

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós- Graduação em Fisiologia Vegetal



DISSERTAÇÃO

**PRODUÇÃO DE BETACIANINA, CRESCIMENTO E POTENCIAL BIOATIVO DE
PLANTAS DO GÊNERO *ALTERNANTHERA***

Alícia Moraes Kleinowski

Pelotas, fevereiro de 2011

ALITCIA MORAES KLEINOWSKI

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Pelotas como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do conhecimento: Fisiologia Vegetal).

Orientadora: Eugenia Jacira Bolacel Braga

Co-orientadores: José Antonio Peters

Marcos Antonio Bacarin

Pelotas, fevereiro de 2011

Dados de catalogação na fonte:

Ubirajara Buddin Cruz - CRB 10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

K64p

Kleinowski, Alitcia Moraes

Produção de betacianina, crescimento e potencial bioativo de plantas do gênero *Alternanthera* / Alitcia Moraes Kleinowski. – 71f. : il. color. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas. Instituto de Biologia. Pelotas, 2011. – Orientador Eugenia Jacira Bolacel Braga ; co-orientador José Antonio Peters.

1.*Alternanthera philoxeroides*. 2.Tirosina. 3.*Alternanthera tenella*. 4.Elicitores. 5.Cultura de tecidos. 6.Organismos bioindicadores. 7.Alelopatia. I.Braga, Eugenia Jacira Bolacel. II.Peters, José Antonio. III.Título.

CDD: 616.96

Banca Examinadora:

Dr^a. Eugenia Jacira Bolacel Braga

Dr. Luciano do Amarante

Dr^a. Beatriz Helena Gomes Rocha

“Pouco conhecimento faz que as criaturas se sintam orgulhosas,
Muito conhecimento, que se sintam humildes.”
Leonardo da Vinci

Dedico

Ao Meu Pai
A minha Fiel Amiga

AGRADECIMENTOS

Agradeço, acima de tudo, a Deus, que me deu saúde, inteligência e perseverança para concluir mais essa etapa de minha vida.

A toda minha família, especialmente, aos meus pais, Marco Antonio e Rosinha (*in memoriam*), a quem sempre serei grata por ter chegado até aqui;

A minha amada e leal amiga e companheira Giovanna que sempre está ao meu lado dando forças nos momentos difíceis e sempre me motivando a seguir em frente com seu amor e companheirismo.

A minha orientadora, Prof^a Eugenia Jacira Bolacel Braga, por toda sua valiosa contribuição para a execução desse trabalho, por todos seus ensinamentos, paciência, carinho e dedicação. Muito Obrigada por Tudo!

À Prof^a Gládis Aver Ribeiro por ter colaborado para realização de parte desta dissertação em seu Laboratório de Microbiologia.

Aos professores do Curso de Pós Graduação em Fisiologia Vegetal, especialmente ao Prof. Sidnei Deuner pela sua ajuda nas análises espectrofotométricas e ao Prof. José Antonio Peters pelos ensinamentos em cultura de tecidos.

À Prof^a. Beatriz Rocha, obrigada pelos ensinamentos científicos e pessoais, pela paciência, e incentivo;

À Prof^a Maria Regina Lopes pela ajuda no preparo dos extratos, seu incentivo e, principalmente, por despertar meu interesse e senso crítico no estudo de plantas medicinais.

A todas as colegas do curso de Mestrado, pela agradável convivência e especialmente a amiga Janete Adamski, que sempre estava ao meu lado na superação dos desafios impostos na árdua luta pelo crescimento intelectual.

As colegas e amigas do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, Isabel Rodrigues, Márcia Ribeiro, Janiele Perotti, Letícia Benitez, não somente pela ajuda e participação nesse trabalho, mas por todo apoio, incondicional, dedicado a mim desde o meu ingresso no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas.

Aos estagiários do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, especialmente o Anderson Millech Einhardt e Daniel Serpa pela amizade e participação direta neste trabalho.

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado, que possibilitou o desenvolvimento desta pesquisa.

A todos aqueles que de alguma forma colaboraram para a concretização desse trabalho e cujos nomes não foram citados aqui. Nunca me esquecerei de vocês.

RESUMO

KLEINOWSKI, Alícia Moraes. Crescimento, produção de betacianina e potencial bioativo de plantas do gênero *Alternanthera*. 2011. 71f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

As espécies medicinais do gênero *Alternanthera* (Amaranthaceae), como *Alternanthera philoxeroides* e *Alternanthera tenella* apresentam uma variedade de compostos bioativos, entre eles os flavonoides e as betacianinas, pigmentos com propriedades antioxidantes. A micropropagação pode contribuir no estudo de plantas bioativas, pois proporciona condições de crescimento controladas e admitem o uso de precursores exógenos ou elicitores da biossíntese de substâncias de interesse. Outras promissoras ferramentas no estudo das plantas medicinais são os testes para verificação do seu potencial bioativo, utilizando para isso, organismos bioindicadores. Este trabalho teve o objetivo de estudar o crescimento, a produção de betacianinas e o potencial bioativo de plantas do gênero *Alternanthera*. Nos experimentos *in vitro*, segmentos nodais foram inoculados em meio MS com diferentes concentrações de tirosina (0; 25; 50 e 75 μ M). As plantas foram avaliadas quanto ao número de brotos e gemas, altura, comprimento das raízes, massa fresca da parte aérea e das raízes e teor de betacianina. Na espécie *A. philoxeroides* dentre as variáveis de parte aérea analisadas somente a altura, na maior concentração, apresentou um decréscimo significativo. A raiz foi afetada a partir da primeira concentração ocorrendo um decréscimo no comprimento sendo que na concentração de 75 μ M não houve formação desse órgão. A produção de betacianina, em todos os tratamentos, foi maior no caule do que na folha. Para os ensaios de atividade bioativa da espécie *A. philoxeroides*, os extratos foram obtidos por meio da maceração, de folhas e caule secos, com posterior partição líquido-líquido, com solventes de polaridade crescentes (hexano, diclorometano, acetato de etila, butanol). Os testes de germinação foram realizados com as soluções nas concentrações de 0; 1,0; 2,0 e 3,0mg mL⁻¹, com 30 sementes de alface e quatro repetições. A atividade antibacteriana foi avaliada por técnica de difusão de discos onde foi testado a sensibilidade de cinco cepas de referência, com os extratos na concentração de 100mg mL⁻¹. O extrato acetato de etila obtido de folhas na maior concentração influenciou somente na germinabilidade da alface, enquanto o vigor foi afetado significativamente por todos os extratos a partir da concentração de 1,0mg mL⁻¹. Nenhum dos extratos de *A. philoxeroides* na concentração testada interferiu no crescimento das cepas utilizadas. As variáveis de crescimento *in vitro* de *A. tenella* mostraram diminuição nas suas médias com o aumento das concentrações de tirosina sendo que a concentração de 75 μ M foi tóxica. Contudo a produção de betacianina foi beneficiada com a adição de 50 μ M deste composto no meio de cultura. Estes resultados demonstram o efeito positivo da elicitação com tirosina na produção de betacianina, nas duas espécies, porém aplicações em altas concentrações são deletérias para o crescimento das plantas

Palavras-chave: *Alternanthera philoxeroides*, *Alternanthera tenella*, tirosina, elicitores, cultura de tecidos, organismos bioindicadores, alelopatia

