

Uso de adsorventes de compostos fenólicos e diferentes explantes na produção de massa celular

¹Francis Dalponte*; ¹Rita de Cássia S. C. Valle & ¹José Alexandre B. Valle

1. Departamento de Engenharia Química, Centro Ciências Tecnológicas, Universidade Regional de Blumenau – FURB, Rua São Paulo – 3250, Itoupava Seca, Blumenau, CEP 89030-080. (*)fran_mima@yahoo.com.br

Neste trabalho avaliaram-se as condições de cultivo para a produção de embriões somáticos de pimenta longa. Para a formação de massa celular (calo) em meio sólido foram realizados experimentos onde se variou o meio de cultivo, acrescentou-se 1g/L de carvão ativado e 1g/L de polivinil pirrolidona a fim de adsorver os compostos fenólicos e diminuir a oxidação dos explantes foliares. Ambos foram introduzidos no meio MS (Murashige & Skoog, 1962) adicionado de reguladores de crescimento (5,0 mg/L de ácido 2,4 diclorofenoxiacético e 10,0 mg/L de 6-benzilaminopurina), 8 g/L de ágar e 30 g/L de sacarose. O meio contendo carvão ativado não foi satisfatório, pois oxidou as folhas e ocorreu baixa formação de massa; o meio acrescido de polivinil pirrolidona demonstrou melhor formação de calo, porém este não foi friável e oxidou menos quando comparado ao meio comum. Avaliou-se também a influência da idade e tipo de explantes foliares, tendo-se cotilédones, folhas juvenis e adultas inoculadas no meio de cultura MS acima citado. Os melhores resultados para indução de calos foram obtidos utilizando explantes adultos; nas folhas juvenis e cotilédones ocorreu baixa formação de massa, sendo que a maioria dos explantes foliares oxidou e necrosou. Em todos os ensaios realizados não foi possível obter o calo friável que é essencial quando se deseja realizar estudos em meio submerso para a formação de safrol.

Palavras-Chave: pimenta longa, meio de cultura, massa celular, antioxidantes.

1. Introdução

A espécie *Piper hispidinervum*, popularmente conhecida como pimenta-longa, é uma planta arbustiva aromática cujo óleo essencial extraído de suas folhas e talos são ricos em safrol, com demanda crescente por parte da indústria química devido à obtenção de heliotropina e butóxido de piperonila (PBO), ingredientes essenciais à produção de fragrâncias e inseticidas biodegradáveis^[1].

O ciclo de vida médio apresentado pela pimenta longa favorece o estudo de cultivo *in vitro* desta planta com vistas à produção do safrol. Os processos biotecnológicos, utilizando técnicas *in vitro* rigorosamente controladas para o cultivo de células, tecidos e órgãos vegetais ou de plantas íntegras para a produção de compostos de interesse à sociedade, têm sido considerados como sistemas de alto potencial para a superação de muitos problemas encontrados na produção a campo da planta, como sazonalidade, variação ambiental, localização geográfica, ataque de pragas e instabilidade política^[2].

A cultura de células e tecidos de plantas é fundamental para muitos aspectos da biotecnologia de plantas. Quando um tecido cultivado *in vitro* passa por injúrias físicas ou químicas oferece como resposta o calo. Calo é um grupo ou massa de células com crescimento desordenado, as quais podem apresentar certo grau de diferenciação^[3]. Um grande número de aplicações das funções vegetais depende da habilidade de células e de tecidos vegetais crescerem em soluções nutrientes de composição conhecida e sob determinadas condições de cultivo^[4].

Diversas características inerentes aos explantes interferem na calogênese, como seu tamanho, a composição do meio de cultura, os reguladores de crescimento e a idade da planta mãe. A frequência de sobrevivência e a velocidade de desenvolvimento dos calos estão diretamente relacionadas com seu tamanho inicial^[3].

Em qualquer técnica de cultura de tecidos é indispensável o uso de reguladores de crescimento. Estes são substâncias orgânicas, que apresentam como função básica a sua ação sobre o

crescimento e em alguns tipos de organogênese. Os principais grupos são as auxinas e citocininas^[5]. As citocininas são os hormônios que controlam a divisão celular e que juntamente com as auxinas controlam, também, a diferenciação celular^[6].

