriguésia**. v. 55 p. 21-46, 2004.

HALDEMAN, J. H. ; THOMAS, R. L. &McKAMY, D. L. Use of benomyl and rifampicin for *in vitro* shoot tip culture of *Camellia sinensis* and *C. japonica*. *Hort Science*, Alexandria, 22:306-307, 1987.

HIRATA, M.H e MANCINI FILHO, J. **Manual de biossegurança**. Barueri: Ed. Manole, 2002. 496p.

HOLFORD, P.Ç NEWBURY, H.J. The effects of antibiotics and their breakdown products on the *in vitro* growth of *Anturrrhinummanjus*. **Plant cell report**, Berlun, v 11, n.2, p. 93-96, 1992.

HOPKINS, W. G. **Introduction to Plant Physiology**. 2<sup>nd</sup> ed. New York: John Wiley & Sons, Inc, 512 p. 2000.

HUSSAIN, W. et al. Reproducible culture and differentiation of mouse embryonic stem cells using an automated microwell platform. **Biochemical Engineering Journal**, v.77 n.2 p.246-257, 2012.

IWU, M. M. **Handbook of African medicinal plants**. CRC Press, Boca Raton, FL, 435 p, ed. 1993., 60: 3864-3874, 1991.

KERBAUY, G. B. Clonagem de plantas *in vitro*. **Biotechnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 1, n. 1, p. 30-33, Maio 1997.

LAMAS, F. M. **Reguladores de crescimento**. In: EMPBRAPA AGROPECUÁRIA OESTE. Algodão: Tecnologia de produção. Embrapa agropecuária oeste, Embrapa Algodão, Dourados, 2001. 296p.

LIMA, J.D. ; MORAES, W.S. Concentração de benzilaminopurinae avaliação de protocolo para multiplicação *in vitro* de genótipos de bananeira. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 36: 13-19. 2006.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Proceedings International Plant Propagator's Society**, v.60, n.15 p.421-427, 1986.

MAIA, J. G. S. et al . Constituents of the Essential oil of *Piper aduncum* L. Growing Wild in the Amazon Region. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 13, n. 4 p. 269-272, 1998.

MAMIDALA, P.; NANNA, R.S. Efficient *in vitro* plant regeneration, flowering and fruiting of dwarf Tomato cv. Micro-Msk. **Plant Omics Journal**, Lindfield, v.2, p.98-102, 2009.

MEIRELES. E. das N. Influência dos metabólitos secundários de *Piper divaricatum* da região Amazônica no controle do *Fusarium solanif.sp. piperis* causador da fusariose em pimenta-do-reino. 2014. 83 p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Pará. Belém-PA, 2014.

MISAWA, A. Effects of modification of the primary precursor level by selection and feeding on indole alkaloid accumulation in *Catharanthus roseus*. **Biotechnology Advances**. p.250-256, 1985.

MOURA, M.F. et al .A proposal for building domain topic taxonomies. In: Whorkhapon web and text intelligence, 1.; Simpósio Brasileiro de Inteligência Artificial, v. 1, n. 19, p.83-84, 2008.

MONTARROYOS, A.V.V. Contaminação *in vitro*. **ABCTP Notícias**, Brasília, n. 36 e 37, p. 5-10, 2000.

MOREIRA, D. L.; GUIMARÃES, E. F.; KAPLAN, M. A. C. A cromeno from *Piper aduncum*. **Phytochemistry**. v. 48, n. 6, p. 1075 – 1077, 1998.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NAIR, R. R.; GUPTA, S.D. High-frequency plant regeneration through cyclic secondary somatic embryogenesis in black pepper (*Pipernigrum* L.). **Plant Cell Reports**.v.24. n.12 p. 699-707, 2006.

NAUE, C.R; BENITIZ, L.B; MEDEIROS, C.V. Eliminação de contaminantes microbianos de cultura de tecidos de *Nicotina tabacum* L. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, v. 16, 2007. Pelotas, RS: Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, p.1-5, 2007.

PALACIO, L. et al. *In vitro* propagation of Jarilla (*Larreadivaricata* Cav.) and secondary metabolite production. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. V.31, p. 2321–2325, 2008.

PASQUAL, M. **Textos acadêmicos**: meios de cultura. Lavras: FAEPE/UFLA, 2001. 127 p.

PASQUAL, M. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações: meios de cultura.** Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 74 p.

PECKOLT, T.; PECKOLT, G. **História das plantas medicinais e úteis do Brasil.** Rio de Janeiro, Ed. Lemmert, 1888.

PEREIRA, G.A. et al. Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de explantes de bananeira 'IAC 2001' em diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v. 3, n. 2, p. 43-46, 2009.