ABSTRACT

KLEINOWSKI, Alícia Moraes. Growth, betacyanin production and bioactive potential of plants of the genus *Alternanthera*. 2011. 71f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The medicinal species of the genus *Alternanthera* with *Alternanthera philoxeroides* and *Alternanthera tenella* feature a variety of bioactive compounds, including flavonoids and betacyanins, pigments with antioxidant properties. Micropropagation can contribute to the study of bioactive plants it provides controlled growing conditions and permit the use of exogenous precursors or elicitors of the biosynthesis of substances of interest. Other promising tools in the study of medicinal plants are the tests to verify the bioactive potential of these species, using bioindicators. This work aimed to study the growth, production betacyanins and potential bioactive plant of the genus *Alternanthera*. In vitro experiments, nodal segments were inoculated on MS medium with different concentrations of tyrosine (0, 25, 50 and 75 μM). Plants were evaluated on the number of shoots and buds, height, root length, fresh weight of part shoots and roots and content betacyanin. In the species *A. philoxeroides* among the variables analyzed, only to shoot high, the highest concentration, showed a significant decrease. The root was affected from the first concentration occurring a decrease in the length of which the concentration of 75 μM no formation of this organ. Betacyanin production in all treatments was higher in stem than leaf. For the testing of bioactive species *A. philoxeroides* extracts were obtained by maceration of dried leaves and stems, with subsequent liquid-liquid partition with solvents of increasing polarity (hexane, dichloromethane, ethyl acetate, butanol). Germination tests were performed with solutions of 0; 1,0; 2,0 e 3,0 mg mL^{-1} with 30 seeds of lettuce and four replications. The antibacterial activity was evaluated by disc diffusion technique was tested where the sensitivity of five reference strains, with the extracts at a concentration of 100 mg mL^{-1} . The ethyl acetate extract obtained from leaves at the highest concentration influenced only in the germination of lettuce, while the force was significantly affected by all extracts at concentrations of 1.0 mg mL^{-1} . None of the extracts of *A. philoxeroides* the concentration tested interfered with the growth of the strains used. Variables in vitro growth of *A. tenella* showed a decrease in their average with increasing concentrations of tyrosine and the concentration of 75 μM was toxic. However betacyanin production was enhanced with the addition of 50 μM of the compound in the culture medium. These results demonstrate the positive effect of elicitation with the production of tyrosine betacyanin in both species, but applications in high concentrations are deleterious to plant growth

Key-words: *Alternanthera philoxeroides*, *Alternanthera tenella*, tyrosine, elicitors, organisms bioindicators, allelopathy.

SUMÁRIO

1. Introdução geral	14
2. Revisão de literatura	16
2.1 Plantas medicinais	16
2.2 Estudo com gênero <i>Alternanthera</i>	17
2.3 Betacianina	18
2.4 Culturas de tecidos em plantas medicinais.....	19
2.5 Elicitores	20
2.6 Alelopatia	21
2.7 Atividade antibacteriana	21
3. Referências bibliográficas	23
Artigo 1- Scientia Agrária	28
Resumo	28
Abstract	29
Introdução	30
Material e métodos	31
Material vegetal	31
Tratamentos	32
Delineamento experimental.....	32
Resultados e discussão	33
Conclusão	36
Referências Bibliográficas	36
Lista de Figuras	39
Artigo 2 - Ciência Rural	41
Resumo	41
Abstract	42

Introdução	43
Material e métodos	45
Preparo dos extratos	45
Ensaio de alelopatia	45
Ensaio da atividade antibacteriana	46
Resultados e discussão	47
Conclusão	51
Referências Bibliográficas	51
Lista de figuras	54
Artigo 3 - Ciência Agrônoma.....	58
Resumo.....	58
Abstract.....	59
Introdução.....	60
Material e métodos.....	61
Resultados e discussão.....	62
Conclusão	68
Referências Bibliográficas	68

1 INTRODUÇÃO GERAL

As substâncias ativas presentes nas plantas medicinais são produtos do seu metabolismo e podem ser divididas em dois grupos: metabolitos primários e secundários. Na grande maioria dos casos os compostos gerados pelo metabolismo secundário são biologicamente ativos, muitos dos quais têm servido como modelos para a síntese de um grande número de fármacos, propiciando importantes avanços na terapêutica de várias enfermidades.

Dentre a flora brasileira o gênero *Alternanthera* (Amaranthaceae) merece destaque, pois prospecções fitoquímicas de espécies pertencentes a este gênero têm revelado uma variedade de compostos biologicamente ativos, sendo, portanto, material promissor para a busca de novos fármacos.

Outra característica muito relevante das plantas do gênero *Alternanthera*, sob o ponto de vista farmacológico, é a presença da betacianina, pigmento nitrogenado derivado do aminoácido tirosina, de coloração vermelho-violeta, muito utilizado na indústria alimentícia e com comprovada ação antioxidante (TANAKA; SASAKI; OHMIYA, 2008; VOLP; RENHE; STRINGUETA, 2009).

No entanto, a utilização dessas espécies do gênero *Alternanthera* como *Alternanthera philoxeroides* e *Alternanthera tenella*, para extração e produção comercial deste composto está condicionada a sua baixa produtividade e a instabilidade da produção. Neste contexto, a biotecnologia vegetal através da cultura de células e tecidos vegetais é uma ferramenta muito importante, não somente pela rápida propagação clonal e produção de plantas homogêneas e de elevada qualidade fitossanitária, mas principalmente porque a cultura *in vitro* admite o uso de precursores exógenos ou elicitores que adicionados ao meio de cultivo estimulam a síntese deste pigmento, maximizando sua produção e seu rendimento final.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), as plantas medicinais deveriam ser a melhor fonte para obtenção de uma grande variedade de compostos com potencial farmacológico. Porém, devido à complexidade dos extratos vegetais, o primeiro passo na busca por moléculas com esse potencial é a

realização de *screenings* como o uso de organismos bioindicadores para determinar o potencial farmacológico desses produtos naturais (CUNICO et al., 2006).

A presente dissertação está dividida em três artigos: o primeiro investiga a influência do elicitador tirosina no crescimento de plantas e na produção de betacianina em *Alternanthera philoxeroides*, o segundo avalia o potencial bioativo desta espécie, através de testes de alelopatia e de testes antibacteriano, enquanto o terceiro utiliza a *Alternanthera tenella* como planta modelo para estudar a ação do elicitador tirosina no crescimento e na produção de betacianina através da técnica de cultura de tecidos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Plantas Medicinais

O começo da vida na terra tem como um de seus primeiros protagonistas os vegetais, que facilitaram a existência dos animais e dos homens, devido tanto a grande multiplicidade de espécies como de seus produtos (VIEGAS; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Desde o início, indivíduos pertencentes a distintas tribos ou povos descobriram, quase que de forma paralela, que algumas plantas eram adequadas para alimentação ou possuíam propriedades curativas. Segundo França et al. (2008) estes foram os primeiros passos, por meio dos quais, o homem primitivo adquiriu uma série de conhecimentos sobre aquelas espécies vegetais que eram susceptíveis de serem empregadas para fins terapêuticos.

As espécies que após processos de coleta, estabilização e secagem, íntegra, rasurada, triturada ou pulverizada, e que possuem propriedades terapêuticas, profiláticas ou paliativas em um ou mais órgãos, podendo ser utilizados com fins terapêuticos são definidas como plantas medicinais (ANVISA, 2004; VEIGA; PINTO; MACIEL, 2005).

Esses compostos naturais, também chamados de metabólitos secundários que são produzidos, principalmente, pelos vegetais não possuem uma distribuição universal, geralmente ocorrem em baixas concentrações e seu aparecimento na natureza é determinado por necessidades ecológicas e possibilidades biossintéticas (TAIZ; ZEIGER, 2008).

As plantas medicinais representam uma valiosa fonte de metabólitos secundários, os quais são utilizados principalmente pelas indústrias farmacêuticas e alimentícias (SOUSA et al., 2008). Estima-se que cerca de 25 a 30% dos fármacos empregados, nos países industrializados, foram desenvolvidos direta ou indiretamente, a partir de produtos naturais, especialmente de plantas medicinais (CALIXTO, 2005; VEIGA-JUNIOR; MELLO, 2008).

Uma das diretrizes da Organização Mundial de Saúde é realizar investigações na área de plantas medicinais que permitam um maior conhecimento das mesmas para avaliar seu emprego na medicina tradicional e uma das vias para se alcançar esse objetivo é o desenvolvimento de técnicas de extração e análises dos princípios ativos presentes nestas plantas (MARQUES; PETROVICK, 2001). Outro critério preconizado pela OMS é a necessidade de encontrar novas moléculas com atividades farmacológicas, e com menos efeitos secundários, pois apesar do renovado interesse na busca de alternativas terapêuticas naturais, as quais podem ser desenvolvidas a partir da investigação da natureza, o homem tem feito uso de uma fração muito pequena das plantas com as quais sempre conviveu (VIEGAS; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

2.2 Estudos com o gênero *Alternanthera*

A família Amaranthaceae pertence à classe das Magnoliopsida e a ordem Caryophyllales. Compreende 65 gêneros e aproximadamente 1.000 espécies descritas, originárias de zonas tropicais, subtropicais e temperadas da África, América de Sul e Sudeste Asiático (SIQUEIRA, 1995). O gênero *Alternanthera* Forsk. 1775, situado dentro da tribo *Gomphrineae*, é composto por 80 espécies, sendo que 30 delas podem ser encontradas em território brasileiro.