O bom crescimento das células é dependente também de vários outros fatores. A liberação de compostos que promovem o escurecimento do meio, provavelmente fenólicos, compromete o desenvolvimento dos explantes diminuindo a taxa de regeneração^[7].

O carvão ativado apresenta cargas residuais, as quais são capazes de adsorver substâncias fenólicas ou seus produtos da oxidação, as quinonas. O uso de carvão ativado, contudo, pode adsorver outras substâncias do meio nutritivo como, por ex., os reguladores de crescimento, acarretando efeitos indesejáveis ao cultivo^[8].

Outro composto que pode ser usado para controlar o escurecimento é o polivinil pirrolidona (PVP), uma poliamida utilizada em cromatografia de separação de ácidos aromáticos, aldeídos e fenóis pela sua função adsorvente. Os fenóis são adsorvidos pelo PVP por meio de ligações de hidrogênio, o que previne a oxidação e polimerização, além de adsorver os produtos da oxidação fenólica, ou seja, as quinonas^[8].

Este trabalho, portanto, teve como objetivo avaliar a influência da adição de carvão ativado e polivinil pirrolidona e o tipo de explante utilizado para a produção de calos em meio sólido.

2. Material e Métodos

Os ensaios foram realizados no laboratório de Engenharia Bioquímica do Departamento de Engenharia Química da FURB. O processo de obtenção de microplantas e de formação de calo se deu em estante de crescimento a 26°C com intensidade luminosa de 3500 Lux e períodos de 16 horas de luz e 8 horas de escuro.

Germinação das sementes

As sementes oriundas da Estação Experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Santa Catarina previamente desidratadas sofreram rehidratação e foram submetidas à assepsia para a germinação *in vitro*.

A germinação iniciou-se com a inoculação das sementes em placas de petri contendo meio MS^[9] descrito na Tabela 1, 8 g/L de ágar e 30g/L de sacarose, com pH ajustado a 5,8 antes da esterilização. Essa etapa representa um tempo aproximado de 60 dias e a Figura 1 apresenta o

desenvolvimento da germinação. Levando em consideração o grande número de contaminações, repetiu-se esta etapa a cada 30 dias com o intuito de suprir a demanda de explantes foliares utilizados nas etapas subseqüentes.

Alongamento da planta

As plantas foram transferidas para tubos de ensaios contendo meio líquido MS e 30g/L de sacarose, com pH ajustado a 5,8 antes da esterilização. As microplantas ficaram dispostas sobre pontes de papel filtro. Essa etapa representa um tempo aproximado de 30 dias e é ilustrada na Figura 2. A cada semana foi repetido este procedimento para suprir a demanda de explantes foliares utilizados nas etapas subseqüentes.

Tabela 1 - Composição mássica e molar do meio MS (Murashige & Skoog, 1962) utilizado nos experimentos.

Constituinte	Concentração no meio de cultura (mg/L)	Molaridade no meio de cultura
Macro nutrientes		
NH ₄ NO ₃	1650	2,06 x 10 ⁻²
KNO ₃	1900	1,88 x 10 ⁻²
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	3,00 x 10 ⁻³
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	1,50 x 10 ⁻³
KH ₂ PO ₄	170	1,25 x 10 ⁻³
Elementos traço		
KI	0,83	5,00 x 10 ⁻⁶
H ₃ BO ₃	6,2	1,00 x 10 ⁻⁴
MnSO ₄ .4H ₂ O	8,6	9,99 x 10 ⁻⁵
Na ₂ MoO ₄ .5H ₂ O	0,25	2,00 x 10 ⁻⁵
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	1,00 x 10 ⁻⁷
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	1,00 x 10 ⁻⁷
Fonte de Ferro		
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8	1,00 x 10 ⁻⁴
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,3	1,00 x 10 ⁻⁴
Suplementos orgânicos		
Mio-inositol	100	4,90 x 10 ⁻⁴
Ácido nicotínico	0,5	4,66 x 10 ⁻⁶
Piridoxina - HCL	0,5	2,40 x 10 ⁻⁶
Tiamina	0,1	3,00 x 10 ⁻⁷
Glicina	2	3,00 x 10 ⁻⁵
Fonte de Carbono		
Sacarose	30.000	8,80 x 10 ⁻²