PEREIRA, J.E.S.; MATTOS, M.L.T.; FORTES, G.R.L. Identificação e controle com antibióticos de bactérias endofíticas contaminantes em explantes de batata micropropagados. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. v 38, n.7, p. 827-834, 2003.

PHILIP, V.J. et al. Micropropagation of black pepper (*Piper nigrum*Linn.) through shoot tip cultures. **PlantCellReports**, v.12, n.1 p.41-44, 1992.

PHILLIPSON, J.D. Plants as source of valuable products. **Secondary products from plant tissue culture.** Oxford: Clarendon Press, p.1-21 1990.

POLLOCK, K.; BARFIELD, D.G.; SHIELD, R. The toxicity of antibiotics to plant cell culture. **PlantCellReports**, New York, v. 2, p. 36-39, 1983.

RAPOSO, A. et al. Enraizamento *in vitro* das espécies *P. hispidinervum* e *P. aduncum* utilizando diferentes concentrações de AIA. In: Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos, 2., Belém, PA. 2012.

RAVISHANKAR, J.T.S, e VENKATARAMAN, L.V. Separation of capsaicin from the phenylpropanoid compounds by high performance liquid chromatography to determine the biosynthetic status of cells and tissues of capsicum frutescens. *Mill in vivo and invitro*. **Journal of Agricultural and food Chemistry**. v 40, n. 20, p. 2461-2463, 1993.

REGASINI, L.O.; et al. Radical Scavenging Capacity of *Piper arborerum* and *Piper tuberculatum* (Piperaceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v27, n.6, p. 900 - 903, 2008.

RIBAS, C.R., SCHOEREDER, J. H., PIC, M., SOARES, S. M. Tree heterogeneity, resource availability, and larger scale processes regulating arboreal ant species richness. **Austral Ecology**, 28, p. 305-314. 2003.

RODRIGUES, O.; VARGAS, R. **Efeito de regulador de crescimento cycocel e de altas doses de adubação nitrogenada em trigo**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2002. 23p. html (Embrapa Trigo. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento Online, 7). Disponível: < [http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p\\_bp07.htm](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_bp07.htm).> Acesso em 15 de julho de 2015.

SILVA, C. V. et al. Seed germination of “uvaia” (*Eugenia pyriformis* Cambess. - Myrtaceae) after cutting. **Revista Brasileira Botânica**, São Paulo, v. 26, n. 2, p. 213-221. 2003.

SANTIAGO, E. J.A et al. Aspectos da anatomia foliar da pimenta-longa (*Piper hispidinervium* C.DC.) sob diferentes condições de luminosidade. **Ciência e Agrotecnologia**, v.25, n.5, p.1035-1042, 2003.

SANTOS AS, et al. A Dehydrorotenoid produced by callus tissue culture and wild plant roots of *Boerhaaviacoccinea*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* v.17, p.538-541, 2007.

SALVARO, Luciani Marcia Scherer. Reguladores vegetais e poliaminas na organogênese *in vitro* de *Piper hispidinervium* Candolle de Candolle: análise biométricas e bioquímicas / Luciani Marcia Scherer Salvaro. – Botucatu : [s.n.],2010. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2010

SILVA, A. S. et al. Estabelecimento *in vitro* de cultura de meristema de cultivares de pimenta-do-reino. In: Seminário de iniciação científica da Embrapa Amazônia Oriental, v.15, n. 9, p.1-4, 2011.

SILVA, R. V. da et al. Antifungal amides from *Piper arboretum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v. 59, n. 5, p.521-527, 2002.

SILVA, J. K. R. da et al. Essential Oil Composition, Antioxidant Capacity and Antifungal Activity of *Piper divaricatum* Meyer. **Natural Product Communications**, v. 5, n.3, p. 477-480, 2010.

SILVA, J. K. R. da et al. Essential oils of Amazon *Piper* species and their cytotoxic, antifungal, antioxidant and anti-cholinesterase activities. **Industrial Crops and Products**, v. 58, n. 2, p.55-60, 2014.

SILVA, J. K. R. da et al. Antioxidant capacity and larvicidal and antifungal activities of essential oils and extracts from *Piper krukoffii*. **Natural Products Communications** v. 6, n. 9, p.1361-1366, 2011.

SILVESTRINI A, et al. Effect of alkaloid precursor feeding on a *Camptothecaacuminata* cell line. **Plant Physiology Biochemistry** v.40 p.749-753, 2002.

SHILPA, K., et al. *In vitro* root culture of *Ocimum sanctum* L. and evaluation of its free radical scavenging activity. **Plant Cell Tissue Organ Cult.** v.9. p.101-105, 2010.

SHEPHERD, S.L.K. O jardim secreto das plantas. **Ciência Hoje** v.19p. 59-62, 1995.