Dentro deste gênero duas espécies merecem atenção especial pela sua importância medicinal e econômica, a *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb. e a *Alternanthera tenella* Colla.

A. philoxeroides é uma planta medicinal originária da América do Sul conhecida como erva-de-jacaré, herbácea e perene considerada em muitas regiões do mundo como uma vigorosa invasora pela sua capacidade de adaptação a diferentes ecossistemas (GUNASEKERA; BONILA, 2001). Prospecções fitoquímicas desta espécie medicinal revelaram a presença de flavonoides glicosilados e betalaínas (RATTANATHONGKOM et al., 2009; BLUNDEN et al., 1999), compostos que possuem propriedades comprovada de ação antitumoral e antiviral (FANG et al., 2007) e antiinflamatória e imunomodulatória (SALVADOR; DIAS, 2004).

A. tenella conhecida popularmente como apaga-fogo, caracteriza-se por ser de porte herbáceo (5 a 45 cm de altura), de folhas simples e sésseis, opostas, de coloração avermelhada ou verde-clara, de acordo com a variedade (KISSMANN;

GROTH, 1999), sendo encontrada em todo o Brasil, inclusive em lavouras onde é considerada uma planta invasora (SIQUEIRA, 1995).

A sabedoria popular descreve o uso de suas partes aéreas com finalidade curadora contra infecções bacterianas, para estados febris e processos inflamatórios (SALVADOR et al., 2004; SALVADOR; DIAS, 2004; CAI; SUN; CORKE, 2005).

Estudos da composição química dessas plantas indicam a presença de betalainas betacianinas, betaxantinas e cromoalcalóides (BROCHADO et al., 2003; SALVADOR; DIAS, 2004).

2.3 Betacianinas

As betalaínas são pigmentos naturais N-heterocíclicos solúveis em água, que aparentemente substituem as antocianinas nas famílias da ordem Caryophyllales (STRACK; VOGT; SCHLIEMANN, 2003), mas também podem ser encontradas no reino fungi como em *Amanita*, *Hygrocybe* e *Hygrosporus*

A via biossintética destes pigmentos tem origem no seu precursor o aminoácido tirosina que sofre ação da enzima tirosina hidroxilase formando um intermediário a DOPA (4,5 dihidroxifenilalanina), que por sua vez, sofre oxidação transformando-se em ciclo dihidroxifenilalanina que por reações espontâneas, ou ainda desconhecidas, originam a classe das betalaínas (TANAKA; SASAKI; OHMIYA, 2008)

Quimicamente, as betalaínas possuem uma fórmula geral que contém a estrutura do ácido betalâmico acompanhado de um substituinte que podem ser de um simples hidrogênio a um complexo substituinte glicosilado (Figura 1) (CAI; SUN; CORKE, 2005). A variação desses grupos é em função das diferentes fontes de onde podem ser obtidos esses pigmentos e determinam sua tonalidade e estabilidade. Desta forma, as betalaínas podem ser divididas em dois grupos estruturais: as betacianinas (vermelho ao vermelho violeta) e as betaxantinas (amarelo) sendo que as betacianinas podem ser classificadas por sua estrutura química em quatro tipos: betanina, amarantina, gonferina e bougainvilina. Até o momento são descritos aproximadamente 50 tipos de betacianinas (vermelhos) e 20 tipos de betaxantinas (amarelos) (VOLP; RENHE; STRINGUETA, 2009).

A importância bioativa destes pigmentos é estudada por diversos autores tendo sido comprovados os efeitos antivirais e antimicrobianos dos pigmentos betalaínas (STRACK; VOGT; SCHLIEMANN, 2003). Além disso, as suas

propriedades antioxidantes das betalaínas têm sido demonstradas em uma ampla gama de ensaios (KANNER; HAREL; GRANIT, 2001; GENTILE et al., 2004) e também foi relatado que o enriquecimento de lipoproteínas de baixa densidade humana com betalaínas, aumenta a resistência à oxidação retardando o envelhecimento da célula (TESORIERE et al., 2003). Além disso, foi documentado que pigmentos naturais, como betanina pode inibir a proliferação celular de uma ampla variedade de células tumorais humanas (MUNTHA et al., 2005).

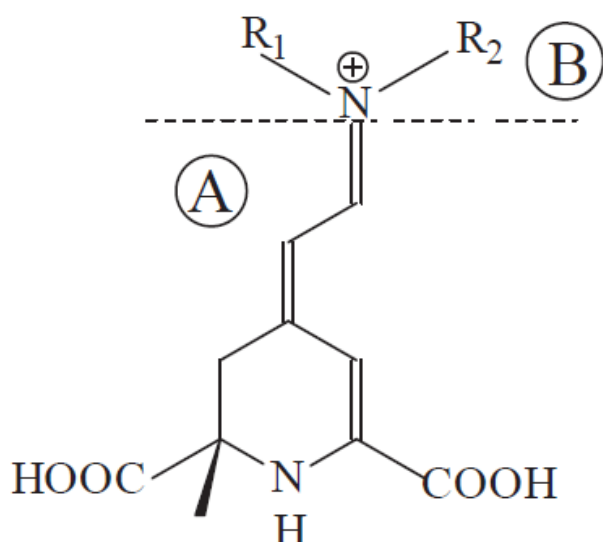


FIGURA 1 – Estrutura química geral da betalaína. (A) Ácido betalâmico presente em toda molécula de betalaína. (B) Esta estrutura poderá representar tanto a betacianina quanto a betaxantina, dependendo da identidade dos radicais 1 e 2.

2.4 Cultura de tecidos em plantas medicinais

Nas plantas medicinais, a cultura de tecidos tem auxiliado na propagação clonal de diversos genótipos, permitindo a conservação do germoplasma; a obtenção de novas fontes de variabilidade através do cultivo de calos e células; na engenharia genética e na otimização da produção de metabólitos (RAO; RAVISHANKAR, 2002; AKITA; HINA; NISHI, 2002).

Além disso, os cultivos *in vitro* de plantas medicinais facilitam os estudos a respeito da fisiologia destes vegetais, possibilitando um melhor entendimento das vias metabólicas e das necessidades nutricionais dessas plantas (GAO; FAN; PAEK; et al., 2000; SANTANA; BRITO; BELLINTANI, 2006).

Tendo em vista que grande parte dos metabólitos secundários oriundos das plantas não foram, apesar de muitas tentativas, sintetizados quimicamente (ZAHO;

VERPOORTE, 2007) e que a síntese desses produtos naturais é freqüentemente afetada por condições ambientais (GOBBO-NETO; LOPES, 2007), a produção desses compostos pelas técnicas de cultivo *in vitro*, se torna muito mais vantajosa já que o cultivo dessas plantas é realizado em meios preparados com todos os micros e macronutrientes, vitaminas e sais minerais necessários e adequados para cada cultura (SILVA et al., 2005; WANG; ZHANG; TAN, 2001).

Ainda, seguindo essa tendência, as técnicas de micropropagação possibilitam manipulações com uso de precursores ou elicitores abióticos da via de biossíntese dos compostos de interesse, proporcionando maior síntese e acúmulo desses metabólitos (SAVITHA et al., 2006; GEORGIEV et al., 2008).

2.5 Elicitores

Muitas técnicas têm sido desenvolvidas para melhorar a produtividade dos produtos naturais oriundos do metabolismo secundário dos vegetais, incluindo a seleção de linhagens, engenharia metabólica, otimização das condições de cultivo com bioreatores e uso de elicitores (GEORGIEV et al., 2008).

