



FABIANE APARECIDA ARTIOLI

**CARACTERIZAÇÃO CELULAR E AVALIAÇÃO
DE VITAMINA C E FENÓIS TOTAIS EM
CALOS DE *Passiflora gibertii* N. E. Brown**

**LAVRAS – MG
2010**

FABIANE APARECIDA ARTIOLI

**CARACTERIZAÇÃO CELULAR E AVALIAÇÃO DE VITAMINA C E
FENÓIS TOTAIS EM CALOS DE *Passiflora gibertii* N. E. Brown**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

PhD Renato Paiva
Orientador

Dr. Sandro Barbosa
Coorientador

LAVRAS – MG

2010

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Artioli, Fabiane Aparecida.

Caracterização celular e avaliação de vitamina C e fenóis totais em calos de *Passiflora gibertii* N. E. Brown / Fabiane Aparecida Artioli. – Lavras : UFLA, 2010.

94 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: Renato Paiva.

Bibliografia.

1. FDA. 2. Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio. 3. Cultura de tecidos. 4. Compostos secundários. 5. Ácido ascórbico. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 581.0724

FABIANE APARECIDA ARTIOLI

**CARACTERIZAÇÃO CELULAR E AVALIAÇÃO DE VITAMINA C E
FENÓIS TOTAIS EM CALOS DE *Passiflora gibertii* N. E. Brown**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 25 de junho de 2010.

Dr. Sandro Barbosa

UNIFAL

Dra. Ana Hortência Fonsêca Castro

UFSJ

PhD Renato Paiva
Orientador

Dr. Sandro Barbosa
Coorientador

**LAVRAS – MG
2010**

*Aos meus pais, Laerte e Rosa, pela educação, amor, companheirismo e exemplos de caráter e luta. A minha irmã, Tatiane, pelas portas abertas e apoio.
Ao meu namorado, João Paulo, por todo amor, paciência e força.*

OFEREÇO.

As minhas amigas, Amanda, Carla e Kamila, pelos momentos de união, companheirismo e perseverança.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal.

À Capes, pela concessão da bolsa de estudos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), pelo apoio financeiro ao projeto.

Ao meu orientador, Prof. Renato Paiva, PhD, pela confiança, oportunidade e apoio.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Sandro Barbosa, pela amizade, dedicação e colaboração.

À Profa. Dra. Ana Hortência Fonsêca Castro e ao pesquisador Dr. Marcelo Murad Magalhães, membros da banca examinadora, pelas contribuições.

Ao amigo Luciano Coutinho, pelo apoio, paciência, ensinamentos e companheirismo.

Ao Prof. Dr. Luiz Alberto Beijo, pela disponibilidade de ajuda.

À amiga Tininha, por toda paciência e profissionalismo.

Aos amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, pela amizade construída durante esse período de minha vida, que propiciou um ambiente de trabalho agradável e divertido, do qual, certamente, sentirei imensas saudades.

Aos servidores técnico-administrativos do Setor de Fisiologia Vegetal, pelo auxílio prestado.

Aos amigos do mestrado e do doutorado do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, por compartilharem momentos difíceis e felizes.

Aos amigos das Ciências Biológicas 2004/2 – UNIFAL.

Ao pesquisador e amigo Wilson Barbosa, do Instituto Agrônomo de Campinas.

Ao amigo Hugo Tenório, responsável por me apresentar saborosas frutas e enriquecer meu conhecimento sobre elas.

A todos que, de certa forma, contribuíram para a finalização deste trabalho.

RESUMO GERAL

Considerando a variabilidade para resistência às principais doenças do maracujazeiro, as propriedades medicinais e o potencial que culturas de células e tecidos vegetais apresentam para a produção de compostos bioativos de interesse para a indústria farmacêutica, o objetivo desse trabalho foi realizar uma avaliação de vitamina C e fenóis totais, bem como caracterizar células de calos obtidos de segmentos foliares do maracujazeiro silvestre *Passiflora gibertii*. Para isto, o trabalho foi dividido em 3 etapas. A primeira consistiu na indução de calos em segmentos foliares de *P. gibertii*, utilizando meio de cultura MS, contendo metade das concentrações de seus sais, 3% de sacarose, 0,6% de ágar, pH 5,8; com concentrações de Cinetina combinadas com diferentes concentrações de Picloram. A indução de calos mostrou-se fortemente dependente da combinação dos reguladores de crescimento, sendo que sob a ausência do Picloram no meio de cultivo não houve indução de calos. Na segunda etapa foram analisados os teores de vitamina C e fenóis totais na folhas e nos calos de *P. gibertii*, sendo estes obtidos de quatro diferentes concentrações de Cinetina e Picloram no meio de cultivo MS. As folhas apresentaram teores de 127,495 e 708,63 mg 100g⁻¹ de vitamina C e fenóis, respectivamente. Para ambos os compostos analisados, os teores foram menores nos calos, os quais apresentaram valores máximos de vitamina C (94,756 mg 100g⁻¹) e de fenóis totais (66,213 mg 100g⁻¹) no período de indução. Para os teores de fenóis totais, *Passiflora gibertii* não se destacou quando comparada com a produção desse composto em outras plantas. Já para os teores de vitamina C, *P. gibertii*, mostrou eficiência na produção dessa substância quando comparada com a produção em outras espécies de maracujá. Na terceira etapa foi feita a quantificação da viabilidade celular dos calos de *P. gibertii*, pelos testes com o cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (CTT) e com o diacetato de fluoresceína (FDA). Para o teste com o CTT, o tratamento 1 (4,14 µM de PIC + 0,207 µM de CIN), após 49 dias do primeiro subcultivo, apresentou viabilidade máxima (100%), já o tratamento 2 (0,28 µM de PIC + 0,828 µM de CIN) apresentou 51% de viabilidade máxima após 42 dias do primeiro subcultivo. Em ambos tratamentos, as menores viabilidades foram observadas nas duas últimas análises. Para o teste de viabilidade com FDA, o tratamento 1 apresentou uma porcentagem máxima de células isodiamétricas (60%), e o tratamento 2 apresentou uma viabilidade máxima de 46%.

Palavras-chave: Cinetina. Picloram. Vitamina C. Fenóis totais. Viabilidade celular.

GENERAL ABSTRACT

Considering the variability for resistance to major diseases of passion fruit, medicinal properties and the potential for cell cultures and plant tissues present in the production of bioactive compounds of interest to the pharmaceutical industry, the aim of this study was perform an evaluation of vitamin C and total phenol, as well as a cellular characterization of callus obtained from leaf segments of wild passion fruit *Passiflora gibertii*. For this, the present work is divided into three stages. The first step consisted of callus induction in leaf segments of *P. gibertii* using the MS culture media, containing half the concentration of salts, 3% sucrose, 0.6% agar, pH 5.8 and concentrations of Kinetin combined with different concentrations of Picloram. The callus induction was found to be totally dependent on the combination of growth regulators, and in the absence of Picloram in the culture media did not induce callus. In the second stage of the study, the levels of vitamin C and total phenol in leaves and callus of *P. gibertii* was analyzed, which were obtained from four different concentrations of Kinetin and Picloram in the culture media MS. The leaves showed levels of 127.495 and 708.63 mg 100g⁻¹ of vitamin C and total phenol, respectively. For both compounds tested, the levels were lower in callus, which showed maximum values of vitamin C in the induction period (94.756 mg 100g⁻¹) and total phenol also in the induction period (66.213 mg.100g⁻¹). For total phenol levels, the species *Passiflora gibertii* was not significant when compared with the production of this compound in other plants. As for the vitamin C content, the species *Passiflora gibertii* showed efficiency in the production of the vitamin compared with production in other species of passion fruit. In the last chapter, the quantification of cell viability of callus *Passiflora gibertii* was performed, by testing with 2,3,5-triphenyltetrazolium (TTC) and the fluorescein diacetate (FDA). For the test with the TTC, treatment 1 (4.14 μM of PIC + 0.207 μM of KIN), 49 days after the first subculture, showed maximum viability (100%), while treatment 2 (0.28 μM of PIC + 0.828 μM of KIN) had a maximum viability of 51% 42 after days from the first subculture. In both treatments, the lowest viability were observed in the last two tests. To test for viability with FDA, the first treatment showed a maximum percentage of isodiametric cells equal to 60%, and treatment 2 had a maximum viability of 46%.

Keywords: Kinetin. Picloram. Vitamin C. Total phenol. Cell viability.

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 Introdução geral	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1	Aspectos gerais da cultura	12
2.2	Importância da espécie <i>Passiflora gibertii</i> e dos demais maracujazeiros silvestres	14
2.3	Cultura de tecidos	16
2.4	Estabelecimento <i>in vitro</i> do gênero <i>Passiflora</i>	17
2.5	Propriedades farmacológicas e nutritivas do maracujazeiro	19
	REFERÊNCIAS	22
	CAPÍTULO 2 Efeito da cinetina e do picloram na indução de calos em <i>Passiflora gibertii</i> N. E. Brown.....	31
1	INTRODUÇÃO	33
2	MATERIAIS E MÉTODOS	35
2.1	Material vegetal.....	35
2.2	Indução de calos	35
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4	CONCLUSÕES	48
	REFERÊNCIAS	49
	CAPÍTULO 3 Análise quantitativa de vitamina C e fenóis totais em folhas e calos obtidos de segmentos foliares de <i>Passiflora gibertii</i> .	53
1	INTRODUÇÃO	55
2	MATERIAIS E MÉTODOS	58
2.1	Material vegetal.....	58
2.2	Indução de calos	58
2.3	Coleta do material.....	59
2.4	Quantificação de vitamina C	59
2.5	Quantificação de taninos	60
2.6	Delineamento experimental	60
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
4	CONCLUSÕES	67
	REFERÊNCIAS	68
	CAPÍTULO 4 Viabilidade e caracterização celular de calos em <i>Passiflora gibertii</i> N. E. Brown por CTT e FDA.....	73
1	INTRODUÇÃO	75
2.1	Material vegetal.....	78
2.2	Indução de calos	78
2.3	Análise da viabilidade celular por tetrazólio.....	79
2.4	Caracterização das células pelo método da contagem celular utilizando FDA	80
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	81

4	CONCLUSÕES.....	91
	REFERÊNCIAS.....	92

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

Mesmo em posição de destaque como o maior produtor mundial de maracujá, o Brasil apresenta baixa produtividade média, devido à carência de polinizadores naturais, como as abelhas mamangabas (*Xilocopa* spp.), nas áreas cultivadas, além de problemas fitossanitários, técnicas inadequadas de cultivo e ausência de genótipos superiores.

No cenário econômico, além da utilização dos maracujazeiros para fins ornamentais, destaca-se a importância alimentícia de algumas espécies do gênero *Passiflora*, devido à qualidade dos frutos para consumo *in natura* e derivados, como sucos, sorvetes e geleias. Tais características promoveram e ainda promovem um grande consumo de tais produtos, tanto no âmbito nacional como para exportação, exigindo cada vez mais da produção brasileira de maracujá para atender ao mercado consumidor nacional e internacional. Porém, mais que o aspecto quantitativo da produção, tem havido muita preocupação com a questão qualitativa. O cenário internacional mostra que este último aspecto apresenta valorização crescente, tendo em vista que os consumidores, em sua maior parte do continente europeu, têm buscado frutas saudáveis e de qualidade. Todavia, a utilização e o desenvolvimento de tecnologias que visem à qualidade do maracujá não têm acompanhado o crescente aumento da produção.

Além da questão fitossanitária dos maracujazeiros como entrave para a produção brasileira, as passifloráceas nativas, que têm chamado a atenção não apenas por apresentarem resistência a doenças e pragas, mas também pela longevidade superior, maior adaptação às condições climáticas adversas, período de florescimento ampliado, maior concentração de componentes químicos de interesse para a indústria farmacêutica, têm sido utilizadas, por estes motivos,

em programas de melhoramento genético, por meio da criação de híbridos pelo processo de transformação genética e fusão de protoplastos, e como porta-enxertos para as variedades comerciais.

Considerando essas características das passifloriáceas nativas e os problemas relacionados com a produção dos maracujazeiros cultivados, bem como o crescente mercado consumidor e a necessidade da obtenção de compostos químicos de interesse farmacêutico de forma sustentável, a propagação *in vitro* apresenta-se como uma importante ferramenta tecnológica que possibilita manter a identidade genética dos indivíduos e a obtenção de plantas saudáveis e de alta qualidade fitossanitária, com pouca exigência de espaço físico, tempo reduzido de cultivo e independente da época do ano.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho, foi obter, analisar e caracterizar células de calos, bem como avaliar o nível de vitamina C e fenóis totais, em calos do maracujazeiro *Passiflora gibertii* para que, a partir dessas descrições, seja possível estabelecer um protocolo eficiente para a obtenção de células embriogênicas e para a produção de vitamina C e fenóis totais em suspensões celulares.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos gerais da cultura

A família Passifloraceae, à qual pertencem as espécies de maracujá, é composta por 18 gêneros e 630 espécies, distribuídas, principalmente, nos trópicos da América, Ásia e África, sendo que o gênero *Passiflora* destaca-se economicamente. Este gênero é composto por, aproximadamente, 465 espécies, das quais 150 a 200 são originárias do Brasil (VANDERPLANK, 1996), as quais são amplamente cultivadas devido às suas características ornamental, medicinal e alimentícia. Ressaltando a importância alimentícia dos maracujazeiros, no Brasil, existem sessenta espécies produtoras de frutos comestíveis e que são utilizados na alimentação humana (OLIVEIRA et al., 1994).

A maioria das espécies pertencente à família Passifloraceae é composta de trepadeiras herbáceas ou lenhosas com gavinhas, apesar de existirem exceções, compreendendo representantes que são arbustos ou árvores. É uma planta de fecundação cruzada, com alta taxa de autoincompatibilidade, o que acarreta perda de identidade genética e aumento da variabilidade nos pomares (VASCONCELLOS; BRANDÃO FILHO; VIEITES, 2001).

A produção de maracujá está concentrada na América do Sul, sendo o Brasil, Colômbia, Peru e o Equador responsáveis por, aproximadamente, 90% da exportação de suco concentrado congelado e polpa de maracujá (SOUZA et al., 2002; RUGGIERO et al., 1996). O Brasil, por apresentar regiões tropicais que conferem as condições ideais para o cultivo do maracujazeiro, é o maior produtor e consumidor desta frutífera. No ano de 2007, a produção, abrangendo todos os estados brasileiros e o Distrito Federal, foi de 664.286 toneladas em num total de 47.032ha (INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS - IBRAF,

2007). A Bahia, com produção de 229.876 toneladas de maracujá em 17.559ha, destacou-se como o maior produtor brasileiro, seguido dos estados do Ceará (116.026 toneladas), Espírito Santo (80.482 toneladas), Sergipe (44.782 toneladas), Pará (41.307 toneladas), Minas Gerais (38.987 toneladas) e São Paulo (25.675 toneladas) (IBRAF, 2007).

Apesar de o Brasil possuir grande diversidade de espécies de maracujá pertencentes ao gênero *Passiflora* – das 465 espécies existentes, 150 a 200 são originárias do Brasil –, o maracujá-amarelo ou azedo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) representa 97% da área plantada e do volume comercializado. Aproximadamente, 60% da produção brasileira de maracujá-amarelo ou azedo destina-se ao consumo *in natura*, por meio das feiras, supermercados e sacolões. O restante da produção é utilizado, principalmente, na produção de sucos (ROSSI; ROSSI; SILVA, 2001).

Por ser considerado um dos centros de origem do maracujá e, mundialmente, o maior centro de distribuição geográfica do gênero *Passiflora*, o Brasil apresenta importante variabilidade natural, existindo, no país, as maiores e melhores coleções de germoplasma de *Passiflora* do mundo (MELETTI; SANTOS; MINAMI, 2000). Essa alta variabilidade genética torna-se algo muito promissor para os trabalhos de melhoramento genético que visam aperfeiçoar os cultivares já existentes, no que se refere a melhoramento das características do fruto, resistência a doenças e tolerância ao frio. Mas, segundo Meletti, Santos e Minami (2000) essa grande variabilidade genética que apresenta o maracujazeiro ainda deve ser conhecida, caracterizada, protegida, conservada e adequadamente utilizada em programas de melhoramento genético ou comercialmente.

2.2 Importância da espécie *Passiflora gibertii* e dos demais maracujazeiros silvestres

O Brasil é considerado o maior produtor mundial de maracujá. Mesmo assim, a produtividade dessa frutífera ainda é baixa. Isso ocorre, principalmente, devido a problemas com doenças e pragas (abelhas-africanas, broca-da-haste, mosca-do-botão-floral) que dificultam a expansão e a produtividade dos maracujazeiros.

Entretanto, algumas espécies silvestres do gênero *Passiflora*, como *P. laurifolia*, *P. nitida*, *P. tenuifolia*, *P. mucronata*, *P. gibertii*, *P. amethystina*, *P. quadrangularis*, *P. setacea*, *P. coccínea* e *P. caerulea*, entre outras, têm estimada importância, por apresentarem variabilidade para resistência às principais doenças do maracujazeiro, sendo utilizadas com sucesso em programas de melhoramento genético ou como porta-enxertos (CUNHA; BARBOS; JUNQUEIRA, 2002; SANTOS FILHO; JUNQUEIRA, 2003). Isso tem contribuído, efetivamente, para a preservação do meio ambiente, uma vez que, com o melhoramento genético e o uso da técnica de enxertia, o consumo de defensivos agrícolas é reduzido e consegue-se maior eficácia e economia no controle das pragas.