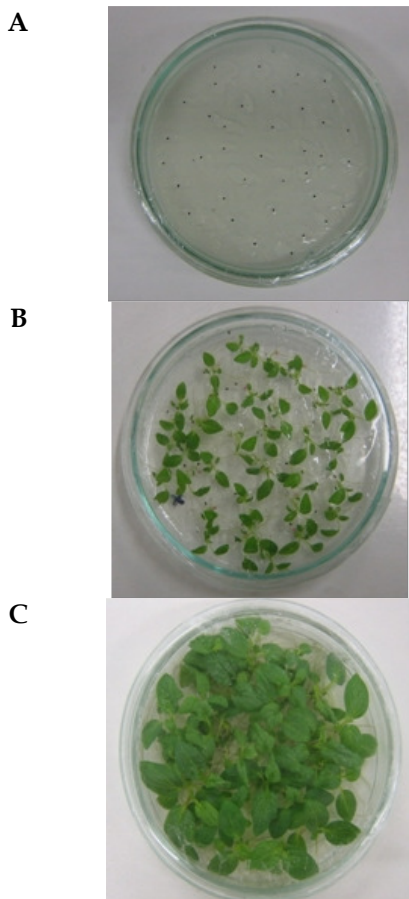


Figura 1 - Da esquerda para a direita: (A) Sementes após inoculação, (B) plantas 30 dias após inoculação; (C) plantas 60 dias após inoculação.

Indução de calo

Explantes foliares coletados das plantas obtidas na etapa anterior foram utilizados para indução de calos (massa celular), transferindo-os para vidros de conservas contendo meio MS adicionado de reguladores de crescimento (5,0 mg/L de ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4 D) e 10,0 mg/L de 6-benzilaminopurina (BAP)), 8 g/L de ágar e 30 g/L de sacarose, com pH ajustado a 5,8 antes da esterilização. Essa etapa representa um tempo aproximado de 40 dias e a Figura 3 ilustra esse processo. Vale ressaltar que nem todas as folhas utilizadas para a indução de calos formam massa celular, sendo assim, este procedimento foi repetido a cada semana.

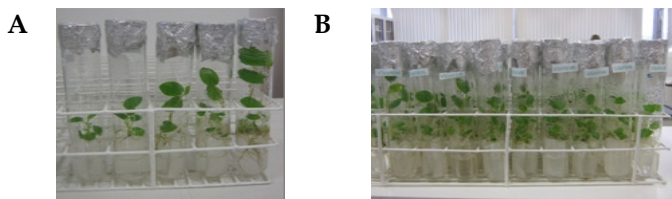


Figura 2 - Processo de alongamento da planta em detalhes.

Multiplicação celular em meio líquido

A massa celular formada foi conduzida para frascos Erlenmeyers (Figura 4A) contendo 50 mL de meio líquido de multiplicação celular: meio MS adicionado de reguladores de crescimento (5,0 mg/L de ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4 D) e 10,0 mg/L de 6-benzilaminopurina (BAP)) e 30g/L de sacarose, com pH ajustado a 5,8 antes da esterilização e agitação de 100 rpm em agitador orbital (Figura 4B). A cada 30 dias a massa celular sofreu repique para um meio fresco.

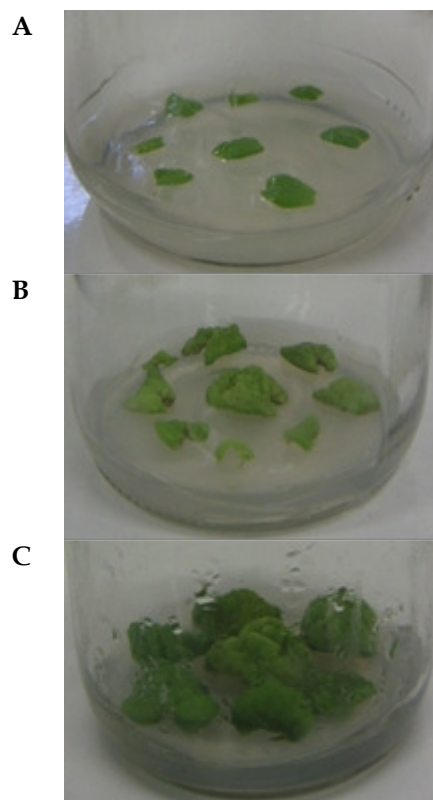


Figura 3 - (A) Explantes foliares após inoculação; (B) explantes foliares após 20 dias; (C) explantes foliares após 40 dias.