Os elicitores podem ser de dois tipos: abióticos, de origem não biológica tais como metais pesados, luz ultravioleta, íons e componentes inorgânicos; ou bióticos de origem biológica, como material de parede de fungos, bactérias, vírus ou herbívoros, bem como componentes químicos que são liberados no local do ataque do patógeno, que em contato com as células de plantas superiores, pode provocar o aumento da produção de pigmentos, flavonas, fitoalexinas e outras moléculas relacionados à defesa vegetal (SAVITHA et al., 2006; VASCONSUELO; BOLAND, 2007).

Tem sido relatado que, em muitos casos, se adicionado ao meio de cultivo, os elicitores podem aumentar significativamente o rendimento dos metabólitos secundários (ZHAO; DAVIS; VERPOORTE, 2005). Este procedimento é reconhecidamente uma das estratégias mais promissoras para maximizar a produção do grupo das betalaínas, incluindo as betacianinas, já que a defesa vegetal está entre as funções fisiológicas dessas moléculas (GEORGIEV et al., 2008). Ainda, segundo esses autores o uso de precursores como os aminoácidos, teoricamente, estimularia a via biossintética de seu respectivo composto final. Em diversos cultivos celulares a produção de metabólitos secundários foi positivamente

afetada pela adição de precursores ou intermediários da via biossintética, em culturas de células e de tecidos (BERLIN et al., 1986; SILVA et al., 2005; ROCHA et al., 2005; SAVITHA et al., 2006).

2.6 Alelopatia

Alelopatia vem sendo definida pela Sociedade internacional de Alelopatia como processos que envolvem a produção de metabólitos secundários por plantas e microrganismos que influenciam no crescimento e desenvolvimento de sistemas biológicos com efeitos positivos e negativos (MALHEIROS; PEREZ, 2001; PINTO et al., 2002). Sendo assim, se aceita alelopatia como ciência abrangente, podendo ser utilizada no controle de doenças, microrganismos e plantas daninhas que acometem plantas medicinais, proporcionando matéria-prima com qualidade para a indústria de fitoterápicos (DIAS, 2005).

Os testes de germinação de sementes e crescimento inicial de radícula na presença de extratos de plantas medicinais são de grande interesse científico, visto que muitos aleloquímicos são utilizados na medicina popular para tratamento de diversas doenças, além disso, esta interação pode ser fonte de descobertas para novos compostos fitotóxicos naturais com baixa toxicidade aos organismos não alvos de controle (DIAS; ZUCOLOTO; CALDAS, 2008).

Levando em consideração que resistência ou tolerância aos metabólitos secundários que atuam como aleloquímicos é mais ou menos específica existe espécies mais sensíveis consideradas bioindicadoras como, por exemplo, *Lactuca sativa* (alface), por isso suas sementes são muito utilizadas em biotestes de laboratório (FERREIRA; ÁQUILA, 2000). Vários trabalhos foram desenvolvidos nos últimos anos para estudar o efeito alelopático de diversas espécies vegetais (LUSTOSA; OLIVEIRA; ROMEIRO, 2007; DIAS; MIGUEL; MIGUEL, 2007; FRANÇA et al., 2008; KHAN et al., 2009; SOUZA; GANDOLFI; GUALTIERI, 2010) e já foram relatados alguns resultados promissores como descobertas de novos aleloquímicos com potencial uso na agricultura.

2.7 Atividade antibacteriana

O uso abusivo e indiscriminado de antimicrobianos tem proporcionado o surgimento de resistência dos microrganismos aos fármacos de uso corrente e,

como consequência, a necessidade de se pesquisar novos produtos que possam substituir aqueles que já não têm eficácia (MASURANI; TAVARES, 2007).

Os principais mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos usados na terapêutica usual são desencadeados pela inativação enzimática, modificações nos receptores, devido a mudanças ribossômicas e de DNA girase, alterações de enzimas bacterianas e fúngicas, de transporte do antimicrobiano, nas proteínas da membrana plasmática, na força protônica reduzida e transporte ativo a partir da célula microbiana (SILVA, 2006).

A busca de novas alternativas que possam substituir ou melhorar os antimicrobianos disponíveis é urgente, e uma das fontes de pesquisa é representada pelos produtos de origem natural. Grande parte dos antimicrobianos em uso (penicilinas, cefalosporinas, aminoglicosídeos, entre outros) é derivada de metabólitos secundários de fungos e bactérias (SILVA, 2006).

É possível que da mesma forma, existam metabólitos provenientes de espécies vegetais com propriedades semelhantes e que futuramente possam substituir os medicamentos outrora eficientes. O antimicrobiano ideal, objeto permanente de pesquisa, é aquele que apresenta atividade letal ou inibitória contra diferentes espécies de microorganismos, não provoca efeitos colaterais, seja quimicamente estável e não induza resistência microbiana (SCHENKEL et al., 2004).

As espécies do gênero *Alternanthera* possuem uma enorme diversidade molecular dos seus produtos naturais, em vista disso, já foram realizados alguns estudos promissores na busca de moléculas com potencial antibacteriano, dentro do gênero (BROCHADO et al., 2003; SALVADOR; DIAS, 2004).

Foi verificado por Duarte et al. (2002) que extratos aquosos, oriundos de *A.tenella*, foram capazes de paralisar o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*, entre outras cepas bacterianas.

Caetano et al. (2002) analisaram o extrato bruto de *Alternanthera brasiliana* quanto a sua atividade antimicrobiana e verificaram ação positiva frente a cepas de *Staphylococcus aureus* e de isolados hospitalares. Estudos com outras espécies do gênero, como *Alternanthera maritima* e *Alternanthera sessilis* também tiveram sua atividade antibacterianas confirmadas (SALVADOR et al., 2004; JALALPURE et al., 2008).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução nº 90, de 2004. Disponível em <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=10242>> acessado em 09 de Fevereiro de 2010.

AKITA, T.; HINA, Y.; NISHI, T. New medium composition for high betacyanin production by a cell suspension culture of table beet (*Beta vulgaris* L.). **Bioscience, biotechnology and biochemistry**, v. 66, n. 4, p. 902-905, 2002.

BERLIN, J.; SIEG, S.; STRACK, D.; BOKERN, M.; HARMS, H. Production of betalains by suspension cultures of *Chenopodium rubrum* L. **Plant Cell Tissues Organ Culture**, v. 5, p. 163–174, 1986.

BLUNDEN, G.; YANG, M.; JANICSÁK, G.; MÁTHÉ, I.; CABAROT-CUERVO, C. Betaine distribution in the Amaranthaceae. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 27, p. 87-92, 1999.

BROCHADO, C. O.; ALMEIDA, A. P.; BARRETO, B. P.; COSTA, L. P.; RIBEIRO, L. S.; PEREIRA, R. L. C.; GONÇALVES-KOATZ, V. L.; COSTA, S. S. Flavonol robinobiosides and rutinosides from *Alternanthera brasiliensis* (Amaranthaceae) and their effects on lymphocyte proliferation *in vitro*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, p. 449-451, 2003.

CAETANO, N.; SARAIVA, A.; PEREIRA, R.; CARVALHO, D.; PIMENTEL, M. C .B.; MAIA, M. B. S. Determinação de atividade antimicrobiana de extratos de plantas de uso popular como antiinflamatório. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.12, p. 132-135, 2002.

CAI, Y.; SUN, M.; CORKE, H. Characterization and application of betalain pigments from plants of the Amaranthaceae. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, p. 370-376, 2005.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p.131-134, 2005.

CUNICO, M. M.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D.; AUER, C. G.; MONACHE, F. D. Potencial antimicrobiano e alelopático das amidas isoladas do extrato das raízes de *Ottonia martiana* Miq. **Química Nova**, v. 29, p. 746-749, 2006.

DIAS, G.; ZUCOLOTO, M.; CALDAS, Z. M. Estresse oxidativo em células vegetais mediante aleloquímicos. **Revista Facultad Nacional de Agronomía**, v. 61, p. 4237-4247, 2008.

DIAS, J. F. G.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D. Cromatografia gasosa e avaliação da atividade alelopática das frações hexano, diclorometano e acetato de etila de *Aster lanceolatus* Willd. (Asteraceae). **Visão Acadêmica**, v. 8, p.11-18, 2007.