A reprodução assexuada pelo método de enxertia tem sido muito utilizada, por apresentar vantagens como conservação das características da planta-mãe e controle de doenças (RUGGIERO, 1991). Tal método é muito eficiente e altamente empregado com a espécie silvestre *P. gibertii*. Isto foi comprovado por Oliveira et al. (1984), ao estudarem, em uma localidade com histórico de ocorrência de morte precoce, a sobrevivência de 93% dos maracujazeiros da espécie comercial *P. edulis* (maracujá-amarelo), após serem enxertadas em *P. gibertii*. Essa espécie silvestre de maracujazeiro apresenta também resistência à cladospirose e à bacteriose (SOUZA; MELETTI, 1997;

OLIVEIRA; RUGGIERO, 1998). Além de apresentar resistência a doenças e pragas, Figueiredo et al. (2007) destacam outras potencialidades da espécie, quase todas ainda inexploradas, como longevidade, maior adaptação a condições climáticas adversas, período de florescimento ampliado e maior concentração de componentes químicos de interesse para a indústria farmacêutica, características que fazem da *P. gibertii* uma espécie de grande interesse para os programas de melhoramento genético das espécies de maracujá cultivados.

Em relação ao controle de doenças, a resistência à fusariose, causada por um fungo, foi observada por Yamashiro e Landgraff (1979) nas espécies *P. alata*, *P. macrocarpa* e *P. quadrangulares*, que são recomendadas como porta-enxerto do maracujazeiro-amarelo ou azedo (*P. edulis*).

Além do potencial dos maracujazeiros silvestres para a resistência a pragas, doenças e à morte precoce, existem algumas espécies silvestres, como *P. tenuifila*, *P. elegans*, *P. capsularis*, *P. villosa*, *P. suberosa* e *P. foetida*, que possibilitam maior produtividade pelo fato de serem autocompatíveis. Essa característica é de suma importância, já que a autoincompatibilidade está presente em várias espécies de maracujá, tornando-se um entrave para a produção dessa frutífera, bem como encarecendo o produto, pela necessidade de mão-de-obra para realizar a polinização manualmente.

Outra característica interessante presente em outras duas espécies silvestres, *P. coccinea* e *P. setacea*, é o fato de comportarem-se como plantas de “dias curtos”, quando localizadas nas condições ambientais do Distrito Federal, ou seja, o florescimento e a frutificação desses maracujazeiros ocorrem durante os dias mais curtos do ano e, conseqüentemente, a colheita ocorre entre os meses de agosto e outubro, coincidindo com o período de entressafra do maracujá azedo comercial (*P. edulis*). Portanto, se tal característica for incorporada ao maracujá comercial, este produzirá frutos o ano todo, na região centro-sul do

país, eliminando o problema da sazonalidade, aumentando, com isso, a produção (JUNQUEIRA et al., 2005).

Dessa forma, é evidente a importância a ser dada às espécies silvestres de maracujá. Trabalhos que envolvam conservação, caracterização e uso do germoplasma são essenciais para o desenvolvimento de novas variedades, bem como os avanços que ocorreram nos últimos anos, com a biotecnologia, possibilitando o uso de novas ferramentas para tornar os programas de melhoramento mais eficientes e, com isso, aumentar a produção, e diminuir o uso de insumos agrícolas, resultando em uma produtividade mais barata, assegurando, com isso, maior competitividade e sustentabilidade da atividade agrícola no país.

2.3 Cultura de tecidos

A cultura de tecidos vegetais é uma técnica altamente empregada na agricultura. Baseia-se na utilização de explantes, que são pequenos fragmentos de tecidos vivos isolados de um organismo vegetal e que devem ser desinfestados para serem cultivados em condições assépticas por um período indefinido, em um meio nutritivo artificial.

Tal técnica é sustentada pela totipotencialidade das células que são capazes de manifestarem em momentos diferentes e, sob estímulos apropriados, a potencialidade de iniciar novo indivíduo multicelular. Tal princípio biológico foi descrito pelo fisiologista alemão Haberlandt que, em 1902, declarou que cada célula vegetal contém todo potencial genético para reproduzir um organismo inteiro (GUERRA, 2006).

Apesar de todas as células vegetais serem totipotentes e, por isso, serem capazes de regenerarem uma planta completa, existem três fatores que podem afetar essa regeneração *in vitro*: o genótipo, ou seja, qual espécie, cultivar ou

variedade que está sendo utilizada; a fonte de explante (folha, raiz, caule, meristema, etc.) e a condição da cultura (meio de cultura, luz, temperatura). Desse modo, o sucesso da iniciação e da regeneração da cultura *in vitro* depende da combinação correta desses três fatores.

Quanto à aplicabilidade e à importância da cultura de tecidos, cabe ressaltar que a cultura de tecidos é uma ferramenta excepcional quando se tem por objetivo clonar plantas em escala comercial. Além disso, contribui de forma relevante para a realização de estudos de transformação genética e a conservação de espécies vegetais e permite a obtenção de plantas saudáveis, vigorosas e geneticamente superiores, que podem ser massivamente multiplicadas. Em algumas espécies nativas do Cerrado que apresentam dificuldades de propagação, esta técnica pode ser aplicada como uma possível solução a propagação (ANDRADE, 2002). Cabe ressaltar também a importância da cultura de células e tecidos vegetais para a produção de compostos bioativos de interesse para a indústria farmacêutica. A biossíntese de metabólitos secundários *in vitro* vem sendo amplamente estudada (CHARLET et al., 2000), contribuindo para uma maior produção de tais compostos, evitando a necessidade de coleta predatória e indiscriminada das plantas medicinais para a extração de tais compostos. Trata-se de vantagens, tanto no âmbito ecológico como econômico.

2.4 Estabelecimento *in vitro* do gênero *Passiflora*

Considerando o Brasil como um dos principais centros de dispersão da variabilidade genética do gênero *Passiflora*, a perda de material genético tem sido muito expressiva, tendo em vista a autoincompatibilidade apresentada pelas espécies desse gênero, a incidência de doenças do sistema radicular e da parte aérea, bem como os desmatamentos e monocultivos, resultando em acentuada erosão genética (FARIA et al., 2007). Como forma de preservar a diversidade do

gênero *Passiflora*, diversos são os trabalhos de estabelecimento *in vitro* das espécies de maracujazeiro. Contudo, mesmo com um grande número de trabalhos publicados com as espécies de maracujazeiros, segundo Faria et al. (2007), resultados de protocolos de estabelecimento, desenvolvimento, regeneração e conservação *in vitro*, até o momento, não foram obtidos para a maioria das espécies.

Para experimentos que objetivam a conservação *in vitro*, é essencial o conhecimento, da espécie em questão, sobre a via de regeneração, a qual pode ocorrer pelo processo de organogênese ou embriogênese somática. No caso da regeneração de plantas em espécies do gênero *Passiflora*, Dornelas e Vieira (1994), utilizando como explante cotilédone, hipocótilo e disco foliar, foram os primeiros a conseguirem a regeneração por meio da organogênese indireta. Takahashi (2002) relata que a organogênese tem sido estudada para as espécies *P. amethystina*, *P. gibertii* N. E. Brown, *P. incarnata*, *P. maliformis*, *P. molissima*, *P. nitida*, *P. quadrangulares* e *P. suberosa*. A maior parte dos trabalhos de cultivo *in vitro* tem sido realizada, segundo Monteiro-Hara (2002), com as espécies *P. edulis* Sims f. *edulis* e *P. edulis* f. *flavicarpa*, enfatizando a indução e a multiplicação de gemas por meio de segmentos nodais, internodais e discos foliares. Plantas de *P. suberosa* foram obtidas utilizando-se como explantes gemas e segmentos nodais, cultivados em meio com 150 μM de 2iP (isopenteniladenina) e 17,1 μM de AIA (ácido indolacético) (DREW, 1991) e Scorza e Janick (1980), empregado como explantes internós de *P. suberosa* cultivados em meio contendo 0,1mg.L⁻¹ de BAP, sob condições de fotoperíodo, obtiveram florescimento *in vitro*.

2.5 Propriedades farmacológicas e nutritivas do maracujazeiro

Os maracujazeiros destacam-se pela importância em relação às propriedades nutricionais e farmacológicas dos seus frutos, folhas e flores (ZUCARELLI, 2007).

Como fonte alimentar para a espécie humana, o fruto do maracujazeiro é consumido mundialmente. Segundo Muniz (2008), na Austrália e na África do Sul, o suco da fruta é, comumente, misturado com leite ou coalhada para ser consumido. Na Suíça, a bebida denominada passaia é comercializada por toda a Europa Ocidental e, na Costa Rica, tem-se a produção de um “vinho” de maracujá, chamado de parchita seco.

A casca da fruta é constituída por pectina, que pode ser utilizada na fabricação de geleia ou para a alimentação animal, proteína, açúcares (sacarose, glicose, frutose), fibra, fósforo, potássio, ácidos orgânicos (cítrico e málico) e ácido ascórbico. As sementes apresentam 23% de óleo, o qual possui potencial comestível e industrial, semelhante ao óleo de girassol e ao de soja, 12% de proteína e de 50% a 55% de fibra. A polpa apresenta, além de proteínas, lipídios e fibra, vitamina B1, B2 e vitamina C (MUNIZ, 2008).

Em relação às propriedades farmacológicas das espécies do gênero *Passiflora*, Chopra, Nayar e Chopra (1986) relatam as propriedades estimulantes e tonificantes da polpa da fruta. Neira et al. (2003) destacam o efeito anticarcinogênico. Muniz (2008) cita a utilização da farinha da casca da fruta no controle de diabetes, pelo fato de a casca apresentar fibras dietéticas. Capasso e Sorrentino (2005) fazem referência aos efeitos sedativos e hipnóticos dos extratos florais e Ripa et al. (2009), ao testarem o extrato clorofórmico e etéreo do caule da espécie *P. edulis*, constataram efeitos antibacteriano, citotóxico e antioxidante.

Segundo Deng et al. (2010), muitas plantas do gênero *Passiflora* têm sido utilizadas na medicina popular como remédio para diversas doenças neurogênicas em vários países e algumas espécies do gênero foram estudadas quanto às atividades neurofarmacológicas, porém, os resultados foram inconsistentes. Estes mesmos autores realizaram um estudo utilizando testes em camundongos para obter informações sobre o efeito ansiolítico e sedativo da espécie *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* e constataram o efeito tanto ansiolítico como sedativo, porém, para este último efeito, necessitou de uma dose maior de extrato. Segundo os autores, um dos extratos utilizados tinha uma pequena quantidade de flavonoides, o que sugere que havia outros componentes responsáveis por tais efeitos sedativos e ansiolíticos.

Os flavonoides, pertencentes ao grupo dos compostos fenólicos, são compostos metabólitos secundários, os quais apresentam, como função nos vegetais, a proteção contra vários herbívoros e microrganismos patogênicos e são definidos como compostos orgânicos que não apresentam função aparente no crescimento e no desenvolvimento do vegetal.

Além dos flavonoides, outros metabólitos secundários são encontrados nas espécies do gênero *Passiflora*, como terpenos (PEÑA et al., 2009), alcaloides (PEREIRA; VILEGAS, 2000) e polifenóis (ICHIMURA et al., 2006). A presença desses metabólitos secundários justifica as propriedades farmacológicas existentes nas espécies do gênero *Passiflora*, exibindo a importância das espécies desse gênero como fornecedor de compostos essenciais para a indústria farmacêutica.

A indústria farmacêutica, após a Segunda Guerra Mundial, passou por um período de declínio na utilização de plantas medicinais e fármacos de origem vegetal, justificado pelo surgimento dos antibióticos produzidos por fermentação microbiana e fármacos sintéticos. Contudo, devido aos avanços da biotecnologia, os fitofármacos, possuidores de um mercado altamente lucrativo,

ativaram novamente o interesse da indústria farmacêutica pelos produtos de origem vegetal (MANZANO, 2001).

Segundo Manzano (2001), hoje, aproximadamente um terço dos medicamentos descende de plantas, processadas pela indústria farmacêutica. No Brasil, o mercado de fitoterápicos movimenta cerca de US\$ 260 milhões ao ano (INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA, 2010) e os produtos farmacêuticos advindos do maracujá custam, em média, R\$ 17,38, valor acessível de compra por todos os níveis de renda (AZEVEDO, 2008).

REFERÊNCIAS

ANDRADE, S. R. M. **Princípios da cultura de tecidos vegetais**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2002.

AZEVEDO, M. A. M. Análise da valoração dos impactos ambientais e da demanda de fitoterápicos oriundos do maracujá no Brasil. **Revista FAE**, Curitiba, v. 11, n. 1, p. 19-32, jan./jun. 2008.

BALANDRIN, T.; KLOCKE, J. Medicinal, aromatic, and industrial materials from plant. In: BAJAV, Y. P. S. (Ed.). **Medicinal and aromatic plant 1**. Berlin: Springer Verlag, 1988. p. 3-33. (Biotechnology in Agriculture and Forestry, 4).

BARBOSA, L. S. **Resistência de passiflora spp a xanthomonas campestris pv. passiflorae e detecção do patógeno em sementes**. 1995. 66 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1995.

BRISKIN, D. Medicinal plant and phytomedicines: linking plant biochemistry and physiology to human health. **Plant Physiology**, Washington, v. 124, n. 2, p. 507-514, Oct. 2000.

BRUNETON, J. **Elementos de fitoquímica y de farmacognosia**. Madrid: Acribia, 1991. 544 p.

CAPASSO, A.; SORRENTINO, L. Pharmacological studies on the sedative and hypnotic effect of Kava kava and Passiflora extracts combination. **Phytomedicine**, Jena, v. 12, n. 1/2, p. 39-45, Jan. 2005.

CASTRO, A. H. F. et al. Calogênese e teores de fenóis e taninos totais em barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*). **Ciência e Agrotécnica**, Lavras, v. 33, n. 2, p. 385-390, mar./abr. 2009.

CHARLET, S. Immobilisation of *Solanum chrysotrichum* plant cells with Calcium alginate gel beads to produce an antimycotic spirostanol saponin. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 38, n. 11, p. 875-870, Nov. 2000.

CHOPRA, R. N., NAYAR, S. L.; CHOPRA, I. C. **Glossary of indian medicinal plants**. New Delhi: Council of Scientific and Industrial Research, 1986.

CHUNG, K. et al. Tannins and Human health: a review. **Critical Reviews in food Nutritional**, Amherst, v. 38, n. 6, p. 421-464, June 1998.

COHEN, K. O. et al. Determinação das características físico-químicas e compostos funcionais de espécies de maracujá doce. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SAVANAS TROPICAIS, 2., 2008, Brasília. **Anais...** Brasília: Cpac, 2008. 1 CD-ROM.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural products (Secondary Metabolites). In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Ed.). **Biochemistry & molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. p. 1250-1318.

CUNHA, M. A. P.; BARBOSA, L. V.; JUNQUEIRA, N. T. V. Espécies de maracujazeiro. In: LIMA, A. A. (Ed.). **Maracujá produção: aspectos técnicos**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2002 104p. (Frutas do Brasil; 15).

DENG, J. et al. Anxiolytic and sedative activities of *Passiflora edulis* f. flavicarpa. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 128, n. 1, p. 148-153, Jan. 2010.

DESHPANDE, S. S.; CHERYAN, M.; SALUNKE, D. K. Tannin analysis of food products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Cleveland, v. 24, n. 4, p. 401-449, Apr. 1986.

DORNELAS, M. C.; VIEIRA, M. L. C. Tissue culture studies on species of *Passiflora*. **Plant Cell, tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 36, n. 2, p. 211-217, Feb. 1994.

DREW, R. A. *In vitro* culture of adult and juvenile bud explants of *Passiflora* species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht v. 26, n. 1, p. 23-27, July 1991.

ESTRADA-ZÚÑIGA, M. E. et al. Phenylpropanoid production in callus and cell suspension cultures of *Buddleja cordata* Kunth. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 97, n. 1, p. 39-47, Apr. 2009.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. Germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro: desafios da pesquisa. In: _____. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. p.187-210.

FARIA, G. A. et al. Meio de cultura e tipo de explante no estabelecimento *in vitro* de espécies de maracujazeiro. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n. 4, p. 535-543, 2007.

FERRARI, R. A.; COLUSSI, F.; AYUB, R. A. Caracterização de subprodutos da industrialização do maracujá: aproveitamento das sementes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, n. 1, p. 101-102, abr. 2004.

FIGUEIREDO, M. A. et al. Indução *in vitro* de calos em duas espécies de maracujazeiro nativo. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 288-290, jul. 2007. Suplemento.

FIORUCCI, A. R.; SOARES, M. H. F. B.; CAVALHEIRO, E. T. G. A importância da vitamina C na sociedade através dos tempos. **Química Nova na Escola**, São Paulo, n. 17, maio 2003. Disponível em: <<http://qnesc.s bq.org.br/online/qnesc17/a02.pdf>>. Acesso em: 30 maio 2010.

FUMAGALI, E. et al. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacologia**, João Pessoa, v. 18, n. 4, out./dez. 2008.

GAMBORG, O. L.; DAVIS, B. P.; STAHLHUT, R. W. Cell division and differentiation in protoplasts from cell cultures of Glycine species and leaf tissue of soybean. **International Plant Research Institute**, San Carlos, v. 2, n. 4, p. 213-215, Aug. 1983.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Org.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 3. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2001. p. 13-26.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. **Biotecnologia vegetal**. Florianópolis: UFSC, 2006. Apostila.

ICHIMURA, T. et al. Antihypertensive effect of an extract of *Passiflora edulis* rind in spontaneously hypertensive rats. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 70, n. 3, p. 718-721, 2006.

INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS. **Frutas fresca**. São Paulo, 2010. Disponível em: <http://www.ibraf.org.br/estatisticas/est_frutas.asp>. Acesso em: 8 fev. 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Flora**: plantas medicinais. Brasília, 2010. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/flora/plantas_medicinais.htm>. Acesso em: 7 mar. 2010.

JUNQUEIRA, N. T. V. et al. **Potencial de espécies silvestres de maracujazeiro como fonte de resistência a doenças**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. P. 81-105.

KILKUSKIE, R. E. et al. HIV and reverse transcriptase inhibition by tannins. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, New York, v. 2, n. 12, p. 1529-1534, Dec. 1992.

KURODA, N. **Avaliação do comportamento quanto a resistência de espécies e progênies de maracujazeiro a *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae***. Jaboticabal: FCAV/UNESP, 1981. 45 p.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 1993. p. 782.