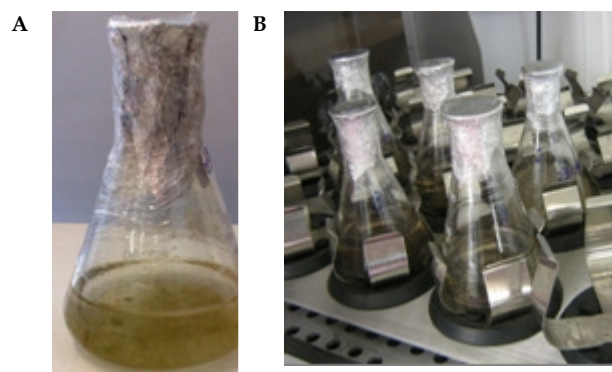


Figura 4 - Frascos Erlenmeyer contendo meio com a massa celular formada em destaque.

Influência da idade e do tipo da planta mãe

Na etapa de indução de calo variou-se a idade dos explantes foliares utilizados. Foram realizados três ensaios, o primeiro inoculou-se cotilédones com aproximadamente 20 dias (Figura 5A), o segundo inoculou-se folhas juvenis com aproximadamente 60 dias (Figura 5B) e no terceiro ensaio inoculou-se explantes adultos com aproximadamente 90 dias (Figura 5C).

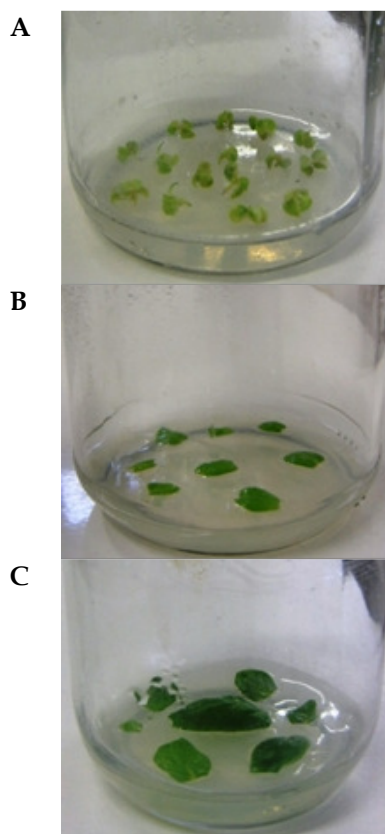


Figura 5 - (A)Meio contendo cotilédones (B) meio contendo folhas juvenis; (C) meio contendo folhas adultas.

Variação do meio de cultivo

Este procedimento foi realizado com o objetivo de adsorver os compostos fenólicos e diminuir a oxidação dos explantes foliares, com isso, aumentando as chances de formação de calos friáveis.

As etapas de germinação da semente e alongamento da planta mantiveram-se iguais, na etapa de indução de calo foram realizados dois tipos de meios diferentes, acrescentou-se 1g/L de carvão ativado (Figura 6A) e 1g/L de polivinil pirrolidona (Figura 6B) no meio utilizado inicialmente: meio MS adicionado de reguladores de crescimento (5,0 mg/L de ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4 D) e 10,0 mg/L de 6-benzilaminopurina (BAP)), 8 g/L de ágar e 30 g/L

de sacarose, com pH ajustado a 5,8 antes da esterilização.

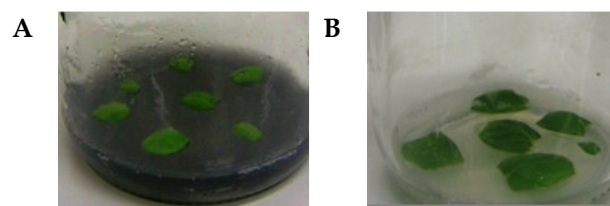


Figura 6 - Meio MS adicionado de carvão ativado (A); meio MS adicionado de polivinil pirrolidona.