DIAS, Joseane. **Estudo alelopático aplicado de *Aster lanceolatus* Willd.** 2005. 47f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

DUARTE, M. G. R.; SOARES, I. A. A.; BRANDÃO, M.; JACOME, R. L. R. P.; FERREIRA, M. D.; SILVA, C. R. F.; OLIVEIRA, A. B. Perfil fitoquímico e atividade antibacteriana *in vitro* de plantas invasoras. **Revista Lecta**, v. 20, p. 177-182, 2002.

FANG, J. B.; DUAN, H. Q.; ZHANG, Y. W.; YOSHIHISA, T. Cytotoxic triterpene saponins from *Alternanthera philoxeroides*. **Journal of Asian natural products research**, v. 11, p. 261-266, 2009.

FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Alelopatia: Uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, p. 175-204, 2000.

FRANÇA, I. S. X.; SOUZA, J. A.; BAPTISTA, R. S.; BRITTO, V. R. S. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 61, p. 201-208, 2008.

GAO, W. Y.; FAN, L.; PAEK, K. Y. Yellow and red pigment production by cell cultures of *Cathamus tinctorius* in a bioreactor. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 60, p. 95-100, 2000.

GENTILE, C.; TESSORIERE, L.; ALLEGRA, M.; LIVREA, M.A.; ALESSIO, P.D. Antioxidant betalins from Cactus pear (*Ficus-indica*) inhibit endothelial ICAM-1 expression. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1028, p. 481–486, 2004.

GEORGIEV, V.; MLADENKA, I.; BLEY, T.; PAVLOV, A. Betalain production in plant in vitro systems. **Acta physiologic plant**, v. 30, p. 581-593, 2008.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, abr. 2007. Disponível em <<http://www.scielo.br/scielo>. Acessado em: 10 de Janeiro 2011.

GUNASEKERA, L.; BONILA, J. Alligator weed: tasty vegetable in Australian backyards. **Journal of Aquatic Plant Management**, v. 39, p. 17-20, 2001.

JALALPURE, S. S.; GRAWAL, N.; PATIL, M. B.; CHIMKODE, R.; TRIPATHI, A. Antimicrobial and wound healing activities of leaves of *Alternanthera sessilis* Linn. **International Journal of Green Pharmacy**, v. 2, p. 140-142, 2008.

KANNER, J.; HAREL, S.; GRANIT, R. Betalains – a new class of dietary cationized antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 5178–5185, 2001.

KHAN , L. A.; HAMAYUN, M.; HUSSAIN, J.; ABDULLAH, S.; KIKUCHI, A.; KAZOU, N.; WATANABE, E.; LEE, I. Assessment of allelopathic potential of selected medicinal plants of Pakistan. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, p. 1024-1029, 2009.

KISSMANN, K. G; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. – 2ed. BASF. São Paulo.1999.

LUSTOSA, F. L. F.; OLIVEIRA, S. C. C.; ROMEIRO, L. A. Efeito Alelopático de Extrato Aquoso de *Piper aduncum* L. e *Piper tectoniifolium* Kunth na Germinação e Crescimento de *Lactuca sativa* L. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 849-851, 2007.

MALHEIROS, A.; PERES, M. T. L. P. Alelopatia: interações químicas entre espécies. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**, Chapecó: Ed. Argos, 2001. p. 503-523.

MARQUES, L. C.; PETROVICK, P. R. Normatização da produção e comercialização de fitoterápicos no Brasil. In: SIMÕES, C. M. O et al. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 3ªed. Porto Alegre: Ed da UFRGS, 2001. p. 261-299.

MASURANI, A.; TAVARES, L. C. Estudos de QSAR-3D em derivados 5-nitro-2-tiofilidênicos com atividade frente à *Staphylococcus aureus* multi-resistente. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, p.101-116, 2007.

MUNTHA, R. K; RUBY, L.; LINDO, A.; MURALEEDHARAN, G. Relative inhibition of lipid peroxidation, cyclooxygenase enzymes and human tumor cell proliferation by natural food colors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 9268–9273, 2005.

PINTO, A. C; SILVA, D. H. S; BOLZANI, V. S; LOPES, N. P; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e Perspectivas. **Química Nova**, v. 25, p. 45-61, 2002.

RAO, S. R.; RAVISHANKAR, G. A. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 20, p. 101-153, 2002.

RATTANATHONGKOM, A.; KANCHANAPOOM, T.; TOSHIMITSU, L.; SRIPANIDKULCHAI, H.; BUNG-ORN, J. Evaluation of saponin IV isolated from *Alternanthera philoxeroides* for its potency against viral replication. **Planta medica**, v. 75, p. 829-835, 2009.

ROCHA, K. L.; OLIVEIRA, A. J. B.; MANGOLIN, A. C.; MACHADO, M. F. P. S. Effect of different culture medium components on production of alkaloid in callus tissues of *Cerus peruvianus*. **Acta Scientiarum**, v. 27, p. 37-41, 2005.

SALVADOR, M. J.; ZUCCHI, O.; ARAÚJO, L. D.; CANDIDO, R. C.; ITO, I. Y.; DIAS, D. A. *In vitro* antimicrobial activity of crude extracts and isolated constituents of *Alternanthera maritima* (Amaranthaceae). **Pharmaceutical Biology**, v. 42, p. 138-148, 2004.

- SALVADOR, M. J.; DIAS, D. A. Flavone C-glycosides from *Alternanthera maritima* (Mart.) St. Hil. (Amaranthaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, p. 107-110, 2004.
- SANTANA, J. R. F.; BRITO, A. L.; BELLINTANI, M. C. **Cultura de tecidos Vegetais, Micropropagação e conservação de germoplasma do semi-árido**. In: IMSEAR (Instituto do Milênio do Semi-Árido), v. 5, p. 125-126, 2006.
- SAVITHA, B. C.; THIMMARAJU, R. N.; BHAGYALAKSHMI, B. A.; RAVISHANKAR, G. A. Different biotic and abiotic elicitors influence betalain production in hairy root cultures of *Beta vulgaris* in shake-flask and bioreactor. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 50–60, 2006.
- SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: Simões, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5° ed., Porto Alegre: Ed. da UFRGS, 2004. 371-379p.
- SILVA, N. C. B.; MACEDO, A. F.; LAGE, C. L. S.; ESQUIBEL, M. A.; SATO, A. Developmental effects of additional ultraviolet a radiation growth regulators and tyrosine in *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze cultured *in vitro*. **Brazilian archives of biology and technology**, v. 48, p. 779-786, 2005.
- SILVA, P. **Farmacologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.1398p.
- SIQUEIRA, J. C. Phytogeography of brasilian Amaranthaceae. **Pesquisa Botânica**, p. 5-21, 1995.
- SOUSA, F. C.; MELO, C. T. V.; CITÓ, M. C. O.; CAVALCANTE, F. H.; VASCONCELOS, S. M. M.; FONTELES, M. M. F.; VIANA, G. S. S. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: Uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.18, p. 642-654, 2008.
- SOUZA, F. M.; GANDOLFI, S.; GUALTIERI, S. C. J.; RODRIGUES, R. R. Allelopathic potential of bark and leaves of *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (Rutaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, p.169-174, 2010.
- STRACK, D.; VOGT, T.; SCHLIEMANN, W. Recent advances in betalain research. **Phytochemistry**, v. 62, p. 247-269, 2003.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Trad. SANTARÉM, E. R. et al. 4. ed. UFV, 220 p. 2009.
- TANAKA, Y.; SASAKI, N.; OHMIYA, A. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. **The Plant Journal**, v. 54, p. 733–749, 2008.

TESORIERE, L.; BUTERA, D.; D'ARPA, D.; DI GAUDIO, F.; ALLEGRA, M.; GENTILE, C.; LIVREA, M. A. Increased resistance to oxidation of betalain-enriched human low density lipoproteins. **Free Radical Research (Journal Seek)**, v. 37, p. 689–696, 2003.

VASCONSUELO, A.; BOLAND, R. Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. **Plant Science**, v. 172, p. 861-875, 2007.

VEIGA-JUNIOR, V. F.; MELLO, J. C. P. As monografias sobre plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 464-471, 2008.

VEIGA-JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, p. 519-528, 2005.

VIEGAS, J. R. C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, p. 326-337, 2006.

VOLP, A. C. P.; RENHE, I. R. T.; STRINGUETA, P. C. Pigmentos naturais bioativos. **Alimentos e nutrição**, v. 20, p. 157-166, 2009.