LEITÃO FILHO, H. F.; ARANHA, C. Botânica do maracujazeiro. In: SIMPÓSIO DA CULTURA DO MARACUJÁ, 1971, Campinas. **Anais...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1974. p. 13.

MANZANO, N. T. Tomate de farmácia. **Agroanalysis**: revista de agronegócios, Rio de Janeiro, v. 21, n. 10, p. 36-38, out. 2001.

MELETTI, L. M. M.; SANTOS, R. R.; MINAMI, K. Melhoramento do maracujazeiro-amarelo: obtenção do cultivar 'composto IAC-27'. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, n. 3, p. 491-498, jul./set. 2000.

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

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. L. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 5, p. 892-896, set./out. 2005.

MONTEIRO-HARA, A. C. B. A. de. **Cultivo *in vitro* de três espécies do gênero *Passiflora***. 2000, 82p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2000.
MUNIZ, H. J. T. **Colecionando frutas**. São Paulo: Arte & Ciência, 2008. 352p.

NEIRA, D.; CINDY, M. The effects of yellow passion fruit, *passiflora edulis* flavicarpa, phytochemicals on cell cycle arrest and apoptosis of leukemia lymphoma Molt-4 cell line. Florida: University of Florida, 2003.

NOGUEIRA, R. C. et al. Curva de crescimento e análises bioquímicas de calos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 10, n. 1, p. 44-48, Jan. 2008.

NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM ALIMENTAÇÃO. **Tabela brasileira de composição de alimentos**. Campinas, 2004. 42 p.

OLIVEIRA, J. C. et al. Comportamento de *Passiflora edulis* enxertada sobre *P. gibertii* N.E. Brown. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 7., 1983, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: EMPASC/SBF, 1984. v. 3, p. 989-93.

OLIVEIRA, J. C. Melhoramento genético. In: RUGGIERO, C. (Ed.). **Cultura do maracujazeiro**. Ribeirão Preto: L. Summa, 1987. p. 218-246.

OLIVEIRA, J. C. et al. Aspectos gerais do maracujazeiro. In: SÃO-JOSÉ, A. R. (Ed) **Maracujá: produção e mercado**. Vitória da Conquista: UEB, 1994. p. 27-37.

OLIVEIRA, J. C.; RUGGIERO, C. Aspectos sobre o melhoramento do maracujazeiro-amarelo. In: Simpósio Brasileiro sobre a cultura do maracujazeiro, 5, 1998. Jaboticabal, FUNEP, p. 292-302. 1998.

PANSERA, M. R. et al. Análise de taninos totais em plantas aromáticas e medicinais cultivadas no nordeste do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 13, n. 1, p. 17-22, jan./jun. 2003.

PEÑA, C. M. G. et al. Metabolitos secundarios en los extractos secos de *Passiflora incarnata* L., *Matricaria recutita* L. y *Morinda citrifolia* L. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, Havanna, v. 14, n. 2, p. 1-7, abr./jun. 2009.

PEREIRA, C. A. M.; VILEGAS, J. H. Y. Constituintes químicos e farmacologia do gênero *Passiflora* com ênfase a *P. alata* Dryander, *P. edulis* Sims e *P. incarnata* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 3, n. 1, p. 860-864, out./dez. 2000.

ROSSI, A. D.; ROSSI, F. S.; SILVA, J. R. **Análise Setorial. Produção de Sucos Tropicais: Maracujá**. Vera Cruz: AFRUVEC, 2001. 47 p.

RUGGIERO, C. Enxertia do maracujazeiro. In: SÃO JOSÉ, A. R. **A cultura do maracujazeiro no Brasil**. Jaboticabal: Funep, 1991. p. 43-59.

RUGGIERO, C. et al. **Maracujá para exportação: aspectos técnicos da produção**. Brasília: Embrapa/SPI, 1996. 64p. (Frupep, 19).

SANTOS FILHO, H. P.; JUNQUEIRA, N. T. **Maracujá: fitossanidade**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. 86 p. (Frutas do Brasil, 32).

SCORZA, R.; JANICK, J. *In vitro* flowering of *Passiflora suberosa* L. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Tokyo, v. 105, p. 892-897, 1980.

SILVA, A. P. et al. Fitorreguladores na conservação pós-colheita de maracujá doce (*Passiflora alata* dryander) armazenado sob refrigeração. **Ciência e Agrotecnica**, Lavras, v. 23, n. 3, p. 643-649, jul./set. 1999.

SILVESTRINI, A. Effect of alkaloid precursor feeding on a *Camptotheca acuminata* cell line. **Plant Physiology & Biochemistry**, New Delhi, v. 40, n. 9, p. 749-753, Sept. 2002.

SIMÃO, A. M. **Aditivos para alimentos sob o aspecto toxicológico**. São Paulo: Nobel, 1985. 274 p.

SOUZA, J. S. I; MELETTI, L. M. M. **Maracujá, espécies, variedades, cultivo**. Piracicaba: FEALQ, 179p. 1997.

SOUZA, J. S. et al. **Mercado mundial: maracujá pós-colheita**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002. 51p. (Frutas do Brasil, 23).

TAKAHASHI, E. K. **Transferência do gene atacina A para plantas de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) por biobalística**. 2002. 127p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2002.

TRUGILHO, P. F. et al. Avaliação do conteúdo de taninos condensados de algumas espécies típicas do cerrado mineiro. **Cerne**, Lavras, v. 3, n. 1, p. 1-13, jan./mar. 1997.

VANDERPLANK, J. **Passion flowers**. Massachusetts: Academic, 1996. 224p.

VASCONCELLOS, M. A. S., BRANDÃO FILHO, J. U. T.; VIEITES, R. L. Maracujá-doce. In: BRUCKNER, C. H.; PICANÇO, M. C. **Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria e mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2001.

YAMASHIRO, T.; LANDGRAF, J. H. Maracujá-açu (*P. alata* Ait): porta-enxerto resistente à fusariose do maracujazeiro (*P. edulis* f. *flavicarpa* Deg.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 5., 1979, Pelotas. **Anais...** Pelotas: SBF, 1979. p. 918-21.

YAZAKI, K.; YOSHIDA, T.; OKUDA, T. Tannin production in cell suspension cultures of *Geranium thunbergii*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 30, n. 2, p. 501-503, Feb. 1991.

YILDIRIM, A.; MAVI, A.; KARA, A. A. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Chicago, v. 49, n. 8, p. 4083-4089, Aug. 2001.

ZHENG, W.; WANG, S. Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J. Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Chicago, v. 49, n. 10, p. 5165-5170, Oct. 2001.

ZUCARELLI, V. **Germinação de sementes de *Passiflora cincinnata* Mast.: Fases, Luz, Temperatura e Reguladores Vegetais.** 2007. 111p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Universidade Estadual Paulista, 2007.

CAPÍTULO 2

Efeito da cinetina e do picloram na indução de calos em *Passiflora gibertii*

N. E. Brown

RESUMO

O Brasil, por apresentar regiões tropicais que conferem as condições ideais para o cultivo do maracujazeiro, é o maior produtor e consumidor desta frutífera. Apesar disso, a produtividade do maracujazeiro no Brasil ainda é baixa, devido aos problemas fitossanitários. Focando a importância de *Passiflora gibertii* nos programas de melhoramento genético como espécie resistente a pragas e doenças, bem como o destaque em relação aos compostos químicos de interesse farmacêutico que sintetizam, este trabalho foi realizado com o objetivo de obter calos a partir de explantes foliares de *Passiflora gibertii*, para a futura utilização em suspensões celulares, possibilitando, assim, estudos na área de embriogênese somática e na área de produção de metabólitos secundários. Os calos foram induzidos em meio MS contendo metade das concentrações de sais, solidificado com ágar (0,6%), suplementado com sacarose (3%) e com concentrações de Cinetina combinadas com diferentes concentrações de Picloram. A formação de calos em explantes foliares mostrou-se fortemente dependente do Picloram no meio de cultura e bastante heterogênea em relação à coloração nos diferentes meios de cultivo. Maior valor de massa fresca (1,80 g) foi observada nos calos oriundos do meio de cultivo que continha os dois reguladores de crescimento, sendo que concentrações mais elevadas de auxina no meio de cultivo resultaram em um aumento praticamente linear da massa fresca dos calos. O mesmo não ocorreu com as concentrações elevadas de citocinina, a qual, em grandes concentrações, teve efeito negativo na produção dos calos, resultando em menor massa fresca.

Palavras-chave: Auxina. Citocinina. Calogênese. Cultura de tecidos. *Passiflora gibertii*.

ABSTRACT

Brazil, for having tropical regions that give optimal conditions for the cultivation of passion fruit, is the largest producer and consumer of this fruit. Nevertheless, the productivity of passion fruit in Brazil is still low due to disease problems. Focusing on the importance that the native species *Passiflora gibertii* has in breeding programs as a species resistant to pests and diseases, and its highlighted in relation to chemical compounds of pharmaceutical interest that synthesize, the objective of this study was to obtain a callus from leaf explants of *Passiflora gibertii*, for future use in cell suspensions, thus enabling studies in the field of somatic embryogenesis and in the production of secondary metabolites. Callus were induced on MS culture media, containing half the concentration of salts, solidified with agar (0.6%), supplemented with sucrose (3%) and concentrations of Kinetin combined with different concentrations of Picloram. Callus formation from leaf explants was dependent of Picloram in the culture media and shown to be very heterogeneous in relation to coloration in different culture media. Greater weight (1.80 g) was observed in callus from the culture media contained both growth regulators, and high concentrations of auxin in the culture media resulted in an increase, almost linearly, of the fresh weight of callus. This did not occur with high concentrations of cytokinin, which in high concentrations had a negative effect on production of callus, resulting in less fresh weight.

Keywords: Auxin. Cytokinin. Callus formation. Tissue culture. *Passiflora gibertii*.

1 INTRODUÇÃO

A produção de maracujá, em âmbito mundial, está concentrada na América do Sul. O Brasil, por apresentar regiões tropicais que conferem as condições ideais para o cultivo do maracujazeiro, é o maior produtor e consumidor desta frutífera. Porém, mesmo assumindo posição de destaque em relação ao desenvolvimento do maracujazeiro, atualmente, têm-se observado vários problemas, como bacteriose, viroses e adaptações climáticas, que levam à diminuição da potencialidade de produção da frutífera no país (LIMA; GOLOMBIESKI; AYUB, 2000).

Por ser considerado um dos centros de origem do maracujá e, mundialmente, o maior centro de distribuição geográfica do gênero *Passiflora*, o Brasil apresenta importante variabilidade natural, existindo, no país, as maiores e as melhores coleções de germoplasma de *Passiflora* do mundo (MELETTI; SANTOS; MINAMI, 2000). Essa alta variabilidade genética torna-se muito promissora para os trabalhos de melhoramento genético que visam aperfeiçoar as cultivares já existentes, no que se refere às características do fruto, resistência a doenças e tolerância ao frio. Mas, segundo Faleiro, Junqueira e Braga (2005), essa grande variabilidade genética que apresenta o maracujazeiro ainda deve ser conhecida, caracterizada, protegida, conservada e adequadamente utilizada comercialmente ou em programas de melhoramento genético.

Considerando a importância das espécies silvestres do gênero *Passiflora* para uso nos programas de melhoramento genético por apresentarem resistência a doenças (BARBOSA, 1995; KURODA, 1981; OLIVEIRA, 1987) e pragas, além da maior longevidade, maior adaptação a condições climáticas adversas, período de florescimento ampliado, maior concentração de componentes químicos de interesse para a indústria farmacêutica e outras potencialidades (FIGUEIREDO et al., 2007) e focando na necessidade da conservação da

diversidade do gênero *Passiflora*, a aplicação de técnicas de cultura de tecidos vegetais, como a micropropagação (que pode ser direta ou indireta, neste caso passando pela formação de calos) possibilita a manutenção da biodiversidade por meio da conservação de germoplasma e um rápido aumento no número de indivíduos (ECHEVERRIGARAY et al., 2001), independente das condições ambientais.

Para a obtenção de sucesso na micropropagação *in vitro*, destacam-se alguns fatores, como a seleção e a desinfestação do explante, meios de cultivo e o uso de reguladores de crescimento, os quais são de fundamental importância para a multiplicação *in vitro* de várias espécies (CARVALHO; ARAÚJO, 2008).

Os reguladores de crescimento são responsáveis pelo estabelecimento do equilíbrio hormonal exigido pelos vegetais para a proliferação e o alongamento celular. Na maioria das vezes, isto é conseguido pelo fornecimento exógeno de reguladores de crescimento (VIETEZ; SAN-JOSÉ, 1996). Segundo Gamborg, Davis e Stahlhut (1983) e George, Hall e Klerk (2008), o estabelecimento de uma cultura de calo é possível para, praticamente, qualquer planta, utilizando um meio nutritivo simples enriquecido pelos reguladores de crescimento auxina e citocinina. Já Ozias-Akins e Vasil (1985) mencionam que as citocininas exógenas podem ser dispensadas, visto que muitos tecidos desenvolvem-se *in vitro* apenas com o suprimento de auxinas.

Convergindo para a importância que a espécie nativa *Passiflora gibertii* possui nos programas de melhoramento genético, como espécie resistente a pragas e doenças, bem como o destaque em relação aos compostos químicos de interesse farmacêutico que pode sintetizar, este trabalho foi realizado com o objetivo de obter calos a partir de explantes foliares de *Passiflora gibertii*, visando obter material de qualidade e de forma eficiente para suspensões celulares, estudos na área de embriogênese somática e produção de metabólitos secundários.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas (LCTP), Setor de Fisiologia Vegetal, no Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG.

2.1 Material vegetal

Explantos foliares foram obtidos a partir de plântulas germinadas *in vitro* de maracujazeiro nativo *Passiflora gibertii* N. E. Brown – acesso CPAC MJ-22-01, da coleção de germoplasma da Embrapa Cerrados (CPAC) Planaltina, DF.

2.2 Indução de calos

As folhas foram excisadas em segmentos de, aproximadamente, 1 cm². Em seguida, na superfície abaxial da folha realizaram-se pequenos cortes, os quais ficaram em contato com 10 mL do meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), contendo metade das concentrações de seus sais. O meio de cultura foi suplementado com sacarose (3%) e com concentrações de Cinetina combinados com diferentes concentrações de Picloram, resultando em 24 tratamentos mais o controle, o qual consistiu na utilização do meio de cultura sem os reguladores de crescimento, como mostrado na Tabela 1.

Tabela 1 Relação dos tratamentos propostos em função das combinações de Picloram e Cinetina utilizadas para a indução de calos em explantes foliares de *Passiflora gibertii*.

Tratamentos	Picloram (μM)	Cinetina (μM)
Controle (T0)	0	0
T1	0	0,207
T2	0	0,414
T3	0	0,621
T4	0	0,828
T5	2,07	0
T6	2,07	0,207
T7	2,07	0,414
T8	2,07	0,621
T9	2,07	0,828
T10	4,14	0
T11	4,14	0,207
T12	4,14	0,414
T13	4,14	0,621
T14	4,14	0,828
T15	6,21	0
T16	6,21	0,207
T17	6,21	0,414
T18	6,21	0,621
T19	6,21	0,828
T20	8,28	0
T21	8,28	0,207
T22	8,28	0,414
T23	8,28	0,621
T24	8,28	0,828

O pH do meio foi ajustado para $5,8 \pm 0,1$ e o meio solidificado com ágar (0,6%), antes da autoclavagem, a 120°C , durante 20 minutos. Após a inoculação de um explante foliar em cada tubo de ensaio, estes foram mantidos em sala de crescimento, no escuro, à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, durante 60 dias.

A avaliação foi baseada na presença ou ausência de calos nos explantes foliares, por meio de observações visuais e na massa fresca dos calos, sendo este dado obtido pela diferença entre a massa do tubo de ensaio com o calo e

posteriormente sem o calo, método seguro e viável para a obtenção desse tipo de informação.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, constituído de 10 repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por um explante foliar. Os resultados da interação reguladores de crescimento X massa fresca dos calos foram submetidos à análise de variância, utilizando o software estatístico Sisvar[®] (FERREIRA, 1992), sendo as médias dos tratamentos comparadas, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de significância.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A indução de calos em *P. gibertii* a partir de explantes foliares mostrou-se fortemente dependente da combinação dos reguladores de crescimento, de tal forma que, na ausência da auxina e/ou da citocinina, a formação de calos foi inexistente ou muito baixa. Porém, os calos foram muito mais sensíveis, em especial à ausência do picloram no meio de cultivo, não havendo, nessas condições, formação de calos, mesmo sob a presença de altas concentrações de cinetina (Figura 1). Resultados semelhantes foram observados por Flores et al. (1998) em estudos realizados com duas cultivares de morangueiro (fragaria e ananassa). Em todos os tratamentos com as duas cultivares de morangueiro houve a formação de calos nos discos foliares, exceto naqueles que não apresentavam as auxinas 2,4-D e picloram. Stella e Braga (2002) realizaram uma série de tentativas para a indução de calos em *Rudgea jasminoides* utilizando apenas auxina ou citocinina, porém, sozinhos, os reguladores de crescimento não induziram calo e o explante morreu em curto período de tempo.