3. Resultados e Discussão

Indução de calo

A massa celular obtida no presente trabalho não foi favorável para o estudo proposto. Calo friável, ou seja, aquele que se desmancha facilmente pelo fato de as células estarem separadas não foi obtido, os calos se apresentaram rígidos e com crescimento expressivo.

Vale ressaltar que os procedimentos foram seguidos de acordo com Valle^[2], porém não obtendo os mesmos resultados. Provavelmente, o fato das sementes serem de safra diferente e planta-mãe diferente influenciou este resultado. Um dos fatores de extrema importância são a origem e manipulação das sementes, pois se a colheita da mesma tiver sido feita em época indevida pode influenciar no processo^[10].

Multiplicação celular em meio líquido

Poucos calos se apresentaram friáveis, dentre os quais foram submetidos ao meio líquido. Todavia a multiplicação celular com o uso do calo rígido não obteve resultado satisfatório, pois as células multiplicaram em pequenas quantidades e necrosaram. Provavelmente as células não suportaram o estresse do subcultivo para o meio líquido. Valle^[2] sugere que haja um processo de adaptação no meio líquido por meio de pré-cultivo, reduzindo assim, a fase lag do crescimento celular.

Influência da idade e do tipo da planta mãe

Obtiveram-se resultados insatisfatórios ao se trabalhar com cotilédones na indução de calos, observou-se que houve crescimento devido ao uso de reguladores de crescimento, porém não ocorreu a formação de massa celular, após um tempo aproximado de 30 dias, os cotilédones apresentaram uma coloração marrom e indicando necrose (Figura 7A).

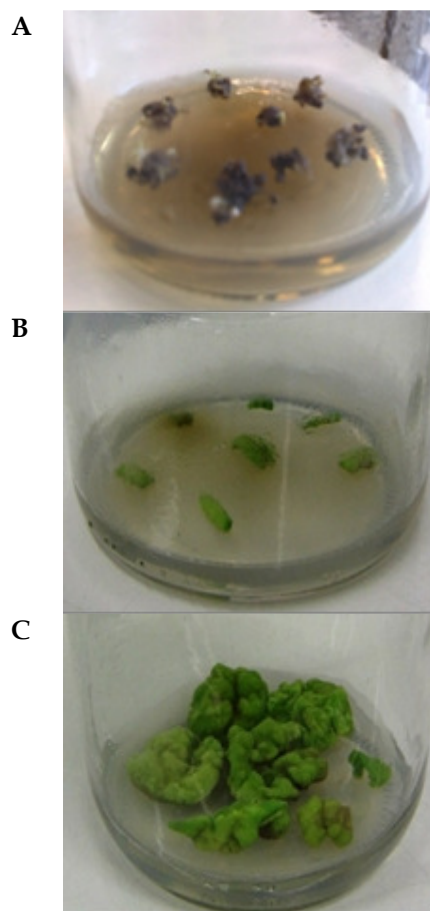


Figura 7 - (A) Meio com 30 dias contendo cotilédones; (B) meio com 30 dias contendo folhas juvenis; (C) meio com 30 dias contendo folhas adultas.

Em relação aos explantes foliares juvenis observou-se que estes tiveram dificuldade em se regenerar, em apenas 20% dos ensaios ocorreu à formação de calos rígidos e a de calos friáveis não ocorreram, sendo que muitos explantes oxidaram (Figura 7B).

O ensaio feito com os explantes foliares adultos demonstrou-se satisfatório, pois diminuiu a oxidação, as folhas tiveram maior facilidade de multiplicação quando comparadas as juvenis e em 35% dos ensaios ocorreu à formação de calos rígidos (Figura 7C), sendo que não houve ocorrência de calos friáveis.

Segundo Teixeira^[8] a oxidação fenólica depende igualmente do tipo de explante utilizado. Explantes juvenis provenientes de sementes e partes juvenis de plantas adultas são os preferidos, embora tecidos maduros de folhas e flores sejam igualmente utilizados. Observa-se então, que bons resultados também podem ser alcançados utilizando explantes foliares juvenis, porém neste caso, obteve-se melhor rendimento utilizando explantes foliares adultos como mostra a Figura 8.