WANG, J. W.; ZHANG, Z.; TAN, R. X. Stimulation of artemisin production in *Artemisia annua* hairy roots by the elicitor from the endophytic *Colletotrichum* sp. **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 857-860, 2001.

ZHAO, J.; DAVIS, L. C.; VERPOORTE, R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. **Biotechnology**, v. 23, p. 283–333, 2005.

ZHAO, J.; VERPOORTE, R. Manipulating indole alkaloid product ion by *Catharanthus roseus* cell cultures in bioreactors: from biochemical processing to metabolic engineering. **Phytochemistry**, v. 6, p. 435-457, 2007.

2
3 **Produção de betacianina e crescimento de plantas de *Alternanthera***
4 ***philoxeroides* (Mart.) Griseb., cultivadas *in vitro*, na presença de tirosina.**

5
6 **Betacyanin content and plant growth *Alternanthera***
7 ***philoxeroides* (Mart.) Griseb *in vitro* propagation on presence of tyrosine.**

8
9 **KLEINOWSKI, Alírcia Moraes¹; PETERS, José Antonio¹**

10 **BRAGA, Eugenia Jacira Bolacel¹**

11
12 ¹ Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, Instituto de Biologia, Departamento
13 de Botânica Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.

14 E-mail: amk.bio@hotmail.com

15 **RESUMO**

16 *Alternanthera philoxeroides* (Amaranthaceae) é uma espécie medicinal que possui
17 betacianinas como pigmentos naturais. A presença dessa classe de moléculas torna essa
18 espécie uma importante fonte de investigação medicinal e para essa finalidade a cultura de
19 tecidos vegetais é uma valiosa ferramenta, pois admite uso de precursores exógenos, ou
20 elicitores, na biossíntese de substâncias de interesse. O objetivo do presente trabalho foi
21 demonstrar a influência da tirosina e no crescimento de plantas na produção de betacianina
22 de *A. philoxeroides*, cultivadas *in vitro*. Segmentos nodais foram inoculados em meio MS
23 com diferentes concentrações de tirosina (0; 25; 50 e 75µM). Após 40 dias, foi avaliado o
24 número médio de gemas e brotos, altura massa fresca da parte aérea comprimento da raiz,
25 massa fresca das raízes e quantificação de betacianina em folhas e caule. Dentre as
26 variáveis de crescimento da parte aérea somente a altura, na maior concentração,
27 apresentou um decréscimo significativo em relação ao controle. A raiz reduziu a partir da
28 primeira concentração de tirosina onde sofreu decréscimo no comprimento sendo que a

29 concentração de 75µM inibiu a formação de raízes. A produção de betacianina,
30 independente do tratamento, foi maior no caule, enquanto na folha o aumento foi
31 proporcional às concentrações do aminoácido utilizado. Estes resultados demonstram que a
32 tirosina adicionada ao meio de cultura MS, pode alterar as características de crescimento de
33 *A. philoxeroides* e induzir maior produção de betacianina.

34 **Palavras-chave:** elicitores, metabólitos secundários, betalainas, cultura de tecidos

35

36

ABSTRACT

37

38 *Alternanthera philoxeroides* (Amaranthaceae) is a medicinal plant that has betacyanins as
39 natural pigments. The presence of this class of molecules makes this species an important
40 source of medical research and for this purpose the plant tissue culture is a valuable tool
41 since it allows use of exogenous precursors or elicitors, in the biosynthesis of substances of
42 interest. The aim of this study was to demonstrate the influence of tyrosine in plant growth
43 and production of betacyanin *A. philoxeroides* cultivated in vitro. Nodal segments were
44 inoculated in MS medium with different concentrations of tyrosine (0, 25, 50 and 75µM). After
45 40 days, we measured the average number of buds and shoots, then shoot fresh weight of
46 root length, fresh weight of roots and quantification of betacyanin leaves and stem. Among
47 the variables, only growth of the shoot height, the highest concentration, showed a significant
48 decrease compared to control. The root was affected from the first concentration of tyrosine
49 which suffered a decrease in the length and the concentration of 75µM inhibited root
50 formation. Betacyanin production, independent of treatment was higher in the stem, while the
51 increase in the leaf was proportional to the concentrations of tyrosine used. These results
52 demonstrate that tyrosine added to MS medium, can alter the growth character of *A.*
philoxeroides and induce higher production of betacyanin.

53

Key-words: elicitors, secondary metabolism, betalain, tissue culture

54

55

56

57

INTRODUÇÃO

58 *Alternanthera philoxeroides* (Amaranthaceae), originária da América do Sul,
59 conhecida como erva-de-jacaré, é uma planta medicinal, herbácea e perene considerada em
60 muitas regiões do mundo como uma vigorosa invasora pela sua capacidade de adaptação a
61 diferentes ecossistemas (Gunasekera & Bonila, 2001). Prospecções fitoquímicas, desta
62 espécie medicinal, revelaram a presença de flavonoides, flavonoides glicosilados e
63 betalaínas (Blunden et al., 1999; Rattanathongkom et al., 2009).

64 As betalaínas são pigmentos naturais N-heterocíclicos, derivadas do aminoácido
65 tirosina, que sob a ação da enzima tirosina hidroxilase formam um composto intermediário a
66 DOPA (4,5 dihidroxifenilalanina). Este, após oxidação, transforma-se em cDOPA que por
67 reações espontâneas, ou ainda desconhecidas, originam a classe das betalaínas (Tanaka
68 et al., 2008).

69 As betalaínas se classificam em dois subgrupos: betaxantinas (amarelas) e
70 betacianinas (vermelhas). As betacianinas podem ainda ser classificadas quimicamente em
71 quatro tipos: betanina, amarantina, gonferina e bougainvilina (Volp et al., 2009).

72 A importância bioativa destes pigmentos, como efeitos antivirais e antimicrobianos,
73 vem sendo estudada por diversos autores (Strack et al., 2003), além disso, suas
74 propriedades antioxidantes foram demonstradas em uma ampla gama de ensaios (Kanner et
75 al., 2001; Gentile et al., 2004) Foi relatado, por exemplo, que o enriquecimento de
76 lipoproteínas de baixa densidade humana com betalaínas, aumenta a resistência à
77 oxidação, retardando o envelhecimento da célula (Tesoriere et al., 2003). Foi documentado
78 também que, pigmentos naturais, como betanina podem inibir a proliferação celular de uma
79 ampla variedade de células tumorais humanas (Muntha et al., 2005).

80 Com toda essa gama de aplicações a presença dessa classe de moléculas torna
81 essa espécie uma importante fonte de investigação medicinal e farmacológica sendo,
82 portanto, material promissor para a busca de novos fármacos ou medicamentos (Volp et al.,
83 2009).

84 A cultura de células e tecidos vegetais pode contribuir para este tipo de estudo, pois
85 admite o uso de precursores exógenos e de estimuladores ou elicitores (físicos, químicos e
86 biológicos) da biossíntese de substâncias de interesse (Oliveira, 2000).

87 Zhao et al. (2005), constataram que em muitos casos a adição de elicitores
88 apropriados incrementa significativamente a produção de metabólitos secundários em
89 cultura de tecidos. Trejo-Tapia et al. (2001) testaram microelementos em culturas de células
90 em suspensão de *Beta vulgaris* para aumentar a produção de betacianina.

91 Perotti et al. (2010), cultivando *A. philoxeroides in vitro* constataram que com adição
92 de CuSO₄ em meio MS (Murashige & Skoog, 1962), semi- sólido, aumentou a produção de
93 betacianina. Em diversos cultivos celulares a produção de metabólitos secundários pode ser
94 positivamente influenciada pela adição de precursores ou intermediários da via biossintética.
95 Em culturas de células de *Catharanthus roseus* (L.), suplementadas com diversos
96 aminoácidos, Taha et al. (2008) mostraram elevação nos teores de seus alcaloides
97 indólicos.

98 Em *Alternanthera brasiliana* foi observado um aumento na produção de betacianina,
99 em meio MS, semi-sólido, contendo tirosina (Silva et al., 2005).