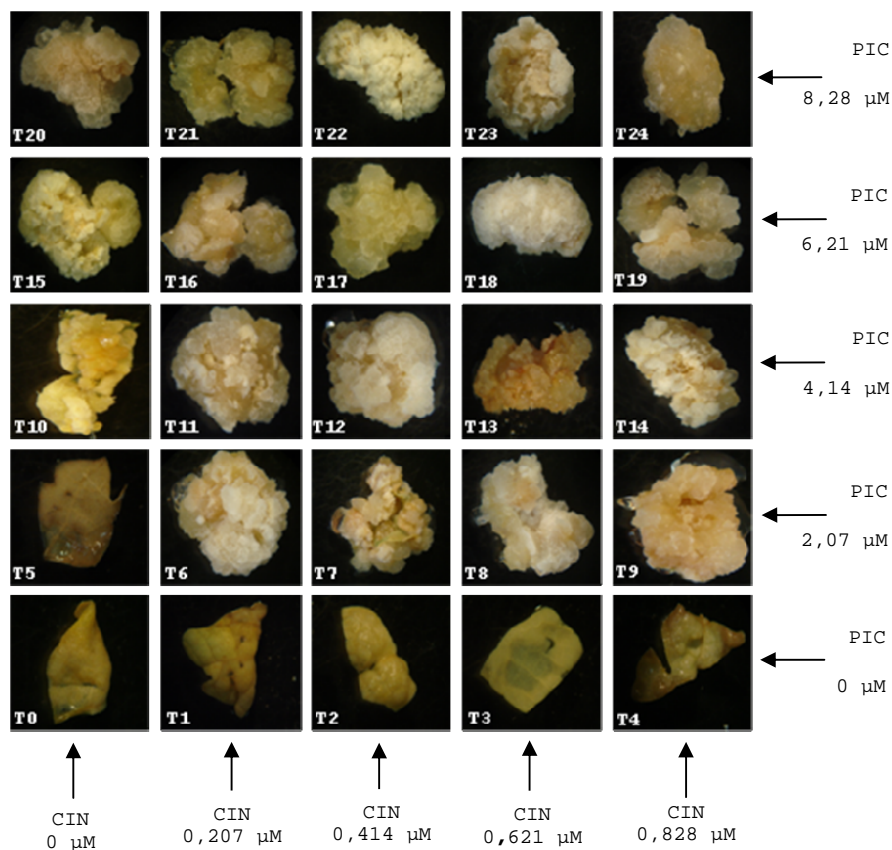


Figura 1 Obtenção de calos, a partir de explantes foliares de *Passiflora gibertii*, em meio de cultura MS contendo diferentes concentrações de Cinetina e Picloram. Observar a heterogeneidade dos calos em relação à coloração

Conforme relataram Jain, Gupta e Newman (1995), citados por Werner et al. (2009), a formação de calos pode ser independente de auxinas e citocininas, dependente de auxinas, dependente de citocininas ou dependente de ambas. Com isso, pode-se inferir que a indução de calos é regida por um balanço hormonal de auxinas e citocininas que varia de acordo com o teor endógeno de fito-hormônio contido no explante. Logo, a notificação da ausência de formação de calos em explantes foliares de *P. gibertii* presentes em meios de cultivos

isentos de reguladores evidencia uma possível deficiência dos teores endógenos de hormônios nos explantes que se encontram isolados das regiões produtoras da planta matriz (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; TORRES; CALDAS, 1998).

Independentemente dos tratamentos, a maioria dos calos apresentou coloração bastante heterogênea, sendo possível identificar áreas de calos com coloração amarelo-claro, amarelo-escuro, branco e marrom (Figura 1). Diferentes tipos de calos também surgiram a partir de explantes de *Rudgea jasminoides* cultivados em meios com picloram ou em combinação com cinetina, tendo sido conseguido calos friáveis de coloração branca apenas nos explantes que estavam em meios de cultura isentos de cinetina e suplementados com 8,29 μ M de picloram (STELLA; BRAGA, 2002). Os mesmos resultados foram obtidos por Fitch e Moore (1990), para cana-de-açúcar, os quais descreveram que, sob altas concentrações de picloram no meio de cultivo, há a formação de calos friáveis de coloração branca. No caso dos calos obtidos dos discos foliares de *P. gibertii*, não foi possível estabelecer um padrão de coloração relacionando-o com a concentração do regulador no meio de cultivo já que, sob uma mesma concentração do regulador, os calos ainda se mantiveram bastante heterogêneos.

A combinação das diferentes concentrações de picloram e cinetina resultou em tratamentos que diferiram estatisticamente entre si, em relação à média das massas frescas dos calos obtidos dos discos foliares (Tabela 2).

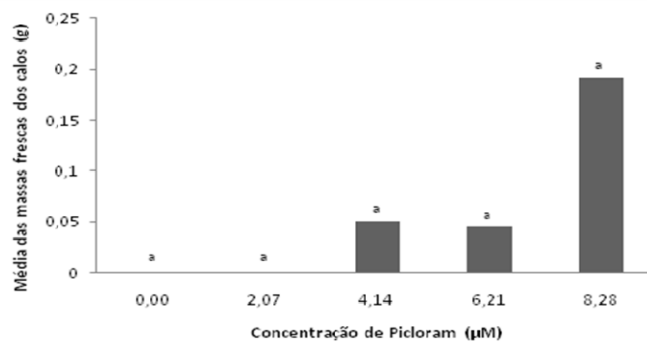
Tabela 2 Comparação das médias da massa fresca dos calos obtidos dos discos foliares de *P. gibertii*, cultivados em meio MS, com metade das concentrações de sais, suplementado com diferentes concentrações de Picloram e Cinetina

Tratamentos	Regulador de crescimento (μM)		Médias da massa fresca dos Calos (g)
	Picloram	Cinetina	
Controle	-	-	0,00 d*
T1	-	0,207	0,00 d
T2	-	0,414	0,00 d
T3	-	0,621	0,00 d
T4	-	0,828	0,00 d
T5	2,07	-	0,00 d
T6	2,07	0,207	0,90 b
T7	2,07	0,414	0,90 b
T8	2,07	0,621	0,80 b
T9	2,07	0,828	0,60 c
T10	4,14	-	0,05 d
T11	4,14	0,207	1,80 a
T12	4,14	0,414	0,60 c
T13	4,14	0,621	0,80 b
T14	4,14	0,828	0,80 b
T15	6,21	-	0,04 d
T16	6,21	0,207	1,10 b
T17	6,21	0,414	1,50 a
T18	6,21	0,621	1,30 a
T19	6,21	0,828	0,60 c
T20	8,28	-	0,20 d
T21	8,28	0,207	1,40 a
T22	8,28	0,414	1,60 a
T23	8,28	0,621	1,70 a
T24	8,28	0,828	1,50 a

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, a 5% de significância, pelo teste de Scott e Knott (1974)

Maiores valores de massas frescas dos calos foram conseguidas através das combinações de picloram com cinetina, destacando, na maioria dos casos, as maiores massas frescas para os calos que estavam em meios de cultura com elevadas concentrações de Picloram. Foi observado um aumento na média das massas frescas dos tratamentos que combinavam as diferentes concentrações de Picloram com 0,414; 0,621 e 0,828 μM de Cinetina (Figura 2), indicando que quanto maior a concentração de Picloram no meio, maior era a massa fresca dos calos.

A



B

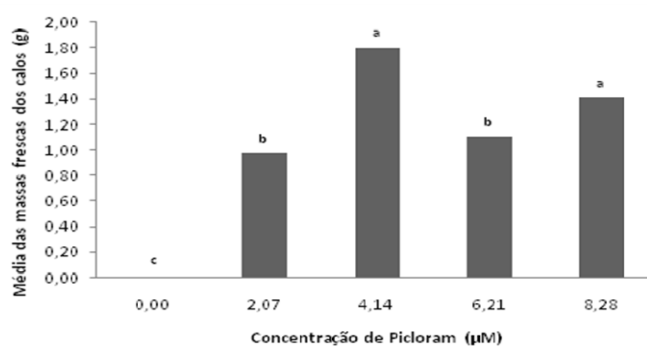
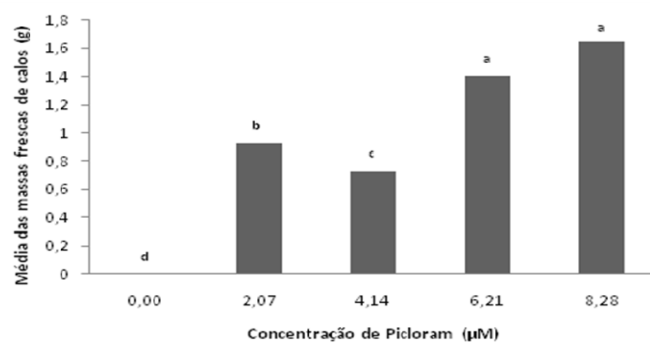
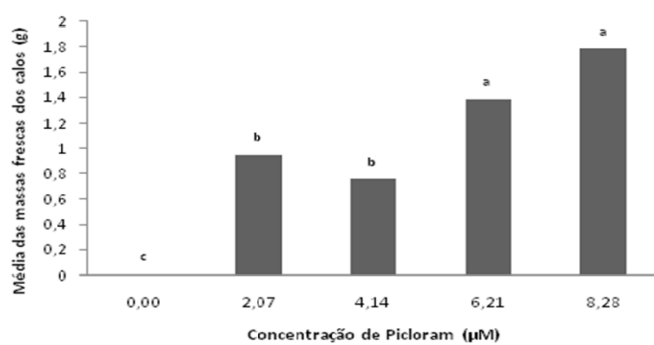
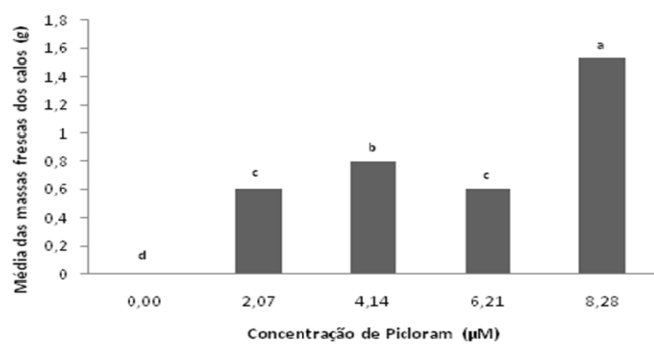


Figura 2 Massa fresca de calos obtidos a partir de semegmentos foliares de *P. gibertii*. A) Média das massas frescas dos calos formados na ausência do regulador de crescimento cinetina, B) média das massas frescas dos calos formados em meio MS contendo 0,207µM de cinetina, C) média das massas frescas dos calos formados em meio MS contendo 0,414µM de cinetina, D) média das massas frescas dos calos formados em meio contendo 0,621µM de cinetina e E) média das massas frescas dos calos formados em meio MS contendo 0,828µM de cinetina

(...continua...)

C**D****E**

Já para a variável Cinetina, com a concentração máxima (0,828 μM) dessa citocinina no meio de cultura, houve um decréscimo ou, pelo menos, uma tendência de decréscimo na massa fresca dos calos (Figura 3).

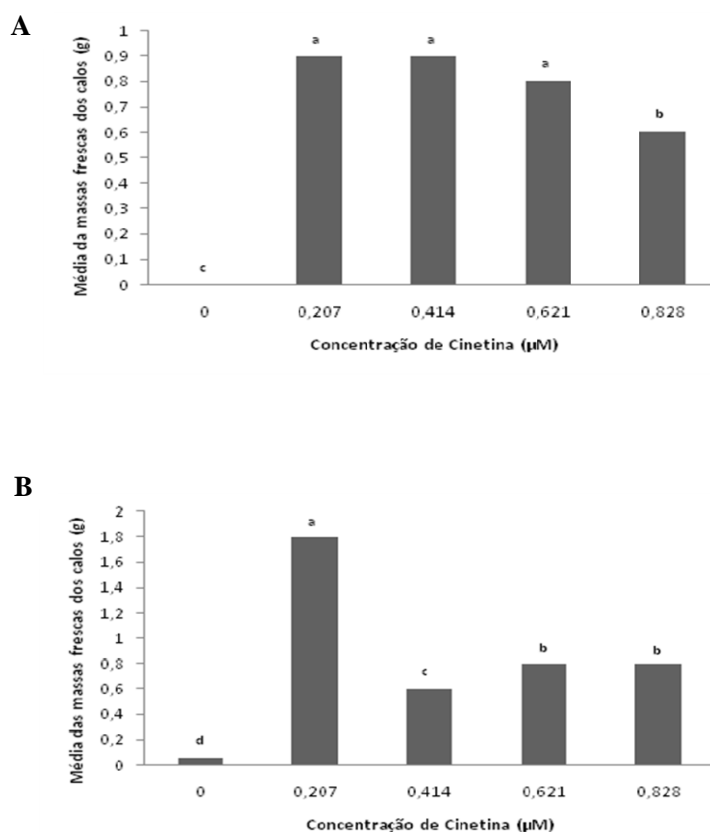
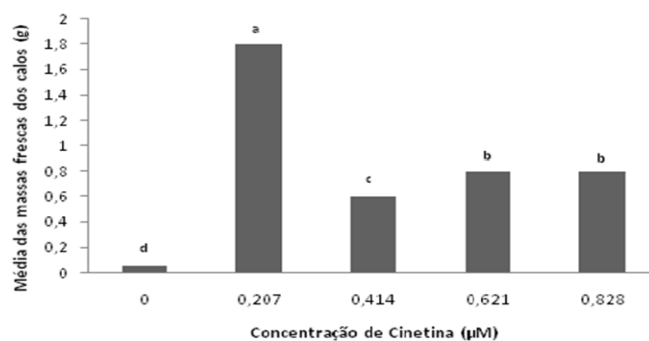


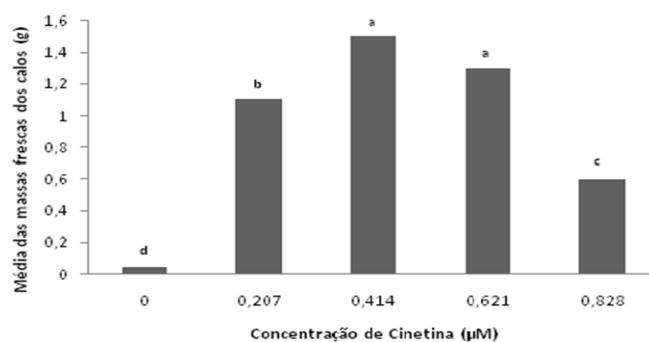
Figura 3 Massa fresca de calos obtidos a partir de semegmentos foliares de *P. gibertii*. A) Média das massas frescas dos calos formados na concentração de 0,207 μM de picloram, B) média das massas frescas dos calos formados na concentração de 0,414 μM de picloram, C) média das massas frescas dos calos formados na concentração de 0,621 μM de picloram e D) média das massas frescas dos calos formados na concentração de 0,828 μM de picloram

(...continua...)

C



D



O resultado da massa fresca dos calos obtido do tratamento 11 (4,14μM de PIC + 0,207μM de CIN), mostra que para uma produção em larga escala de calos de *P. gibertii*, este tratamento é a melhor opção, visto que, mesmo não diferindo estatisticamente dos tratamentos 17 (6,21 μM de PIC + 0,414 μM de CIN), 18 (6,21 μM de PIC + 0,621 μM de CIN), 21 (8,28 μM de PIC + 0,207 μM de CIN), 22 (8,28 μM de PIC + 0,414 μM de CIN), 23 (8,28 μM de PIC + 0,621 μM de CIN) e 24 (8,28 μM de PIC + 0,828 μM de CIN), o tratamento 11 é o qual apresenta menores concentrações dos reguladores de crescimento, o que implica em uma maior economia dos reguladores, resultando em um custo de

produção menor. Kaur e Kothari (2004), ao estudarem o efeito do picloram e da cinetina na indução de calos em kodo millet (*Paspalum scrobiculatum* L. cv. GPUK-3), verificaram que o aumento da massa fresca do calo era diretamente proporcional à quantidade de picloram no meio de cultura e o Picloram (4,14 μ M), combinado com a Cinetina (4,6 μ M), foi considerado o mais responsivo, resultando na maior massa fresca. Ketchum, Gibson e Gallo (1995) testaram os efeitos da concentração e da combinação de diversos reguladores de crescimento no desenvolvimento de calos de *Taxus brevifolia*. O regulador de crescimento Picloram foi considerado a melhor auxina para a cultura de células de *Taxus*. Em todos os tratamentos, a concentração de 4,14 μ M de picloram foi mais eficiente para o crescimento dos calos, em culturas de longo prazo, comparada com os resultados obtidos com as demais auxinas. Para as citocininas, os autores comprovaram que a cinetina promove um crescimento maior dos calos quando se emprega apenas o regulador 2,4-D, ou 2,4-D com BAP. De qualquer forma, a combinação de auxinas com citocininas foi benéfica para o crescimento. Neste caso, os autores relataram que os reguladores picloram e cinetina foram utilizados em diferentes proporções. Os resultados alcançados para as combinações de 4,14:0,46; 4,14:1,0; 4,14:1,8 e 3,0:0,3 (μ M de Picloram: μ M de Cinetina) não diferiram entre si, porém, foram os melhores resultados encontrados, quando comparados com outros reguladores de crescimento.

4 CONCLUSÕES

A formação de calos em explantes foliares de *Passiflora gibertii* é dependente da presença do regulador de crescimento Picloram no meio de cultura.

Diferentes combinações de concentração de Picloram e Cinetina resultaram em calos heterogêneos quanto à coloração.

Maior massa fresca em calos de *P. gibertii* é obtida em meios de cultura que contém Picloram em concentrações mais elevadas na interação com cinetina.

As concentrações dos reguladores de crescimento Picloram e Cinetina na composição do meio de cultivo são antagônicas. Maior concentração de Picloram resulta em maior massa fresca, enquanto que níveis mais elevados de Cinetina ocasionam a sua redução.

REFERÊNCIAS

BARBOSA, L. S. **Resistência de passiflora spp a xanthomonas campestris pv. passiflorae e detecção do patógeno em sementes.** 1995. 66 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1995.

CARVALHO, J. M. F. C.; ARAÚJO, S. de S. **Técnicas de cultivo *in vitro* aplicadas na mamoneira.** Campina Grande: Embrapa, 2008. 23 p. (Documentos, 194).

ECHEVERRIGARAY, S. et al. Cultura de tecidos e micropropagação de plantas aromáticas e medicinais. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Biotecnologia na agricultura e na agroindústria.** Guaíba: Agropecuária, 2001. p. 257-276.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. Germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro: desafios da pesquisa. In: _____. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético.** Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. p. 187-210.