SMITH, J. Micro-propagation of the *Gynerium Lily*: a report for the Rural Industries Research and Development Corporation. Kingston: RIRDC, 2000. 59p.

SMITH, P.K. et al .Definitions of bullying: A comparison of terms used, and age and gender differences, in a fourteen-country international comparison. **Child Development**, v. 73, n.4 1119-1133, 2002.

SOUZA, A. S. et al. **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2006 a. 152p.

STAFFORD et al . Plant Cell Biotechnology: a perspective. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 8 p. 577-587, 1986.

S. RAMACHANDRA RAO, G.A. RAVISHANKAR. Chemical factories of secondary metabolites. Plant cell cultures .**Biotechnology Advances** v.20 . n. 4, p. 101–153, 2002.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal.4 ed. Porto Alegre, 2009. 819 p.

TAKAYA et al.Aerobic denitrifying bacteria that produce low levels of nitrous oxide. **Applied and Environmental Microbiology**., v. 69 p. 3152–3157, 2003.

THIRUVENGADAM, M., PRAVEEN, N., KIM, E.H, KIM, S.H, CHUNG, I.M. Production of anthraquinones, phenolic compounds and biological activities from hairy root cultures of *Polygonum multiflorum* Thunb. *Protoplasma* , v.251, p. 555–66, 2014.

THORPE, T.A.; HARRY, I.S. Application of tissue culture to horticulture.**Acta Horticulturae**, v. 447, p. 39-49, 1997.

TOMBOLATO, A. F. C.; COSTA, A. M. M. Micropropagação de plantas ornamentais. Campinas: Instituto Agrônomo, 1998. 72 p. (Boletim Técnico n.174).

TORRES, A. C. et al. **Glossário de biotecnologia vegetal**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000, 128 p.

TORRES, A. C., L. S. CALDAS; A. T. FERREIRA. 1998. Retrospectiva da cultura de tecidos em plantas. p. 11- 20. In Torres, A. C., CALDAS, L.S. & J. A. BUSO (Ed.). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Vol. I. CNPH-Embrapa, Brasília. 509 p

TREHARNE, K. J. et al. Growth regulation of arable crops. **Plant growth substances**. Berlin: Springer-Verlag, p.343-374, 1995.

TRUVENGADAM, M, CHUNG, I-M. Phenolic compound production and biological activities from in vitro regenerated plants of gherkin (*Cucumis anguria* L.). **Electronic Journal of Biotechnology**. In Press, Corrected Proof, Available online 30 May 2015.

USIA, T. et al. Metabolite-cytochrome P450 complex formation by methylenedioxyphenyllignans of *Piper cubeba*: mechanism-based inhibition. **Life Science**, v.76.n.4 p.2381- 2391, 2005.

VALLE, R C S C. Estratégias de cultivo de células de Pimenta longa (*Piper hispidinervum*) e determinação de parâmetros cinéticos. 2003, 165p. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC, 2003.

VAGANAN, M.M., et al. Phenylpropanoid enzymes, phenolic polymers and metabolites as chemical defenses to infection of *Pratylenchus coffeae* in roots of resistant and susceptible bananas (*Musa* spp.). **Indian Journal of Experimental Biology**. v.52. n.3.p.252-260, 2014.

VÁSQUEZ N, et al. Tissue culture and production of secondary metabolites from micropropagated plants of *Piper solmsianum*. **CiencTecnolHumanid UNPRG**, v.1, n.2, p 15 – 21, 2010.

VIEGAS Jr et al. Os Produtos Naturais e a Química Medicinal Moderna. **Química Nova**, v. 29, n.2 p.326-337, 2006.

VILLALOBOS, V. M; T.A THORPE, Micropropagación conceptos metodología y resultados En: Roca, W y Mroginski, L.A (eds.) Cultivo de tejidos em la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones **CIAT**, v.12 ,n.7 p. 127-141. 1991

WENDLING, I.; DUTRA, L. F.; GROSSI, F. **Produção de mudas de espécies lenhosas.** Dados eletrônicos. – Colombo: Embrapa Florestas, 2006.

YUNCKER, T .G.The Piperaceae of Brazil. II. *Piper* group V; *Ottonia*; *Pothomorphe*; *Sarcorhachis*. **Hoehnea** v. 3 p. 29-284, 1973.

YUSUF A, Thyagi RK, Malik SK. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf segments of *Piper colubrinum*. **Plant Cell Tiss Org Cult.** v.65 p. 255 – 258, 2001.

ZAGONEL, J. et al. Doses de nitrogênio e densidade de plantas com e sem um regulador de crescimento afetando o trigo, cultivar OR-1. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 1, p. 25-29, 2002.