100 Considerando a importância bioativa deste pigmento natural e a carência de estudos
101 com esta espécie medicinal, o objetivo do presente trabalho foi demonstrar a influência da
102 tirosina no crescimento e na produção de betacianina em plantas de *A. philoxeroides*,
103 cultivadas *in vitro*.

104

105

MATERIAL E MÉTODOS

106 Material Vegetal

107 Plantas de *A. philoxeroides* (erva-de-jacaré), provenientes do município de Rio
108 Grande, no Rio Grande do Sul, tiveram sua identificação taxonômica confirmada por meio
109 da chave de identificação para Amaranthaceae e catalogada no Herbário Pel sob o número
110 24.535. Para o estabelecimento *in vitro*, foram utilizados segmentos nodais de brotações
111 novas, contendo uma ou duas gemas axilares, de plantas mantidas, por 15 dias, na casa de

112 vegetação. Os segmentos foram lavados em água corrente e em água destilada sob
113 agitação mecânica por 15 minutos. Posteriormente, o material vegetal foi imerso em
114 hipoclorito de sódio 1%, com três gotas de tween (20min), e em álcool 70%, por 20
115 segundos. Todos os procedimentos foram intercalados com banhos em água estéril.

116 **Tratamentos**

117 Foi utilizado o meio MS básico sem reguladores de crescimento com pH ajustado
118 para 5,8 e após, acrescentado 7g L^{-1} de ágar. Os frascos, contendo 40 mL de meio de
119 cultura, foram vedados com papel alumínio e autoclavados por 20 minutos a uma
120 temperatura de 121°C a pressão de $1,05\text{kg cm}^{-2}$. Após a autoclavagem, quatro
121 concentrações de tirosina (0; 25; 50 e $75\mu\text{M}$), solubilizada em DMSO, foram filtradas e
122 adicionadas ao meio .

123 Os explantes foram inoculados nos meios de cultura, em câmara de fluxo laminar,
124 sob condições assépticas. Posteriormente, os frascos com os explantes foram levados para
125 sala de crescimento, onde permaneceram sob fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo
126 de fótons de $48\mu\text{moles m}^{-2}\text{ s}^{-1}$, com temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$. Aos 40 dias após a implantação
127 do experimento, foi avaliado o número médio de gemas e brotos, altura, massa fresca da
128 parte aérea (mg), comprimento das raízes (cm), massa fresca das raízes (mg) e a
129 quantificação de betacianina em folhas e caule. Para isso, os órgãos vegetais foram
130 macerados separadamente em 5 mL de água destilada e após, centrifugados a 13632g , a
131 4°C por 25 minutos. A quantificação das betacianinas foi realizada no sobrenadante, através
132 da leitura da absorbância, nos comprimentos de onda de 536nm e 650nm, em
133 espectrofotômetro, Ultrospec 2100 Pro da Amersham Biosciences®. A concentração de
134 betacianina foi determinada levando em consideração o coeficiente de extração molar para
135 amarantina ($5,66 \times 10^4$) e o resultado foi expresso em mg amarantina 100g MF^{-1} (Cai et al.
136 1998).

137 **Delineamento experimental**

138 O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com quatro
139 concentrações de tirosina, cada uma contendo cinco repetições, sendo que cada unidade

140 experimental foi representada por um frasco contendo cinco explantes. Os resultados foram
141 submetidos à análise de variância, regressão polinomial, com auxílio do software estatístico
142 WinStat (Machado & Conceição, 2002). Os dados de massa fresca da raiz (mg) foram
143 transformados em raiz quadrada de $x + 0,5$ onde x é o numero médio de massa fresca
144 obtida.

145

146

RESULTADOS E DISCUSÕES

147 Em todas as concentrações de tirosina utilizadas, neste experimento, ocorreu
148 formação de brotos e gemas, demonstrando com isso, que alterações nestas características
149 de crescimento, não foram significativas (Figura 1A e 1B).

150 As alturas das plantas tratadas com tirosina tiveram um decréscimo significativo, com
151 o aumento das concentrações de tirosina sendo a maior média de foi encontrada no controle
152 (6,91), (Figura 1C e 3).Tendo em vista que o nitrogênio é um nutriente essencial para o
153 crescimento e desenvolvimento das plantas (Mohamed et al., 2004) a sua falta de
154 disponibilidade causada pelo excesso de nitrogênio orgânico que acidifica o meio de cultivo
155 que segundo, Nicoloso et al. (2008) apresenta baixa capacidade de tamponamento, pode ter
156 afetado o crescimento das plantas de *A. philoxeroides*.

157 A massa fresca da parte aérea (Figura 1D) não foi influenciada pela presença de
158 tirosina sendo que as plantas do controle MS foram as que apresentaram médias maiores
159 (65,2mg). Estes resultados diferem dos encontrado por Silva et al. (2005) que estudando os
160 efeitos da luz, reguladores de crescimento e tirosina em plantas *in vitro* de *A. brasiliana*
161 observaram que as plantas tratadas com 10 μ M de tirosina diminuiram significativamente sua
162 massa independente de outro tratamento utilizado.

163 A presença de tirosina no meio de cultivo influenciou negativamente no comprimento
164 e na massa fresca das raízes sendo que na concentração de 75 μ M não houve rizogênese.
165 Em estudo feito por Soares (2006), com plantas de soja (*Glycine max*) tratadas com tirosina
166 hidroxilada, a média total do comprimento e do número das raízes foram 20,9 a 76,7%
167 menores do que os controles para tratamentos com 25 μ M e 100 μ M, respectivamente.

168 Em trabalho com lentil (*Lens culinaris* Medik), Sarker et al. (2003) verificaram que
169 20 μ M do aminoácido tirosina juntamente com outros reguladores de crescimento
170 proporcionaram com sucesso a regeneração e o enraizamento *in vitro* por outro lado em
171 estudos realizados com *A. brasiliana*, Silva et al. (2005), mostraram que plantas cultivadas
172 em meio MS com 10 μ M de tirosina, sob luz branca, não apresentaram diferença no
173 enraizamento, em relação ao controle, sendo as médias 7,40cm e 7,05cm respectivamente.
174 No presente trabalho, com *A. philoxeroides*, a partir do tratamento com 25 μ M do aminoácido
175 tirosina houve diferença significativa na formação de raízes sendo que à medida que
176 aumentou as concentrações desse aminoácido no meio de cultura comprimento e a massa
177 fresca desse órgão foram reduzindo (Figuras 1E e 1F). Segundo Oliveira et al. (2009) a
178 absorção direta dos aminoácidos na raiz, proporciona vantagem às plantas sendo que estas
179 não necessitam metabolizar o nitrogênio mineral (nitrato e amônio), e assim direcionando
180 maior quantidade de energia para o enraizamento, porém o excesso desse composto
181 orgânico pode proporcionar a acidificação do substrato ocasionando toxicidade.

182 Em relação à produção de betacianina foi constatado que em todos os tratamentos o
183 caule obteve teores expressivamente mais elevados com relação às folhas demonstrando
184 diferenças significativas entre os órgãos analisados. Nos tratamentos utilizados a maior
185 média de produção de betacianina obtida foi no caule com, aproximadamente, 45 μ M (51,30
186 mg 100g MF⁻¹), já na folha o aumento foi proporcional aos tratamentos sendo a melhor
187 média obtida na concentração de 75 μ M (15,32mg 100g MF⁻¹) (Figura 2).

188 Em estudo realizado por Taha et al. (2008), a adição de aminoácidos precursores
189 como triptofano e glutamina no cultivo de *Catharanthus roseus* em meio MS, aumentou em
190 até 75% da produção de vimblastina e vincristina nas células tratadas com os mesmos. Já
191 em calos de *Mucuna pruriens*, os autores Desai et al. (2010) observaram que a aplicação de
192 140 μ M de vários aminoácidos precursores incluindo a tirosina aumentou em até 2% a
193 produção de L-DOPA, além disso, esses autores afirmaram que as aplicações de fontes
194 exógenas de nitrogênio, assim como foi realizado neste trabalho, foram essenciais para o
195 aumento da síntese desse composto.