FERREIRA, D. F. **SISVAR (Sistema para análise de variância para dados balanceados).** Lavras, UFLA, p. 79, 1992.

FIGUEIREDO, M. A. et al. Indução *in vitro* de calos em duas espécies de maracujazeiro nativo. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 288-290, jul. 2007. Suplemento.

FITCH, M. M. M.; MOORE, P. H. Comparison of 2,4-D and picloram for selection of long-term totipotent green callus cultures of sugarcane. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 20, n. 3, p. 157-163, Sept. 1990.

FLORES, R. et al. Calogênese *in vitro* de duas cultivares de Morangueiro (fragaria x ananassa) a partir de discos foliares. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 4, n. 1, p. 9-14, jan./abr. 1998.

GAMBORG, O. L. Callus and cell culture. In: WETTER, L. R.; CONSTABEL, F. **Culture methods**. Ottawa: NRCC, 1982. p. 1-9.

GAMBORG, O. L.; DAVIS, B. P.; STAHLHUT, R. W. Cell division and differentiation in protoplasts from cell cultures of Glycine species and leaf tissue of soybean. **International Plant Research Institute**, San Carlos, CA 94070, USA, 1983.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**. 3.ed. Dordrecht: The Background, v.1, 2008.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, 1998. v. 1, p. 183-242.

JAIN, S. M.; GUPTA, P. K.; NEWMAN, R. J. Somatic embryogenesis in woody plants. In: WERNER, E. T. et al. Controle da calogênese do pau-brasil *in vitro*. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 33, n. 6, p. 987-996, nov./dez. 2009.

KAUR, P.; KOTHARI, S. L. *In vitro* culture of kodo millet: influence of 2,4-D and picloram in combination with kinetin on callus initiation and regeneration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 77, n. 1, 73-79, Oct. 2004.

KETCHUM, R. E. B.; GIBSON, D. M.; GALLO, L. G. Media optimization for maximum biomass production in cell cultures of pacific yew. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 42, n. 2, p. 185-193, May 1995.

KURODA, N. **Avaliação do comportamento quanto a resistência de espécies e progênies de maracujazeiro a Xanthomonas campestris pv. passiflorae**. Jaboticabal: FCAV-UNESP, 1981. 45 p.

LIMA, D. M.; GOLOMBIESKI, E. R.; AYUB, R. A. Aplicação de técnicas de biotecnologia à cultura e melhoramento do maracujazeiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 2, p. 359-363, fev. 2000.

MELETTI, L. M. M.; SANTOS, R. R.; MINAMI, K. Melhoramento do maracujazeiro-amarelo: obtenção do cultivar 'composto IAC-27'. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, n. 3, p. 491-498, jul./set. 2000.

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

OLIVEIRA, J. C. de. Melhoramento genético. In: RUGGIERO, C. (Ed.). **Cultura do maracujazeiro**. Ribeirão Preto: L. Summa, 1987. p. 218-246.

OZIAS-AKINS, P.; VASIL, I. K. Nutrition of plant tissue cultures. In: VASIL, I. K. (Ed.). **Cell culture and somatic cell genetics of plants: cell growth, nutrition, cytodifferentiation and cryopreservation**. Florida: Academic, 1985. v. 2, p. 128-147.

STELLA, A.; BRAGA, M. R. Callus and cell suspension cultures of *Rudgea jasminoides*, a tropical woody Rubiaceae. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 68, n. 3, p. 271-276, Mar. 2002.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Raleigh, v. 30, n. 3, p. 507-512, Sept. 1974.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, 1998. v. 1

VIETEZ, A. M.; SAN-JOSÉ, M. C. Adventitious shoot regeneration from *Fagus sylvatica* leaf explants *in vitro*. **In vitro Cellular & Developmental Biology**, Columbia, v. 32, n. 3, p. 140-147, Mar. 1996.

WERNER, E. T. et al. Controle da calogênese do Pau-Brasil *in vitro*. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 33, n. 6, p. 987-996, 2009.

CAPÍTULO 3

Análise quantitativa de vitamina C e fenóis totais em folhas e calos obtidos de segmentos foliares de *Passiflora gibertii* N. E. Brown

RESUMO

A cultura de calos e de suspensão celulares é uma alternativa para a otimização da biossíntese de compostos de interesses farmacêuticos, apresentando-se como uma vantagem tanto do ponto de vista ecológico, ao possibilitar a redução da exploração indiscriminada das espécies medicinais para a extração desses compostos, como econômico, já que o processo de purificação desses compostos produzidos *in vitro*, apresenta um custo menor. Os maracujazeiros, como são conhecidas popularmente as espécies da família Passifloraceae, destacam-se pela importância em relação às propriedades nutricionais e farmacológicas. Beneficiando-se das propriedades medicinais dos maracujazeiros, das propriedades nutritivas de seus frutos e do potencial que a cultura de células e tecidos apresenta para a produção de compostos que tenham relevância para a indústria farmacêutica, com a realização do presente trabalho objetivou-se quantificar os teores de vitamina C e fenóis totais nas folhas e nos calos obtidos de segmentos foliares de *Passiflora gibertii*. Os calos foram induzidos em meio de cultura MS contendo metade das concentrações de seus sais e suplementado com sacarose (3%) e com concentrações de Cinetina combinados com diferentes concentrações de Picloram, resultando em quatro tratamentos. Para as avaliações de vitamina C e fenóis totais, foram coletados, aproximadamente, 5 g de calos frescos, durante os períodos de indução, subcultivo 1, 2 e 3. Para as avaliações desses mesmos compostos nas folhas, a mesma quantidade de massa fresca foi coletada de um espécime, o qual se originou da germinação *in vitro* de semente de *P. gibertii*, passando por um processo de aclimatização até ser transferida para o campo. As folhas apresentaram teores de 127,495 e 708,63 mg 100g⁻¹ de vitamina C e fenóis totais, respectivamente. Para ambos os compostos analisados, os teores foram menores nos calos, os quais apresentaram valores máximos de vitamina C no período de indução (94,756 mg 100g⁻¹) e de fenóis também no período de indução (66,213 mg 100g⁻¹). Para os teores de fenóis, *P. gibertii* não se destacou, quando comparada com a produção desse composto em outras plantas. Já para os teores de vitamina C, *P. gibertii* apresentou eficiência na produção dessa vitamina, quando comparada outras espécies de maracujazeiro.

Palavras-Chaves: Fenóis. Vitamina C. Compostos secundários. Cultura de células. *Passiflora gibertii*.

ABSTRACT

The culture of callus and cell suspension is an alternative for the optimization of the biosynthesis of compounds of pharmaceutical interest, presenting itself as an advantage both from an ecological viewpoint, to enable the reduction of indiscriminate exploitation of medicinal plants for the extraction of these compounds, such as economic, since the purification process of these compounds produced in vitro, has a lower cost. The passion fruits, thus popularly known the species of the family Passifloraceae, stand out the importance in relation to nutritional and pharmacological properties. Benefiting from the medicinal properties of passion fruits, the nutritional properties of its fruits and the potential that the cultivation of cells and tissues provides for the production of compounds that are relevant for the pharmaceutical industry, this study aimed to quantify the amount of vitamin C and total phenols in leaves and callus obtained from leaf segments of *Passiflora gibertii*. Callus were induced on MS culture media containing half the concentration of salts and supplemented with sucrose (3%) and concentrations of Kinetin combined with different concentrations of Picloram, resulting in four treatments. For phytochemical analysis were collected approximately 5 grams of fresh callus during periods of induction, subculture 1, 2 and 3. For phytochemical analysis of the leaf, the same amount of fresh weight was collected of a plant in the field, which originated from in vitro seed germination of *P. gibertii*, passing through an acclimatization process to be transferred to the field. The leaves showed levels of 127.495 and 708.63 mg 100g⁻¹ of vitamin C and phenols, respectively. For both compounds tested, the levels were lower in callus, which showed maximum values of vitamin C in the induction period (94.756 mg 100 g⁻¹) and phenols also in the induction period (66.213 mg 100g⁻¹). For phenols levels, the species *Passiflora gibertii* was not significant when compared with the production of this compound in other plants. As for the vitamin C content, the species *Passiflora gibertii* showed has efficiency in the production of the vitamin compared with production in other species of passion fruit.

Keywords: Phenols. Vitamin C. Secondary compounds. Cell culture. *Passiflora gibertii*.

1 INTRODUÇÃO

Fontes de produtos naturais biologicamente ativos, as plantas apresentam imensa diversidade, em termos de estruturas e de propriedades físico-químicas e biológicas (GUERRA; NODARI, 2001). Esse fato impulsionou as indústrias farmacêuticas a direcionarem a atenção para o potencial que as plantas cultivadas possuem em fornecer novas substâncias para a farmácia (MANZANO, 2001) por meio dos princípios ativos extraídos dos extratos vegetais para a formulação em massa dos medicamentos (AZEVEDO, 2008).

Com o avanço da biotecnologia, a cultura de calos e de suspensão celulares é uma alternativa para a otimização da biossíntese de compostos de interesses farmacêuticos (SANTOS et al., 2007), configurando-se como uma vantagem tanto do ponto de vista ecológico, por possibilitar a redução da exploração indiscriminada das espécies medicinais para a extração desses compostos, como econômico, já que o processo de purificação desses compostos produzidos *in vitro* apresenta um custo menor.

Dentre as estratégias que prevêm um aumento na produção de compostos bioativos em culturas de calos e suspensão celulares, tem-se a adição de compostos ou intermediários no meio de cultivo (SILVESTRINI et al., 2002). Porém, maior sucesso tem sido conseguido por meio dos elicitores, os quais podem ser bióticos (quitosanas, micélios de fungos patogênicos, extratos de proteínas, entre outros) ou abióticos (metais pesados, temperatura, luz, etc.). Os elicitores são responsáveis pela indução de estresse, que pode ser tanto físico como químico, nas células cultivadas *in vitro*, propiciando a produção de metabólitos secundários (FUMAGALI et al., 2008).

Segundo Manzano (2001), aproximadamente um terço dos medicamentos descendem de plantas por meio do seu processamento pela

indústria farmacêutica ou, segundo Azevedo (2008), pela manipulação das farmácias homeopáticas, sendo diversos produtos formulados com os princípios ativos do maracujá.

Os maracujazeiros, como são conhecidas popularmente as espécies da família Passifloraceae, destacam-se pela importância em relação às propriedades nutricionais e farmacológicas, sendo conhecidos tradicionalmente pela ação sedativa e vermífuga, além de seus frutos apresentarem vitamina C, B₂ e B₅, e sais minerais, como ferro, cálcio e fósforo (AZEVEDO, 2008).

A vitamina C é produzida pela maioria dos animais, exceto pelo homem, pelo macaco, pela cobaia e por alguns peixes e pássaros, que não possuem a enzima gulonolactona oxidase, envolvida na biossíntese do ácido L-ascórbico a partir de D-glicose. Dessa forma, a mesma deve ser obtida pela alimentação (LEHNINGER; NELSON; COX, 1993). O nome químico da vitamina C – ácido ascórbico – é uma representação da propriedade química e biológica desta vitamina. A primeira propriedade deve-se ao fato de a vitamina ser um ácido que, embora não pertença à classe dos ácidos carboxílicos, apresenta uma estrutura química que lhe confere, em solução aquosa, a natureza ácida. É em solução aquosa também que o ácido ascórbico é um poderoso agente redutor, funcionando como excelente antioxidante. A segunda propriedade representa seu valor biológico na proteção contra a doença escorbuto (FIORUCCI; SOARES; CAVALHEIRO, 2002).

Já os compostos fenólicos são estruturas químicas que apresentam hidroxilas e anéis aromáticos, nas formas simples ou de polímeros. Dos compostos fenólicos existentes destacam-se os flavanóides, os ácidos fenólicos, os taninos e os tocoferóis, sendo todos antioxidantes fenólicos de ocorrência comum nos vegetais (ANGELO; JORGE, 2007).

O grupo dos compostos fenólicos é originado do metabolismo secundário, o qual se caracteriza pelas moléculas bioativas de baixo peso

molecular e que exercem importantes papéis na interação da planta com o meio ambiente (ESTRADA-ZÚÑIGA et al., 2009). Atuam na proteção do vegetal contra microrganismos, herbívoros e intempéries ambientais, além de interferirem em processos simbióticos e na atração de polinizadores (BRISKIN, 2000).

Os compostos fenólicos são importantes antioxidantes, atuando na interrupção de radicais livres, configurando-se como importantes compostos que promovem a redução da oxidação lipídica tanto em tecidos vegetais como animais. Desta forma, além de conservarem a qualidade do alimento, quando incorporados na alimentação humana reduzem o risco de desenvolvimento de patologias, como arteriosclerose e câncer (NAMIKI, 1990; RAMARATHNAM, 1995). Neste último caso, a atividade dos compostos fenólicos tem sido relatada na inibição dos cânceres de cólon, esôfago, pulmão, fígado, mama e pele. Sendo os compostos fenólicos que apresentam este potencial o resveratrol, quercetina, ácido caféico e flavonóis (PIMENTEL; FRANCKI; GOLLÜCKE, 2005).

Ressaltando a propriedade antioxidante da vitamina C e dos compostos fenólicos, esses compostos têm sido alvos da indústria farmacêutica, a qual tem interesse em substituir os antioxidantes sintéticos pelos naturais, já que aqueles, devido ao potencial de carcinogênese e de outros males, como significativa proliferação do retículo endoplasmático, têm tido sua utilização restrita e substituída pelos antioxidantes naturais (MELO; GUERRA, 2002; SIMÃO, 1985; YILDRIM, MAVI; KARA, 2002; ZHENG; WANG, 2001).

Concebendo o maracujá como importante produtor de compostos secundários, as propriedades nutritivas de seus frutos e o potencial que a cultura de células e tecidos apresenta para a produção de compostos que tenham relevância para a indústria farmacêutica, este trabalho teve por objetivo quantificar o teor de vitamina C e de fenóis totais nas folhas e nos calos obtidos de segmentos foliares de *Passiflora gibertii*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas (LCTP), Setor de Fisiologia Vegetal, no Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG.

2.1 Material vegetal

Explantes foliares foram obtidos a partir de plântulas germinadas *in vitro* de maracujazeiro nativo *Passiflora gibertii* N. E. Brown – acesso CPAC MJ-22-01, da coleção de germoplasma da Embrapa Cerrados (CPAC) Planaltina, DF.

2.2 Indução de calos

As folhas foram excisadas em segmentos de, aproximadamente, 1 cm². Em seguida, na superfície abaxial da folha, realizaram-se pequenos cortes, os quais ficaram em contato com 10 mL do meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), contendo metade das concentrações de seus sais. O meio de cultura foi suplementado com sacarose (3%) e com concentrações pré-estabelecidas de Cinetina combinadas com diferentes concentrações de Picloram, resultando em quatro tratamentos (Tabela 1), de acordo com análises anteriores que consideraram, para a seleção dos tratamentos, a maior produção de massa fresca de calos. O pH do meio foi ajustado para 5,8±0,1 e o meio solidificado com ágar (0,6%), antes da autoclavagem, a 120°C, durante 20 minutos. Após a inoculação de um explante foliar em cada tudo de ensaio, estes foram mantidos em sala de crescimento, no escuro, à temperatura de 25±2°C, durante 60 dias. Posteriormente, realizou-se o primeiro subcultivo, seguido de mais três subcultivos, sempre em intervalos de 60 dias para cada um.

Tabela 1 Combinações de concentrações de Picloram e Cinetina utilizadas para a obtenção de calos a partir de explantes foliares de *Passiflora gibertii* para posterior quantificação de vitamina C e taninos totais

Tratamentos	Picloram (μM)	Cinetina (μM)
T1	4,14	0,207
T2	8,28	0,414
T3	8,28	0,621
T4	8,28	0,828

2.3 Preparo das amostras

Para a quantificação de vitamina C e de fenóis totais de calos obtidos de segmentos foliares de *Passiflora gibertii*, de cada subcultivo de cada tratamento foram coletados, aproximadamente, 5 g de calos frescos. Estes foram mantidos no meio de cultura e no escuro, até a realização da quantificação. Para a quantificação desses mesmos compostos nas folhas, estas foram coletadas de um espécime, a qual foi obtida a partir da germinação *in vitro* de semente de *P. gibertii* (acesso CPAC MJ-22-01, da coleção de germoplasma da Embrapa Cerrados (CPAC) Planaltina, DF) e aclimatizada para posterior transferência para o campo.

2.4 Quantificação de vitamina C

O teor de vitamina C foi determinado pelo método colorimétrico, utilizando 2,4 dinitrofenilhidrazina, segundo Strohecker e Henning (1967). Os resultados foram expresso em mg de vitamina C, por 100 g de calo fresco.

2.5 Quantificação de fenóis totais

O método utilizado foi de Folin-Denis, que é um método colorimétrico, de acordo com a Association of Official Analytical chemists - AOAC (1990) e Deshpande, Cheryan e Salunke (1986). A quantificação foi feita pela redução do reagente de Folin-Denis na presença de fenóis, resultando em uma coloração azul, sendo a intensidade dessa cor produzida medida em espectrofotômetro a 760 nm. Os resultados foram expresso em mg de fenóis totais, por 100 g de calo fresco.

2.6 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x2 (concentração do regulador de crescimento e diferentes subcultivos). Os resultados foram submetidos à análise de variância, utilizando o programa estatístico Sisvar[®] (FERREIRA, 1992), sendo as médias dos tratamentos comparados pelo teste de Scott-Knott, a 5% de significância.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As folhas de *Passiflora gibertii* apresentaram elevados teores de vitamina C ($127,495 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$), quando comparados com os teores encontrados nos calos e nas polpas de outras espécies de maracujazeiro.