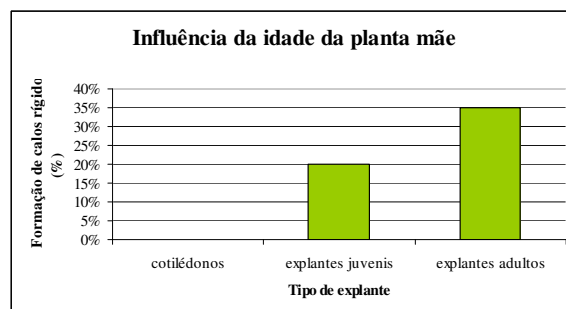


Figura 8 - Porcentagem de calos rígidos obtidos em relação à idade da planta mãe.

Varição do meio de cultivo

Após analisar a influência do carvão ativado no meio de cultivo constatou-se que este demonstrou resultados insatisfatórios, pois além de oxidar o explante, não ajudou no seu desenvolvimento fazendo com que a mesma apresentasse necrose (Figura 9A) e em apenas 5% dos casos ocorreu à formação de massa celular.

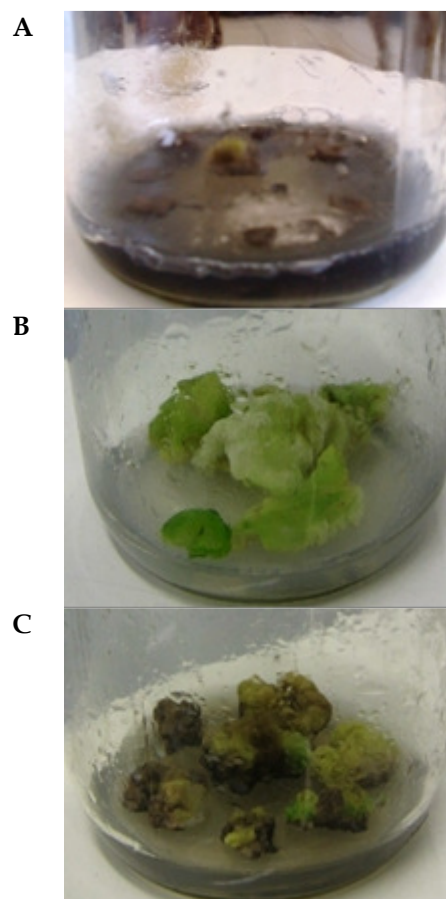


Figura 9 - (A) Meio contendo carvão ativado (B) meio contendo polivinil pirrolidona; (C) meio inicialmente utilizado.

O carvão ativado tem diversas funções, como adsorção de compostos fenólicos^[8],

provavelmente, ele além de adsorver as substâncias indesejáveis adsorveu também as substâncias desejáveis como, por exemplo, os reguladores de crescimento e alguns componentes do meio, fazendo com que não houvesse a multiplicação celular.

Em relação ao uso de polivinil pirrolidona (PVP) no meio, houve uma redução da oxidação dos explantes e aumentou o número de formação de massa celular (Figura 9B), em 40% dos ensaios obtiveram-se calos rígidos. O PVP provavelmente contribuiu para este resultado satisfatório por possuir efeito antioxidante, pois este é adicionado para evitar a oxidação de polifenóis, o que concorda com Pasqual^[12], que trabalhando com a cultivar Rubi, verificaram que o PVP diminuiu a oxidação e aumentou a formação de calos.

O meio utilizado inicialmente (sem a adição de carvão ativado ou polivinil pirrolidona) demonstrou formação de calos em 25 % dos ensaios, sendo que a maioria dos explantes sofreram oxidação e apresentaram coloração marrom como mostra a Figura 9C.

A Figura 10 apresenta a formação de calos relacionada ao meio de cultura utilizado, pode-se observar que a influência do PVP no meio de cultivo apresentou resultados satisfatórios.

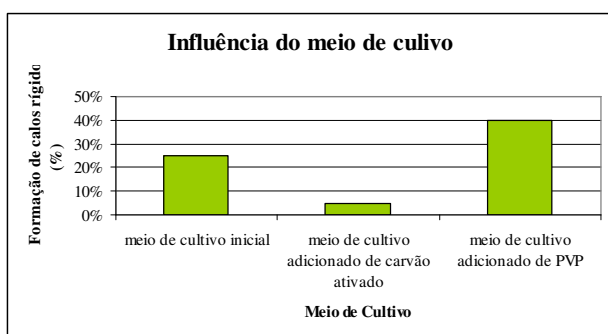


Figura 10 - Porcentagem de calos rígidos obtidos em relação à composição do meio de cultivo.