Os dados relativos à análise quantitativa de vitamina C presente nos calos de *Passiflora gibertii* encontram-se na Tabela 2. Os tratamentos diferiram estatisticamente entre si e observa-se que os maiores teores de vitamina C foram obtidos no tratamento 1, que continha $4,14 \mu\text{M}$ de Picloram e $0,207 \mu\text{M}$ de Cinetina. O tratamento 3 ($8,28 \mu\text{M}$ de Picloram e $0,621 \mu\text{M}$ de Cinetina) foi o qual apresentou os menores teores. A partir disso, pode-se inferir que a concentração do regulador de crescimento no meio de cultivo influenciou de alguma forma a biossíntese de vitamina C, podendo ter atuado como um elicitador.

Tabela 2 Comparação do teor de vitamina C em calos de *Passiflora gibertii* nos diferentes tratamentos (T1: $4,14 \mu\text{M}$ de PIC + $0,207 \mu\text{M}$ de CIN; T2: $8,28 \mu\text{M}$ de PIC + $0,414 \mu\text{M}$ de CIN; T3: $8,28 \mu\text{M}$ de PIC + $0,621 \mu\text{M}$ de CIN e T4: $8,28 \mu\text{M}$ de PIC + $0,828 \mu\text{M}$ de CIN) e durante os subcultivos

Tratamento	Quantificação de Vitamina C ($\text{mg } 100\text{g}^{-1}$)			
	Período de indução	1° subcultivo	2° subcultivo	3° subcultivo
T1	94,7563 aA*	6,9400 bC	3,8260 bD	14,8516 bB
T2	61,3143 bA	10,1200 aB	4,8786 bC	11,1583 cB
T3	5,6546 cB	8,0900 aA	8,5720 aA	10,2763 cA
T4	3,6666 dC	9,5433 aB	4,7130 bC	22,8840 aA

* Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna ou maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knot, a 5% de significância

Além da diferença encontrada entre os tratamentos, pôde-se perceber que o teor de vitamina C nos calos de *Passiflora gibertii* oscila entre os subcultivos em um mesmo tratamento. Para os tratamentos 1 e 2, o período de indução, que corresponde a 60 dias após a inoculação do explante foliar no meio de cultivo, foi o mais relevante para a produção da vitamina C, apresentando teores de $94,756$ e $61,314 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$, respectivamente. Sucessivamente, nesses

mesmos tratamentos, tem-se um declínio relativamente grande na produção. O inverso ocorreu para os tratamentos 3 e 4, nos quais a produção de vitamina C no período de indução foi inferior, quando comparada com as análises realizadas posteriormente (Tabela 2).

Deve-se ressaltar que tais teores encontrados nos calos de *Passiflora gibertii* são elevados, comparados com os encontrados nas polpas dos frutos das espécies *Passiflora alata* e *Passiflora nitida*, as quais apresentaram 56,30 e 33,02 mg 100g⁻¹, respectivamente (COHEN et al., 2008). Valores ainda inferiores foram encontrados para a espécie *Passiflora alata*, a qual foi tratada com fitorreguladores para a conservação pós-colheita, resultando em teores que ficaram entre 7,88 e 10,26 mg 100g⁻¹ (SILVA et al., 1999). Enfatizando ainda mais a importância do alto teor de vitamina C encontrado nos calos de *Passiflora gibertii*, especialmente durante o período de indução, segundo a tabela brasileira de composição dos alimentos (NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM ALIMENTAÇÃO - NEPA, 2004), a espécie comercial de maracujá *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* apresenta 20 mg 100g⁻¹ de vitamina C na polpa. Esse valor é consideravelmente inferior, comparado ao teor observado nas folhas e em calos de *Passiflora gibertii*. Não foram encontrados, na literatura, dados referentes aos teores de vitamina C em calos de maracujazeiro, bem como o teor de vitamina C na polpa ou em outras localidades da espécie *Passiflora gibertii*. Apesar disso, os resultados obtidos foram considerados satisfatórios quando comparados com os resultados encontrados em relação à produção da vitamina C na polpa dos demais maracujazeiros. Logo, o cultivo *in vitro* de células vegetais de *Passiflora gibertii* apresenta-se como importante potencial para a produção de vitamina C.

Estes resultados, altos teores de vitamina C encontrados nos calos e nas folhas, também podem sugerir que a espécie *Passiflora gibertii* destaca-se dentre outras espécies de maracujazeiro, em relação ao valor nutricional. A partir disso,

é importante realizar análises bromatológicas, no intuito de verificar se o alto teor de vitamina C também está presente na polpa dos frutos de *Passiflora gibertii*, agregando-lhe, além dos valores que esta espécie silvestre de maracujazeiro já apresenta, como resistência a doenças (BARBOSA, 1995; KURODA, 1981; OLIVEIRA, 1987) e pragas, maior longevidade, maior adaptação a condições climáticas adversas, período de florescimento ampliado, maior concentração de componentes químicos de interesse para a indústria farmacêutica (FIGUEIREDO et al., 2007) e alto valor energético de seus frutos. Com isso, possibilita a utilização dessa espécie em programas de melhoramento genético que objetivam não apenas a resistência a certos patógenos, mas também o enriquecimento nutricional, bem como a produção de frutos compostos por promotores de saúde.

As folhas de *Passiflora gibertii* apresentaram-se teores de fenóis totais igual a 708,63 mg 100g⁻¹ (0,7%). Quando comparados com os teores de fenóis presentes em outras espécies de plantas, a *P. gibertii* não se destacou como produtora deste metabólito. Santos & Blatt (1998) verificaram nas folhas de *Pyrostegia venusta*, porcentagens de fenóis totais iguais a 1,72 e 1,87%. Carvalho et al. (2000), quantificaram os teores de fenóis totais na folhas de cafeeiros nas épocas de desbaste e estágio de desenvolvimento dos frutos, encontrando uma porcentagem máxima de 12,22 e 12,66%, respectivamente.

Os teores dos fenóis totais nos calos de *P. gibertii* foram ainda menores quando comparados com os teores encontrados nas folhas. O teor máximo quantificado foi de 66,213 mg 100g⁻¹ (0,06%). Castro et al. (2009) analisaram os teores de fenóis totais em calos de barbatimão induzidos em meio contendo 2,4-D ou BAP na presença e na ausência de luz. No meio suplementado com 2,4-D na ausência de luz foram conseguidos os maiores teores de fenóis totais, os quais corresponderam a 1% em média. Já na presença de luz, este rendimento caiu para 50%. Com o BAP suplementando o meio de cultura, os autores verificaram

um incremento de 23% de fenóis totais (aproximadamente 1,3%) em relação àqueles obtidos do tratamento com 2,4-D.

Os dados da Tabela 3 demonstram que houve diferença estatística em relação aos teores de fenóis totais durante os subcultivos de um mesmo tratamento e também entre os tratamentos, evidenciando, assim como já apresentado na discussão dos teores de vitamina C, a provável influência dos reguladores de crescimento na produção dos fenóis totais, os quais se apresentaram em maior quantidade no tratamento 4, que continha a maior concentração dos reguladores de crescimento. Pode-se observar que é no período de indução que se tem a maior quantidade de fenóis para todos os tratamentos, exceto para o tratamento 1. Isso pode ser justificado, talvez, pela influência do explante foliar presente no material coletado para a análise. O tratamento 4 (8,28 μM de PIC + 0,828 μM de CIN) sobressai-se em relação aos demais tratamentos, apresentando teor de 66,21 $\text{mg } 100\text{g}^{-1}$, seguido dos tratamentos 3, 2 e 1, que apresentaram, respectivamente, 30,69; 27,03 e 16,25 $\text{mg } 100\text{g}^{-1}$.

Tabela 3 Comparação do teor de fenóis totais em calos de *Passiflora gibertii* nos diferentes tratamentos (T1: 4,14 μM de PIC + 0,207 μM de CIN; T2: 8,28 μM de PIC + 0,414 μM de CIN; T3: 8,28 μM de PIC + 0,621 μM de CIN e T4: 8,28 μM de PIC + 0,828 μM de CIN) e durante os subcultivos

Tratamento	Quantificação de fenóis totais ($\text{mg } 100\text{g}^{-1}$)			
	Período de indução	1° subcultivo	2° subcultivo	3° subcultivo
T1	16,2656 dB*	21,1433 aA	20,8383 aA	16,8800 cB
T2	27,0260 cA	0 bD	6,2013 bC	18,4526 cB
T3	30,6893 bA	0 bD	5,5915 bC	21,1153 bB
T4	66,2133 aA	0 bD	6,4666 bC	29,1836 aB

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, ou maiúscula na linha, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knot, a 5% de significância

Ainda com base nos dados da tabela 3, observa-se que, com o passar do tempo, ou seja, durante os subcultivos, os teores de fenóis totais decresceram em relação ao período de indução para os tratamentos 2, 3 e 4. Isso ocorre, segundo Yazaki, Yoshida e Okuda (1991), devido à degradação dos compostos fenólicos durante a formação de calos, propiciando novas divisões celulares e a inibição da oxidação dos calos. Já para o tratamento 1, o teor de taninos não diferiu estatisticamente do período de indução para o último subcultivo, apresentando maior teor nos subcultivos 1 e 2.

A partir desses resultados, infere-se que estudos ainda são necessários para otimizar um protocolo de produção de fenóis totais *in vitro*, sendo este um processo difícil devido à escassez de trabalhos nesta área e com a espécie alvo deste estudo. De qualquer maneira, trata-se de um investimento útil, visto que a produção de compostos secundários *in vitro* apresenta como vantagens uma facilidade maior de purificação dos extratos, pelo fato de a quantidade de pigmentos ser insignificante, reduzindo, com isso, os custos de produção (BALANDRIN; KLOCKE, 1988), o estado de desenvolvimento das células encontra-se relativamente uniforme e o material é totalmente asséptico (CROTEAU; KUTCHAN; LEWUS, 2000). Além disso, segundo Fumagali et al. (2008), a produção de grandes quantidades de metabólitos secundários pela cultura de células de plantas pode ocorrer dentro de um período de cultivo de

duas semanas, comparado, por exemplo, a uma planta anual ou perianual, que necessita de um período de tempo maior para que haja acúmulo de metabólitos secundários.

4 CONCLUSÕES

O teor de vitamina C verificado nas folhas de *Passiflora gibertii*, bem como nos calos obtidos de segmentos foliares, foi considerado elevado, quando comparado com os teores encontrados nas polpas dos frutos de outras espécies de maracujazeiro, sugerindo alta probabilidade de o fruto do maracujazeiro da espécie *Passiflora gibertii* também apresentar um elevado teor de vitamina C.

A espécie *Passiflora gibertii*, apesar de ter apresentado teores de taninos, não se destacou em relação à produção desse metabólito secundário, fato que mostra a necessidade de ajustar um protocolo para esta espécie, de modo a favorecer a biossíntese desse composto.

A espécie em questão mostrou potencial para a produção de compostos bioativos de interesse para a indústria farmacêutica, porém, são necessários novos estudos que visem à otimização desse potencial.

REFERÊNCIAS

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 232-240, 2007.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 15. ed. Washington, 1990.

AZEVEDO, M. A. M. Análise da valoração dos impactos ambientais e da demanda de fitoterápicos oriundos do maracujá no Brasil. **Revista FAE**, Curitiba, v. 11, n. 1, p. 19-32, jan./jun. 2008.

BALANDRIN, T.; KLOCKE, J. Medicinal, aromatic, and industrial materials from plant. In: BAJAV, Y. P. S. (Ed.). **Medicinal and aromatic plant 1**. Berlin: Springer Verlag, 1988. p. 3-33. (Biotechnology in Agriculture and Forestry, 4).

BARBOSA, L. S. **Resistência de passiflora spp a xanthomonas campestris pv. passiflorae e detecção do patógeno em sementes**. 1995. 66 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1995.

BRISKIN, D. Medicinal plant and phytomedicines. linking plant biochemistry and physiology to human health. **Plant Physiology**, Washington, v. 124, n. 2, p. 507-514, Oct. 2000.

CARVALHO, V. L. et al. Influência de diferentes níveis de produção sobre a evolução da ferrugem do cafeeiro e sobre teores foliares de compostos fenólicos. **Ciências Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 1, p. 49-54, jan./fev. 2001.

CASTRO, A. H. F. et al. Calogênese e teores de fenóis e taninos totais em barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 2, p. 385-390, mar./abr. 2009.

COHEN, K. O. et al. Determinação das características físico-químicas e compostos funcionais de espécies de maracujá doce. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SAVANAS TROPICAIS, 2., 2008, Brasília. **Anais...** Brasília: CPAC, 2008. 1 CD-ROM.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural products (Secondary Metabolites). In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Ed.). **Biochemistry & molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. p. 1250-1318.

DESHPANDE, S. S.; CHERYAN, M.; SALUNKE, D. K. Tannin analysis of food products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Cleveland, v. 24, n. 4, p. 401-449, Apr. 1986.

ESTRADA-ZÚÑIGA, M. E. et al. Phenylpropanoid production in callus and cell suspension cultures of *Buddleja cordata* Kunth. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 97, n. 1, p. 39-47, Apr. 2009.

FERREIRA, D. F. **SISVAR (Sistema para análise de variância para dados balanceados)**. Lavras, UFLA, p. 79, 1992.

FIGUEIREDO, M. A. et al. Indução *in vitro* de calos em duas espécies de maracujazeiro nativo. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 288-290, jul. 2007. Suplemento.

FIORUCCI, A. R.; SOARES, M. H. F. B.; CAVALHEIRO, E. T. G. A importância da vitamina C na sociedade através dos tempos. **Química Nova na Escola**, São Paulo, n. 17, maio 2003. Disponível em: <<http://qnesc.sbg.org.br/online/qnesc17/a02.pdf>>. Acesso em: 30 maio 2010.

FUMAGALI, E. et al. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacologia**, João Pessoa, v. 18, n. 4, out./dez. 2008.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Org.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 3. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2001. p. 13-26.

KILKUSKIE, R. E. et al. HIV and reverse transcriptase inhibition by tannins. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, New York, v. 2, n. 12, p. 1529-1534, Dec. 1992.

KURODA, N. **Avaliação do comportamento quanto a resistência de espécies e progênies de maracujazeiro a *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae***. Jaboticabal: FCAV-UNESP, 1981. 45 p.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 1993. p. 782.

MANZANO, N. T. Tomate de farmácia. **Agroanalysis**: revista de agronegócios, Rio de Janeiro, v. 21, n. 10, p. 36-38, out. 2001.

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

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. L. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 5, p. 892-896, set./out. 2005.

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

NAMIKI, M. Antioxidants/antimutagens in food. **Critical Reviews in Food Nutritional**, Boca Raton, v. 29, n. 4, p. 273-300, 1990.

NOGUEIRA, R. C. et al. Curva de crescimento e análises bioquímicas de calos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 10, n. 1, p. 44-48, Jan. 2008.

NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM ALIMENTAÇÃO. **Tabela brasileira de composição de alimentos**. Campinas, 2004. 42 p.

OLIVEIRA, J. C. de. Melhoramento genético. In: RUGGIERO, C. (Ed.). **Cultura do maracujazeiro**. Ribeirão Preto: L. Summa, 1987. p. 218-246.

PANSERA, M. R. et al. Análise de taninos totais em plantas aromáticas e medicinais cultivadas no nordeste do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 13, n. 1, p. 17-22, jan./jun. 2003.

PIMENTEL, C. V. M. B.; FRANCKI, V. M.; GOLLÜCKE, A. P. B. **Alimentos funcionais: introdução às principais substâncias bioativas em alimentos**. Ed. Varela. São Paulo, p. 95, 2005.

ROMARATHNAM, N. et al. The contribution of plant food antioxidants to humans health. **Trends in Food Science and Technology**, v. 6, n. 3, p. 75-82, 1995.

SANTOS, A. S. A dehidrorotenoid produced by callus tissue culture and wild plant roots of *Boerhaavia coccinea*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 17, n. 4, p. 538-541, out./dez. 2007.

SANTOS, M. D.; BLATT, C. T. T. Teor de flavonóides e fenóis totais em folhas de *Pyrostegia venusta* Miers. de mata e de cerrado. **Revista brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 21, n. 2, 1998.

SILVA, A. P. et al. Fitorreguladores na conservação pós-colheita de maracujá doce (*Passiflora alata* dryander) armazenado sob refrigeração. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 23, n. 3, p. 643-649, jul./set. 1999.

SILVESTRINI, A. Effect of alkaloid precursor feeding on a *Camptotheca acuminata* cell line. **Plant Physiology & Biochemistry**, New Delhi, v. 40, n. 9, p. 749-753, Sept. 2002.

SIMÃO, A. M. **Aditivos para alimentos sob o aspecto toxicológico**. São Paulo: Nobel, 1985. 274 p.

STROHECKER, R.; HENNING, H. M. **Analisis de vitaminas: métodos comprobados**. Madrid: Paz Montalvo, 1967. 428p.

YAZAKI, K.; YOSHIDA, T.; OKUDA, T. Tannin production in cell suspension cultures of *Geranium thunbergii*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 30, n. 2, p. 501-503, Feb. 1991.

YILDIRIM, A.; MAVI, A.; KARA, A. A. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Chicago, v. 49, n. 8, p. 4083-4089, Aug. 2001.

ZHENG, W.; WANG, S. Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **J. Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Chicago, v. 49, n. 10, p. 5165-5170, Oct. 2001.

CAPÍTULO 4

Viabilidade e caracterização celular de calos de *Passiflora gibertii* N. E. Brown por CTT e FDA

RESUMO

Considerando o potencial que apresenta para a produção de compostos bioativos de interesse para a indústria farmacêutica e as características superiores em relação aos demais maracujazeiros quanto a resistência a doenças e pragas, o cultivo *in vitro* da espécie silvestre *Passiflora gibertii* configura-se como uma alternativa para a preservação das características superiores, bem como para a produção de compostos bioativos em suspensões celulares. Dessa forma, os testes de viabilidade, realizados ainda no estágio de calos, a partir do fornecimento do máximo ponto de viabilidade das células, permitem saber o momento ideal para iniciar uma suspensão celular ou para fazer o subcultivo do material e ainda para obter embriões somáticos. Neste contexto, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a viabilidade celular de calos de *Passiflora gibertii* obtidos de segmentos foliares por meio dos corantes diacetato de fluoresceína (FDA) e cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (CTT). O meio de cultura utilizado para a indução dos calos foi o MS, com metade das concentrações dos sais, 3% de sacarose, 0,6% de ágar, pH 5,8 e suplementado com concentrações de 0,207 e 0,828 μM de Cinetina, combinadas com concentrações de 4,14 e 8,28 μM de Picloram, respectivamente. Os calos foram mantidos no escuro e os testes de viabilidade, que se iniciaram após o primeiro subcultivo de 60 dias, foram realizados em intervalos de 7 dias, durante dois meses. As células coradas com o FDA foram visualizadas em microscopia de fluorescência e realizada a contagem celular, de acordo com o formato isodiamétrico, alongado e indeterminado, para a obtenção da porcentagem de células viáveis. Já o teste com CTT consistiu na extração do composto colorido formazan, o qual foi quantificado em espectrofotômetro ($\lambda = 490\text{nm}$). No teste com CTT, para o tratamento 1 (4,14 μM de PIC + 0,207 μM de CIN), após 49 dias do primeiro subcultivo, foi observada a maior viabilidade. O tratamento 2 (8,28 μM de PIC + 0,828 μM de CIN) apresentou 51% de viabilidade máxima após 42 dias do primeiro subcultivo. Em ambos os tratamentos, as menores viabilidades foram observadas nas duas últimas análises. Para o teste de viabilidade com FDA, o tratamento 1 apresentou porcentagem máxima de células isodiamétricas igual a 60% e o tratamento 2 apresentou viabilidade máxima de 46%.

Palavras-chave: Viabilidade celular. Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio. Diacetato de fluoresceína. Suspensão celular. *Passiflora gibertii*.

ABSTRACT

Considering the potential it presents to the production of bioactive compounds of interest to the pharmaceutical industry and the superior characteristics compared to others passion fruits for resistance to diseases and pests, the *in vitro* cultivation of wild species *Passiflora gibertii* configures itself as an alternative to the preservation of the superior characteristics, as well as for the production of bioactive compounds in suspension cultures. Thus, cellular viability tests performed yet at the stage of callus, provide important information for the ideal time to start a cellular suspension and obtain somatic embryos. Given the above, the present study aimed to determine the cell viability of *Passiflora gibertii* callus obtained from leaf segments using the dyes fluorescein diacetate (FDA) and 2,3,5-triphenyltetrazolium (TTC). The culture media used for callus induction was MS with half strength of salts, 3% sucrose, 0.6% agar, pH 5.8 and supplemented with concentrations of 0.207 and 0.828 μM of Kinetin combined with concentrations of 4.14 and 8.28 μM of Picloram, respectively. Callus were kept in the dark and viability tests, which began after the first subculture of 60 days, were performed every 7 days for two months. The cells stained with FDA were visualized in fluorescence microscopy and cell counts performed according to the isodiametric shape, elongated, indeterminate, to obtain the percentage of viable cells. Already the TTC test consisted in the extraction of colored compound formazan, which was quantified by spectrophotometer ($\lambda = 490\text{nm}$). In the test with TTC, for treatment 1 (4.14 μM PIC + 0.207 μM of KIN), 49 days after the first subculture, the higher viability was observed. Treatment 2 (8.28 μM PIC + 0.828 μM of KIN) had 51% of maximum viability 42 days after the first subculture. In both treatments, the lowest survivals were observed in the last two tests. To test for viability with FDA, the first treatment showed a maximum percentage of isodiametric cells equal to 60%, and treatment 2 had a maximum viability of 46%.

Keywords: Cell viability. 2,3,5-triphenyltetrazolium. Fluorescein diacetate. Cell suspension. *Passiflora gibertii*.

1 INTRODUÇÃO

A espécie silvestre de maracujazeiro *Passiflora gibertii* apresenta importantes características, como longevidade, maior adaptação a condições climáticas adversas, período de florescimento ampliado e maior concentração de componentes químicos de interesse para a indústria farmacêutica (FIGUEIREDO et al., 2007). Por conta disso, tem sido utilizada em programas de melhoramento genético, por meio da criação de híbridos pelo processo de transformação genética e fusão de protoplastos, e como porta-enxertos para as variedades comerciais.

Considerando o potencial que apresenta para a produção de compostos bioativos de interesse para a indústria farmacêutica e as características superiores em relação aos demais maracujazeiros, o cultivo *in vitro* da espécie silvestre *Passiflora gibertii* configura-se como uma alternativa para a preservação das características superiores, visto que, pelo fato de serem plantas de fecundação cruzada, pode haver perda de identidade genética, ampliando a variabilidade, bem como para a produção de compostos bioativos em suspensões celulares. Dessa forma, os testes de viabilidade, realizados ainda no estágio de calos, a partir do fornecimento do máximo ponto de viabilidade das células, permitem saber o momento ideal para iniciar uma suspensão celular ou para fazer o subcultivo do material e ainda para obter embriões somáticos.

Os métodos utilizados para avaliar a viabilidade celular podem ser classificados em dois tipos, os quais, segundo Widholm (1972), descrevem como aqueles que coram apenas células mortas e aqueles que apenas coram células vivas, visto que a coloração é um produto da atividade metabólica celular. O diacetato de fluoresceína (FDA) e o cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (CTT) são exemplos utilizados para analisar a viabilidade celular por meio da coloração das células vivas.

O FDA resulta em uma coloração verde fluorescente, a qual pode ser detectada por um microscópio de fluorescência. Esta coloração é produto da atividade de uma esterase presente nas células; o FDA não fluorescente, por ser uma molécula não polar, pode entrar na célula, na qual será hidrolisado pela ação catalítica da esterase. O produto dessa hidrólise é um composto fluorescente e polar denominado fluoresceína. A formação desse composto, resultando na fluorescência verde das células, quando observadas no microscópio de fluorescência, indica a integridade das membranas celulares e a funcionalidade das enzimas intracelulares (ZAMALEEVA et al., 2009).

Em relação ao cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (CTT), este foi inicialmente utilizado para avaliar a viabilidade de sementes e os danos causados às plantas pelo congelamento (STEPONKUS; LANPHEAR, 1967). Segundo Mikula, Niedzielski e Rybcznski (2006), Stein e Gerarde (1950) e Towill e Mazur (1975), foram os primeiros a descrever a utilização do CTT na cultura de tecidos vegetais. A análise da viabilidade celular pelo teste com CTT consiste na redução deste sal incolor, resultando no composto de coloração vermelha denominado trifetilformazan (ou simplesmente, formazan). A redução do CTT resultando no composto vermelho trifetilformazan ocorre devido à atividade das enzimas desidrogenases que catalisam as reações respiratórias nas mitocôndrias (VERLEYSSEN et al., 2004). Assim, o CTT presente na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial será reduzido, indicando a presença da atividade respiratória nas mitocôndrias e, conseqüentemente, evidenciando a viabilidade celular.

Para Silva e Yuffá (2006), na cultura de tecidos é importante possuir um método efetivo e barato para determinar, de forma clara e concisa, a presença de células viáveis ou não viáveis. Porém, muitas das metodologias existentes de viabilidade celular estão estabelecidas para animais, sendo os trabalhos com plantas ainda escassos. Apesar disso, percebe-se crescente utilização do CTT e

FDA, principalmente nos trabalhos de criopreservação, como ferramentas para avaliarem o sucesso dessa técnica.

Alguns autores (ISHIKAWA; ROBERTSON; GUSTA, 1995; STEPONKUS, 1971; WHITERS, 1985) estabeleceram o uso do FDA para avaliar a viabilidade de protoplastos e pequenos fragmentos de calos ou agregados de suspensão com não mais que 30 a 100 células. Já o CTT foi estabelecido para analisar a viabilidade de grandes agregados. No entanto, no presente trabalho, ambos os testes de viabilidade foram utilizados de forma complementar, garantindo um resultado rápido e preciso.

A análise da viabilidade celular, ainda no estágio de calos por meio desses testes, possibilita uma escolha mais acertada do momento da transferência do material vegetal do meio de cultivo sólido para o meio líquido, quando se deseja iniciar uma suspensão celular e também possibilita classificar as células de acordo com seu formato, sendo, neste caso, útil para a obtenção de embriões somáticos, além de fornecer o melhor período para realizar o subcultivo do material.

Considerando a vantagem da suspensão celular para a produção de compostos secundários e a obtenção de embriões somáticos, além do exposto sobre os testes de viabilidade utilizando FDA e CTT, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de determinar a viabilidade celular de calos de *Passiflora gibertii* obtidos de segmentos foliares por meio dos corantes FDA e CTT para que, a partir das informações obtidas sobre esses testes, seja possível, em trabalhos futuros, escolher os melhores períodos para iniciar uma suspensão celular e conseguir sucesso na obtenção de embriões somáticos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas (LCTP), Setor de Fisiologia Vegetal, no Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG.

2.1 Material vegetal

Explantes foliares foram obtidos a partir de plântulas germinadas *in vitro* de maracujazeiro nativo *Passiflora gibertii* N. E. Brown, da coleção de germoplasma do Instituto Agronômico de Campinas (IAC).

2.2 Indução de calos

As folhas foram excisadas em segmentos de, aproximadamente, 1 cm². Em seguida, na superfície abaxial da folha, realizaram-se pequenos cortes, os quais ficaram em contato com 10 mL do meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), contendo metade das concentrações de seus sais. O meio de cultura foi suplementado com sacarose (3%) e com concentrações de 0,207 e 0,828 µM de Cinetina, combinadas com concentrações de 4,14 e 8,28 µM de Picloram, respectivamente. Estas concentrações foram aquelas que resultaram em elevados teores de vitamina C e fenóis totais nos calos obtidos de segmentos foliares, respectivamente. O pH do meio foi ajustado para 5,8±0,1 e o meio solidificado com ágar (0,6%), antes da autoclavagem, a 120°C, durante 20 minutos. Após a inoculação de um explante foliar em cada tudo de ensaio, estes foram mantidos em sala de crescimento, no escuro, à temperatura de 25±2°C, durante 60 dias.

2.3 Análise da viabilidade celular por tetrazólio

A determinação da viabilidade celular foi realizada a partir do primeiro subcultivo, sessenta dias após a inoculação do explante, em intervalos de sete dias, durante dois meses.

As amostras utilizadas no teste analítico foram obtidas de quatro tubos de ensaios, que foram selecionados de forma aleatória. Os calos foram homogeneizados e separados em 5 amostras de 50 mg cada, as quais foram colocadas em tubos de ensaio para a condução dos procedimentos seguintes.

A um dos cinco tubos de ensaio foram adicionados 2 mL de água, levando à chama até atingir o ponto de ebulição da água para a promoção da morte celular por calor. Após este processo, a água foi retirada e a cada amostra de 50 mg de cada um dos cinco tubos de ensaio foi homogeneizado com 1,5 mL do reagente de tetrazólio 0,6% (p/v) preparado em solução-tampão fosfato pH 7,4. Em seguida, a mistura foi incubada por 24 horas, na ausência de luz, a $27\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Após o período de incubação das amostras, foram adicionados 3,5 mL de etanol 95% (v/v) a cada um dos tubos de ensaio, os quais permaneceram em banho-maria, a 100°C , por um período de quatro minutos, para a extração do composto colorido Formazan. Os tubos foram centrifugados duas vezes, a 6.000 rpm, durante 20 minutos, para a decantação dos restos celulares. Com o sobrenadante realizaram-se leituras espectrofotométricas, a 490 nm, em um modelo Cintra 10 GBC. A viabilidade celular foi expressa em porcentagem de células viáveis, considerando a obtenção da maior absorbância como 100% de viabilidade. Cada dado porcentual corresponde a cinco leituras de absorbância.

2.4 Caracterização das células pelo método da contagem celular utilizando FDA

A tipificação celular pelo método de contagem celular utilizando FDA iniciou-se no primeiro subcultivo, sessenta dias após a inoculação do explante, ocorrendo em intervalos de sete dias, por um período de dois meses.

Uma amostra de 1 g de calo foi homogeneizada em 10 mL de solução de manitol 0,6M e CaCl_2 0,03M, pH 5,8 (FILANOVA et al., 2000), durante 30 minutos, a 70rpm, em temperatura de $27\pm 2^\circ\text{C}$, na ausência de luz.

Em seguida, a amostra foi filtrada em uma peneira de 100 μm e, da suspensão celular resultante, retirou-se uma alíquota de 980 μL , que foi colocada em um eppendorf[®]. Na ausência de luz, foram adicionados 20 μL de uma solução com 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de FDA, resultando em 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de concentração final de FDA. Após cinco minutos, foram feitas preparações citológicas e realizadas as contagens de células em microscopia de fluorescência, Olympus BX 60, com filtro WIBA.

Foi realizada a contagem de 1.000 células, 200 células por lâmina, para cada dia de análise e totalizada a porcentagem de células isodiamétricas, alongadas e indeterminadas, sendo estas assim denominadas por não apresentarem nem forma isodiamétrica e nem forma alongada.

2.5 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 2 (concentração do meio de cultivo e época de análise). Os resultados foram submetidos à análise de variância, utilizando o programa estatístico Sisvar[®] (FERREIRA, 1992), sendo as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de significância.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A leitura em espectrofotômetro do composto Formazan (Figura 1) extraído das células vivas dos calos de *Passiflora gibertii* permitiu a obtenção da porcentagem da viabilidade celular, considerando a leitura de maior absorbância (0,39675) como viabilidade máxima (100%).



Figura 1 Extração do composto Formazan das células vivas dos calos de *Passiflora gibertii*, para leitura em espectrofotômetro ($\lambda = 490\text{nm}$) e quantificação da viabilidade celular

Constatou-se que a viabilidade diferiu significativamente entre os tratamentos e, durante os dias de coleta, em um mesmo tratamento (Tabela 1).

Tabela 1 Média geral da porcentagem de células vivas dos calos de *Passiflora gibertii* obtida por meio do teste de viabilidade com o cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (CTT) (T1: 4,14 μ M de PIC + 0,207 μ M de CIN, T2: 8,28 μ M de PIC + 0,828 μ M de CIN)

Análises (dias)	Porcentagem de células viáveis	
	Tratamento 1	Tratamento 2
0	42% aC*	36% aB
7	37% aC	14% bD
14	33% aC	20% bC
21	24% aD	19% aC
28	60% aB	24% bC
35	15% aD	10% aD
42	20% bD	51% aA
49	100% aA	14% bD
56	9% aE	9% aD
63	4% aE	6% aD

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha ou maiúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knot, a 5% de significância

O tratamento 1, o qual continha 4,14 μ M de Picloram e 0,207 μ M de Cinetina, apresentou viabilidade máxima na oitava análise, a qual corresponde a 49 dias após o primeiro subcultivo. Já para o tratamento 2 (8,28 μ M de PIC + 0,828 μ M de CIN), o máximo obtido de viabilidade (51%) foi alcançado na sétima análise (42 dias após o primeiro subcultivo). No geral, a viabilidade celular dos calos de *P. gibertii* apresentou-se maior no tratamento 1, sendo as porcentagens de células vivas no tratamento 2 significativamente inferiores para a maioria das análises, quando comparadas com as porcentagens do tratamento 1, o que se pode inferir sobre uma possível influência da concentração do

regulador de crescimento na viabilidade dessas células. As menores porcentagens foram observadas nas duas últimas análises, que correspondem a 56 e à 63 dias após o primeiro subcultivo. Nessas análises, foi obtido um percentual de viabilidade igual a 9% e a 4% para o tratamento 1, e de 9% e 6% para o tratamento 2, respectivamente (Tabela 1). Esses resultados já eram esperados, visto que a relação com o tempo de cultivo e a concentração de reguladores de crescimento e demais compostos no meio de cultura é inversamente proporcional, de tal forma que, com o passar do tempo, tais compostos e reguladores de crescimento apresentam-se em menores concentrações, comparados com as concentrações iniciais, resultando em uma menor viabilidade celular, devido à escassez de nutrientes disponíveis para as células.

Uma intensa oscilação na viabilidade das células dos calos de *Passiflora gibertii* foi observada, apresentando-se ora maior, ora menor. Isto é passível de ocorrência quando se trabalha com materiais que não apresentam homogeneidade ou ainda quando não se tem a determinação concisa da curva de crescimento do calo.

Para realizar uma análise dessa oscilação, deve-se considerar que o teste com CTT mostra a atividade respiratória, conseqüentemente possibilitando uma inferência sobre a viabilidade celular. Logo, a alta viabilidade apresentada na primeira análise de ambos os tratamentos pode sugerir uma alta taxa respiratória das células por conta de elas estarem em um processo de morte celular programada, a qual depende de grandes quantidades de energia. Isto é considerável pelo fato de se tratar da primeira análise, a qual corresponde a 60 dias após o período de indução dos calos, fazendo referência à fase de desaceleração de uma curva de crescimento de 60 dias. Nas análises seguintes, percebe-se um decréscimo da porcentagem de viabilidade, a qual pode indicar a fase lag da curva de crescimento, na qual as células se preparam para a divisão

celular, adquirindo competência para tal evento (SANTOS et al., 2003). Esse período de menor viabilidade celular observado no tratamento 1 ocorre até a quinta análise (28 dias após o primeiro subcultivo), a partir da qual, é constatado um aumento na porcentagem da viabilidade.

Já para o tratamento 2, o período de menor viabilidade se estende até a sexta análise (35 dias após o primeiro subcultivo), tendo sido constatado um aumento da porcentagem de viabilidade na sétima análise (42 dias após o primeiro subcultivo). Esse aumento observado na porcentagem da viabilidade para os tratamentos pode ser referente ao período de máxima divisão celular, que corresponde à fase exponencial da curva de crescimento (SANTOS et al., 2003). Considerando a curva padrão de crescimento de calos, a fase seguinte a da exponencial é denominada de linear, caracterizada pela redução das divisões celulares e pelo crescimento celular, sendo esperada uma taxa menor de respiração, resultando em uma queda no percentual de viabilidade conforme se constatou nos tratamentos 1 e 2, após o pico de viabilidade observado na quinta análise para o tratamento 1 e na sétima análise para o tratamento 2. Em seguida, para o tratamento 1, observa-se novamente um aumento da viabilidade (oitava análise), seguida de uma queda, evidenciando a possível conclusão da curva de crescimento, representada pela fase estacionária e de desaceleração. Novamente, este aumento da viabilidade pode ser explicado pelo aumento da taxa respiratória, devido à morte celular programada. Já no tratamento 2, não foi possível visualizar o último pico de viabilidade, provavelmente por conta da maior concentração dos reguladores, que pode ter influenciado na curva de crescimento dos calos, prolongando-a.