4. Conclusões

O meio de cultura utilizado neste trabalho obteve melhor resultado quando adicionado de 1g/L de polivinil pirrolidona na sua composição e inoculado com explantes de folhas adultas com aproximadamente 90 dias.

Não se conseguiu obter calo friável nas tentativas de indução de calo, sabe-se que este é indispensável quando se deseja realizar estudos em meio submerso para a formação de safrol.

Este tema é pouco estudado atualmente, mas é de grande importância que pesquisas científicas sejam realizadas para que possibilitem avanços ao

melhoramento vegetal dessa espécie e ainda favoreçam a síntese de safrol in vitro.

5. Agradecimentos:

Ao PIPE/Art.170 e à FURB pelo fomento da pesquisa.

6. Referências

- GUEDES, R.S.; COSTA, F.H.S.; PEREIRA, J.E.S. Características físicas e nutricionais da matriz de encapsulamento na produção de sementes sintéticas de *Piper hispidinervum* C. DC. Revista árvore, Soc. Invest. Flor., Viçosa, v. 31, n. 006, p. 1005-1011, 2007.
- VALLE, R. C. S. C. Estratégias de cultivo de células vegetais de pimenta longa (*Piper hispidinervium*) e determinação de parâmetros cinéticos. 184p. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.
- ROSAL, L. F. Germinação, indução de calos, micropropagação e anatomia foliar da candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) Mac Leish). 106p. Dissertação (Mestrado em fitotecnia). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.
- VALLE, R. C. S. C.; OCHNER, G.; DEBIASI, C.; TAVARES, L.B.B.; JUNIOR, A.F. Determinação da Curva de Crescimento de Células de Pimenta Longa (*Piper hispidinervium*) em Sistema Submerso. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.
- MARQUES, S. V.; MARQUES, R. V.; FIGUEIRA, E. R.; JACINTO, A. C. B.; LONDE, L. N.; SECUNDINO, R. R.; LUZ, J. M. Q. Efeito dos reguladores de crescimento 2,4D, TDZ, cinetina e BAP na indução e regeneração de calos em anteras de cafeeiro *Coffea arábica*. Bioscience Journal, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, v. 24, n. 3, 2008.
- FRÁGUAS, C. B.; PASQUAL, M.; PEREIRA, A. R. Multiplicação in vitro de *Ficus carica* L.: Efeito da cinetina e do ácido giberélico. Ciênc. agrotec., Lavras, v. 28, n. 1, p. 49-55, 2004.
- GIATTI, L.; LIMA, G. P. P. Ação do BAP na regeneração in vitro de *Blc Owen Holmes Ponkan x Brassavola digbiana* n° 2. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, São Paulo, 2006.
- TEIXEIRA, J.B. Limitações do processo in vitro de espécies lenhosas. Disponível em: <<http://www.redbio.org/portal>>. Acesso em: 15 nov. 2008.
- MURASHIGE, T.; SKOOG. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum*. v.15, p.473-479, 1962.
- CAVALCANTE, M.J.B. BERGO, C.L. SÁ, C, P. PIMENTEL, F.A. MENDONÇA, H.A. SOUSA, J.A. WADT, L.H.O. THOMAZINI, M.J. Cultivo da Pimenta Longa (*Piper hispidinervium*) na Amazônia Ocidental. Comunicado Técnico, 154. Rio Branco, Embrapa Acre, 5 p., 2002.
- MOURA, E. F.; MENEZES, I.C.; LEMOS, O. F. Concentrações de citocinina e carvão ativado na micropropagação de pimenta-do-reino. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 38, n. 1, p. 72-76, 2008.
- PASQUAL, M.; MACIEL, A.L. de R.; CAMPOS, K.P. de; SANTOS, E.C.; CAMPOS, R.J.C. Indução de calos em anteras de café (*Coffea arabica*) cultivadas in vitro. *Ciênc. agrotec.*, Lavras, v.26, n.1, p.71-76, 2002.