Não foram encontrados trabalhos dessa natureza nas espécies da família Passifloraceae. Apesar disso, a utilização do teste com CTT tem sido empregada em vários trabalhos, como de criopreservação, o qual serve de importante ferramenta que objetiva a verificação da viabilidade nas culturas celulares que

foram criopreservadas. Considerando os testes de viabilidade celular como ferramentas para a avaliação dos trabalhos de criopreservação, o teste com CTT possibilitou, para Mikula, Niedzielski e Rybcznski (2006), a verificação da viabilidade de células embriogênicas criopreservadas de diversas espécies vegetais do gênero *Gentiana*. Para Sadia et al. (2003), o teste com o CTT possibilitou a análise de suspensões celulares criopreservadas de *Solanum tuberosum* e, para Wang et al. (2001), a verificação da viabilidade de suspensões de células embriogênicas criopreservadas da espécie de videira *Vitis vinifera* L.

Além dos trabalhos de criopreservação, o emprego do teste com CTT visando à análise da viabilidade celular também tem sido utilizado em trabalhos que realizam a submissão de cultura de células vegetais a diferentes tipos de estresse. Referente a isso, Lutts, Almansouri e Kinet (2004) realizaram o teste de viabilidade com o CTT nos calos de trigo para avaliar o efeito do estresse salino e hídrico sobre as células desses calos e Bachiri et al. (2000) quantificaram a viabilidade de células em suspensão, após a submissão destas a um estresse osmótico para serem criopreservadas. Além dessas utilidades, no presente trabalho, o teste com o corante CTT para a análise da viabilidade celular de calos de *Passiflora gibertii* possibilitou, por meio da maior porcentagem de viabilidade, saber o período mais adequado para iniciar uma suspensão celular com sucesso, bem como o melhor período para realizar o subcultivo.

Embora os resultados obtidos da análise da viabilidade celular com CTT sejam suficientes para iniciar uma suspensão celular com sucesso, isto não basta quando se almeja a obtenção de embriões somáticos. Para isso, complementando a análise da viabilidade celular pelo teste com CTT, é interessante realizar a caracterização e a contagem de células. Tais dados serão válidos para quantificar as células isodiamétricas presentes nos calos, dada a importância dessas células para a obtenção de embriões somáticos, já que, na maioria das vezes, os calos embriogênicos são constituídos por células meristemáticas, as quais apresentam

formato isodiamétrico (GEORGE; HALL; KLERK, 2008), além de as dimensões celulares serem relativamente pequenas e com citoplasma denso (APPEZZATO-DA-GLÓRIA; CARMELLO-GUERREIRO, 2003).

Os dados da Tabela 2 mostram a porcentagem de células isodiamétricas coradas com FDA nos tratamentos 1 e 2.

Tabela 2 Média da porcentagem de células isodiamétricas de calos de *Passiflora gibertii* obtida por meio do teste de viabilidade com o FDA. A) Tratamento 1: 4,14 μM de PIC + 0,207 μM de CIN. B) Tratamento 2: 8,28 μM de PIC + 0,828 μM de CIN

Análises (dias)	Porcentagem de células isodiamétricas	
	Tratamento 1	Tratamento 2
0	52,10% aB*	17,20% bD
7	33,20% aC	10,60% bD
14	35,40% aC	24,10% bC
21	47,60% aB	13,40% bD
28	47,20% aB	33,45% bB
35	37,90% aC	12,40% bD
42	59,10% aA	22,90% bC
49	46,60% aB	46,10% aA
56	30,30% bC	40,70% aA
63	60,20% aA	15,20% bD

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha ou maiúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knot, a 5% de significância

Houve diferença significativa do número de células isodiamétricas entre os tratamentos e entre os diferentes dias de coleta em um mesmo tratamento. Observou-se que a maior porcentagem (60%) de células isodiamétricas para o

tratamento 1 foi obtida na última análise. Esta última análise corresponde, para uma curva de crescimento de 60 dias, à fase estacionária e de desaceleração, sendo constatada a baixa viabilidade das células quando analisadas com o CTT durante esta fase. Nesse sentido, cabe, aqui, uma explicação relacionando a viabilidade com o CTT e com o FDA, direcionando para o fato de que, na fase final da possível curva de crescimento de 60 dias dos calos de *Passiflora gibertii*, a porcentagem de viabilidade detectada com o CTT é baixa, devido à morte celular programada que ocorre nas células que já se encontram em um estágio de diferenciação mais avançado, ou seja, aquelas que apresentam formato alongado.

Assim, fica claro que a maior porcentagem de células isodiamétricas para o tratamento 1 foi observada na última análise, visto que o aumento das células isodiamétricas ocorreu por conta de uma diminuição (morte) das células alongadas, já que a porcentagem de células isodiamétricas é resultante da proporção de células alongadas.

Para o tratamento 2, a maior porcentagem de células viáveis (isodiamétricas) foi de 46% no período de 49 dias após o primeiro subcultivo, que corresponde à oitava análise, tendo, para o teste com o CTT, para este mesmo período, a viabilidade sido de 14%. Isso pode ser explicado considerando o fato de esse período, possivelmente, corresponder à fase linear da curva de crescimento que resulta em uma menor taxa respiratória pela diminuição das divisões celulares. A indicação de uma proporção maior de células isodiamétricas em relação às alongadas, neste caso, não pode ser justificada pela morte celular programada destas últimas, mas, sim, pela divisão de células que ocorre na fase anterior (exponencial), resultando, realmente, em um aumento no número de células isodiamétricas.

É notório que a viabilidade celular é totalmente dependente do comportamento da curva de crescimento do calo, podendo também sofrer

interferências da concentração dos reguladores de crescimento no meio de cultura, bem como da homogeneidade do material coletado para análise, fatos que justificam as oscilações apresentadas na viabilidade celular dos calos de *Passiflora gibertii*.

As células alongadas são evidenciadas em microscopia de luz, porém, não mais visíveis na microscopia de fluorescência (Figura 1), na qual se observa apenas alguns pontos de fluorescência verde, visto que o FDA cora apenas células vivas. Isto corrobora para que se possa inferir que a diminuição da proporção de células alongadas, resulta em uma maior porcentagem de células isodiamétricas, como o ocorrido no tratamento 1, ao observar a maior porcentagem de células isodiamétricas na última análise (Tabela 2).

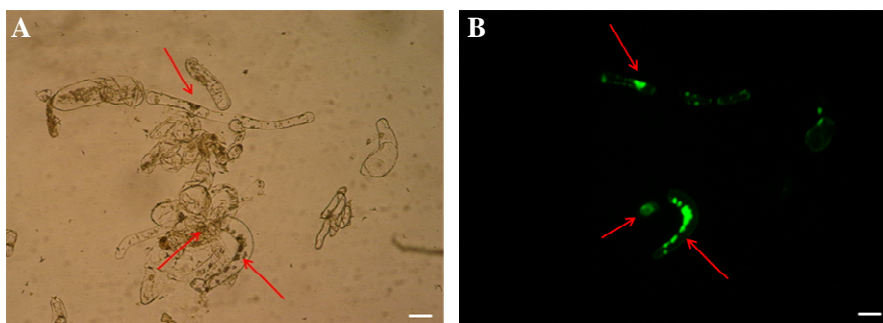


Figura 1 Visualização de morte celular de calos de *Passiflora gibertii*, pelo teste de viabilidade com FDA. A) Células alongadas visualizadas em microscopia de luz e B) visualização de fluorescência verde em microscopia de fluorescência, emitida pelas células (As setas que indicam as células na figura A, correspondem às mesmas indicações de imagens realizadas com as setas da figura B). Barra=100 μ m

Além de células isodiamétricas e células alongadas, aglomerados celulares também foram encontrados nos calos de *Passiflora gibertii* (Figura 2). As células alongadas, mesmo coradas com FDA mostrando sua viabilidade, foram consideradas inviáveis para o desenvolvimento de células embriogênicas,

visto que estas se assemelham às células meristemáticas que têm formato isodiamétrico. Já a presença de aglomerados celulares, ou nódulos, é um bom indicativo para a obtenção de embriões somáticos, visto que McCain, Kamo e Rodge (1988) obtiveram embriões somáticos de milho a partir de nódulos constituídos de duas a oito células. Estes mesmos pesquisadores observaram, por meio de estudos histológicos, que as células com características embriogênicas presentes nos calos também se encontravam distribuídas em aglomerados de três a oito células. Em cenoura, também foi evidenciado o comparecimento de células embriogênicas em aglomerados constituídos de três a dez células (NOMURA; KOMAMINE, 1985).

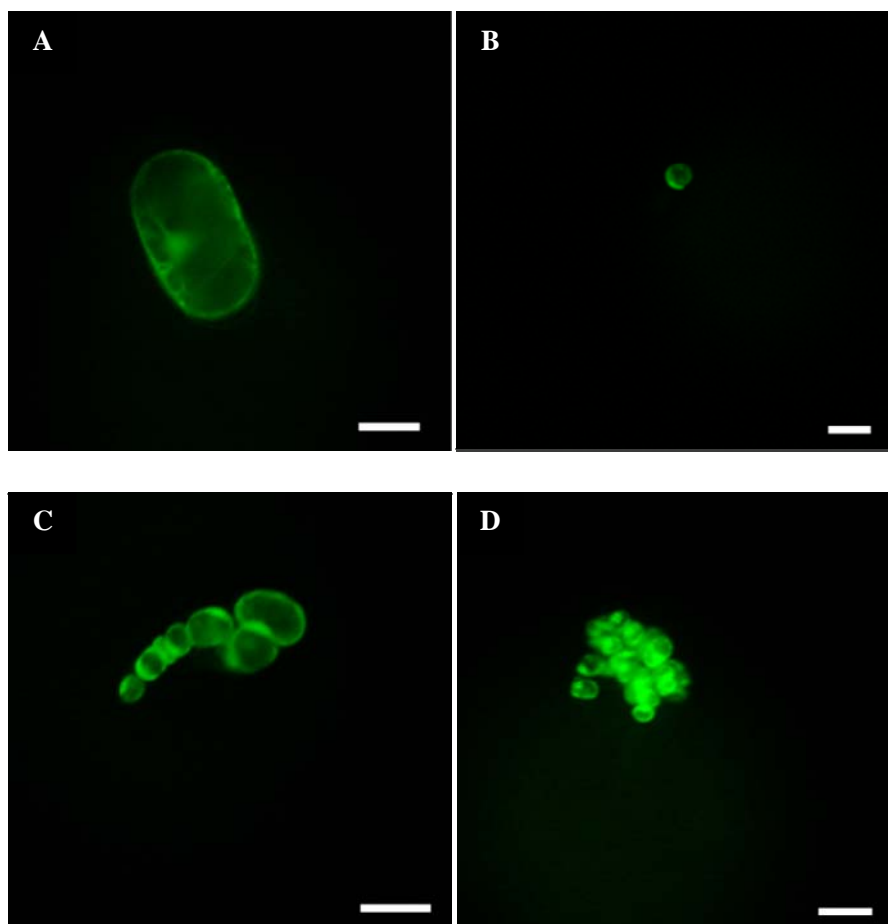


Figura 2 Células de calos de *Passiflora gibertii* coradas com FDA em microscopia de fluorescência. A) Célula alongada; B) célula isodiamétrica; C) aglomerado constituído por 7 células e C) aglomerado constituído por mais de 10 células. Barra=100 μ m

Ambos os testes utilizados neste trabalho, para verificar a viabilidade celular, são de grande utilidade, por serem práticos e possibilitarem reposta rápida. Dessa forma, em trabalhos que objetivam iniciar uma suspensão celular e obter embriões somáticos, a utilização dos testes com CTT e FDA é recomendada como ferramenta auxiliar para o sucesso no estabelecimento desses experimentos.

4 CONCLUSÕES

A maior porcentagem de viabilidade para o teste com o cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio foi observada no tratamento 1 (4,14 μM de PIC + 0,207 μM de CIN), após 49 dias do primeiro subcultivo.

O tratamento 2 (8,28 μM de PIC + 0,828 μM de CIN), quanto ao teste de viabilidade com o cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio, apresentou viabilidade máxima de 51% conseguida após 42 dias do primeiro subcultivo.

Para o teste de viabilidade com FDA, o tratamento 1 apresentou porcentagem máxima de células isodiamétricas igual a 60%.

O tratamento 2, quanto ao teste com FDA, apresentou porcentagem máxima de células isodiamétricas de apenas 46%.

REFERÊNCIAS

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia vegetal**. Viçosa, MG: UFV, 2003. 438 p.

BACHIRI, Y. et al. Effect of osmotic stress on tolerance of air-drying and cryopreservation of *Arabidopsis thaliana* suspension cells. **Protoplasma**, New York, v. 214, n. 3/4, p. 227-243, Sept. 2000.

BENSON, E. E. Cryopreservation. In: DIXON, R. A.; GONZALES, R. A. (Ed.). **Plant cell culture: a practical approach**. 2. ed. Oxford: IRL, 1994. p. 147-167.

FERREIRA, D. F. **SISVAR (Sistema para análise de variância para dados balanceados)**. Lavras, UFLA, p. 79, 1992.

FIGUEIREDO, M. A. et al. Indução in vitro de calos de duas espécies de maracujazeiro nativo. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 288-290, jul. 2007. Suplemento.

FILANOVA, L. H. et al. Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryos in the gymnosperm, *Norway spruce*. **Journal of Cell Science**, London, v. 113, n. 24, p. 4399-4411, Dec. 2000.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**. 3.ed. Dordrecht: The Background, v.1, 2008.

ISHIKAWA, M.; ROBERTSON, A. J.; GUSTA, L. V. Comparison of viability tests for assessing cross-adaptation to freezing, heat and salt stresses induced by abscisic acid in bromegrass (*Bromus inermis* Leyss) suspension cultured cells. **Plant Science**, Amsterdam, v. 107, n. 1, p. 83-93, May 1995.

LUTTS, S.; ALMANSOURI, M.; KINET, J. M. Salinity and water stress have contrasting effects on the relationship between growth and cell viability during and after stress exposure in durum wheat callus. **Plant Science**, Amsterdam, v. 167, n. 1, p. 9-18, July 2004.

MCCAIN, J. W.; KAMO, K. K.; RODGE, T. K. Characterization of somatic embryo development and plant regeneration from friable maize callus culture. **Botanical Gazette**, Chicago, v. 149, n. 1, p. 16-20, Jan. 1988.

MIKULA, A.; NIEDZIELSKI, M.; RYBCZNSKI, J. J. The use of TTC reduction assay for assessment of *Gentiana* spp. cell suspension viability after cryopreservation. **Acta Physiologiae Plantarum**, Berlin, v. 28, n. 4, p. 315-324, Aug. 2006.

NOMURA, K.; KOMAMINE, A. Identification and isolation of single cells that produce somatic embryos at a high frequency in a carrot suspension culture. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 79, n. 4, p. 988-991, Dec. 1985.

SADIA, B. et al. Culture treatments for enhancing post-thaw recovery of cryopreserved suspension cells of potato cv. *Desiree*. **Cellular & Molecular Biology Letters**, Wroclaw, v. 8, n. 1, p. 979-989, 2003.

SANTOS, C. G. et al. Indução e análise bioquímica de calos obtidos de segmentos foliares de *Coffea arabica* L., cultivar *rubi*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 3, p. 571-577, jul./set. 2003.

SILVA, R. F.; YUFFÁ, A. M. da. Viability in protoplasts and cell suspensions of *Coffea arabica* cv. Catimor. **Electronic Journal of Biotechnology**, Santiago, v. 9, n. 5, p. 593-597, Oct. 2006.

STEIN, R. J.; GERARDE, H. W. Triphenyltetrazolium chloride in tissue culture. **Science**, Limerick, v. 111, n. 2895, p. 691, June 1950.

STEPONKUS, P. L. Cold acclimation of plant tissue cultures. **Cryobiology**, San Diego, v. 8, n. 4, p. 386-387, Aug. 1971.

STEPONKUS, P. L.; LANPHEAR, F. O. Refinement of the triphenyl tetrazolium chloride method of determining cold injury. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 42, n. 10, p. 1423-1426, Oct. 1967.

TOWILL, L. E.; MAZUR, P. Studies on the reduction of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a viability assay for plant tissue cultures. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 53, n. 11, 1097-1102, 1975.

VERLEYSSEN, H. et al. Evaluation of analytical techniques to predict viability after cryopreservation. **Plan Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 77, n. 1, p. 11-21, Apr. 2004.

WANG, Q. et al. Cryopreservation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) embryogenic cell suspensions by encapsulation-dehydration and subsequent plant regeneration. **Plant Science**, Amsterdam, v. 162, n. 4, p. 551-558, Apr. 2002.

WHITERS, L. A. Cryopreservation of cultured plant cells and protoplasts. In: VASIL, I. K. Cell culture and somatic cell genetics of plants: cell growth, nutrition, cytodifferentiation, and cryopreservation. Orlando: Academic, 1985. v. 2, p. 253-316.

WIDHOLM, J. M. The use fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. **Stain Technology**, Baltimore, v. 47, n. 4, p. 89-94, July 1972.

ZAMALEEVA, A. I. et al. Polyelectrolyte-Mediated Assembly of Multiwalled Carbon Nanotubes on Living Yeast Cells. **Langmuir**: the ACS journal of surfaces and colloids, Washington, v. 26, n. 4, p. 2671-2679, Feb. 2010.