196 Outros trabalhos relataram o aumento na síntese e acúmulo de compostos de
197 interesse em resposta a ação de elicitores, como Trejo-Tapia et al. (2001) que testaram seis
198 microelementos (Cu^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Mo^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+}) em culturas de células em suspensão de
199 *Beta vulgaris* para aumentar a produção de betacianina e obtiveram um incremento da
200 produção deste pigmento em 60% com a utilização de Cu^2 . Utilizando cobre como elicitador,
201 Perotti et al. (2010) cultivando *A. philoxeroides in vitro* constataram que com adição de
202 $175\mu\text{M}$ de CuSO_4 em meio MS (semi- sólido) incrementou a produção de betacianina em
203 60% em relação ao controle.

204 Esses autores salientam, que a enzima que desencadeia a formação das
205 betacianinas, a tirosina hidroxilase, é uma enzima cúprica e que tendo em vista que o cobre
206 é um micronutriente presente na formulação do meio MS, a adição do substrato, tirosina,
207 pode ter facilitado a ação dessa enzima e desencadeado as reações que incrementaram o
208 conteúdo de betacianina nos tratamentos utilizados. Semelhante ao que ocorreu em plantas
209 de *A. brasiliiana*, cultivada em meio MS contendo tirosina, Silva et al. (2005) constataram
210 que o acúmulo de betacianina foi de $0,08\mu\text{mol g}^{-1} \text{MS}^{-1}$ a mais que o controle.

211 A tirosina foi utilizada neste trabalho por ser o aminoácido precursor na síntese das
212 betacianinas, o que, teoricamente, conforme Georgiev et al. (2008), estimularia a via de
213 síntese do seu correspondente metabólito secundário. Este evento foi verificado nas folhas e
214 nos caules de *A. philoxeroides*, porém no caule quando foi aplicado aminoácido na maior
215 concentração, a produção do pigmento foi diminuída. Diante disso, alguns fatores têm de ser
216 levados em consideração, por exemplo, se o metabólito de interesse é, ou não, um produto
217 final da via biossintética e a capacidade celular de acúmulo do composto (Verpoorte &
218 Maraschi, 2001). No primeiro caso, o metabólito alvo não é um produto final da via
219 biossintética, a taxa de seu catabolismo pode ter se tornado inefetiva com a adição do
220 precursor. Além disso, a capacidade celular de acúmulo desse metabólito secundário não é
221 bem conhecida até o presente momento. Contudo, é esperado haver um limite de acúmulo
222 destes compostos, o que pode ter influenciado produtividade e o acúmulo desse pigmento
223 em plantas de *A. philoxeroides*.

224

CONCLUSÕES

225

226

227

228

A tirosina adicionada ao meio de cultura MS altera as características de crescimento de *A. philoxeroides* cultivadas *in vitro* como a altura e a formação de raízes, apesar disso, diferentes concentrações do aminoácido tirosina aumenta a produção de betacianina tanto nas folhas quanto nos caules desta espécie.

229

230

REFERÊNCIAS

231

232

233

234

235

236

237

238

239

240

241

242

243

244

245

246

247

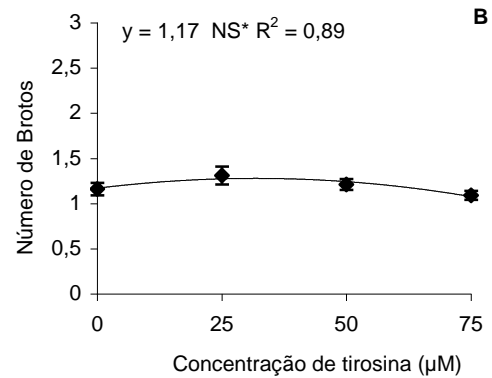
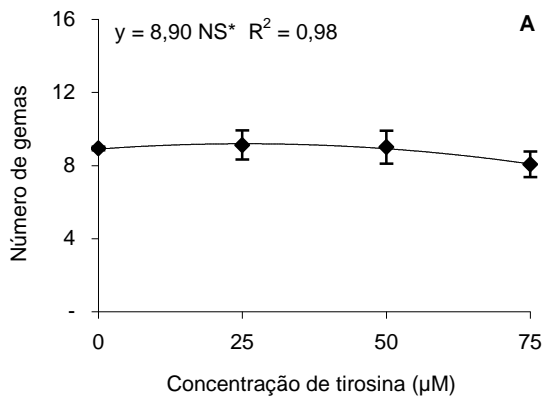
248

249

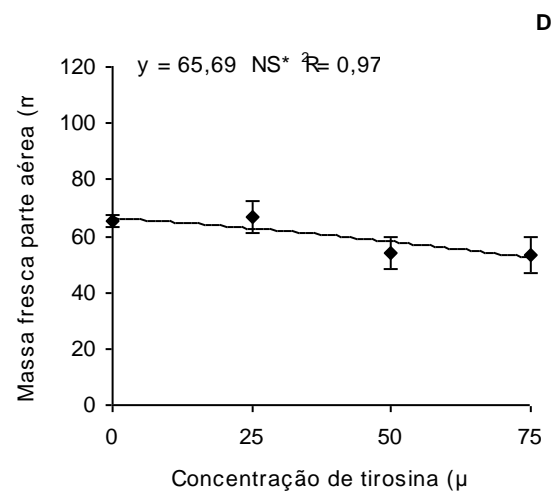
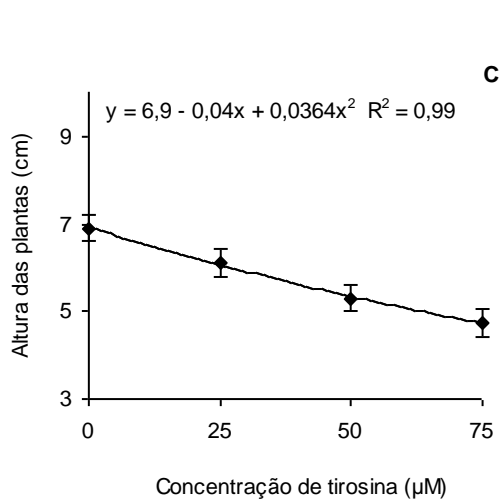
1. BLUNDEN, G. et al. Betalaine distribution in the Amaranthaceae. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 27, p. 87-92, 1999.
2. CAI, Y. et al. Characterization and quantification of betacyanin pigments from diverse *Amaranthus* species. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 46, n. 6, p. 2063-2070, 1998.
3. DESAI, M.; MADHURI, S.; SHARAN, M. Effect of Culture Conditions on L-Dopa Accumulation in Callus Culture of *Mucuna pruriens*. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 2, p. 134-146, 2010.
4. GENTILE, C. et al. Antioxidant betalins from Cactus pear (*Ficus-indica*) inhibits endothelial ICAM-1 expression. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1028, p. 481–486, 2004.
5. GEORGIEV, V. et al. Betalain production in plant in vitro systems. **Acta physiologic plant**, v. 30, p. 581-593, 2008.
6. GUNASEKERA, L.; BONILA, J. Alligator weed: tasty vegetable in Australian backyards. **Journal of Aquatic Plant Management**, v. 39, p. 17-20, 2001.
7. KANNER, J.; HAREL, S.; GRANIT, R. Betalains – a new class of dietary cationized antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 5178–5185, 2001.
8. MACHADO, A.; CONCEIÇÃO, A. R. Programa estatístico WinStat **Sistema de Análise Estatístico para Windows**. Versão 2.0. Pelotas: UFPel, 2002.

- 250 9. MOHAMED, S. V. et al. In vitro plant regeneration via somatic embryogenesis through cell
251 suspension cultures of *Macrotyloma uniflorum* (Lam.). **In Vitro Cellular & Developmental**
252 **Biology Plant**, v. 40 p. 284–289, 2004.
- 253 10. MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with
254 tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-97, 1962.
- 255 11. MUNTHA, R. et al. Relative inhibition of lipid peroxidation, cyclooxygenase enzymes
256 and human tumor cell proliferation by natural food colors. **Journal of Agricultural and**
257 **Food Chemistry**, v. 53, p. 9268–9273, 2005.
- 258 12. NICOLOSO, F. T. et al. pH do meio de cultivo e crescimento de plântulas de ginseng
259 brasileiro cultivadas *in vitro*. **Ciência Rural**, v. 38, p.2059-2062, 2008.
- 260 13. OLIVEIRA, M. M. Aplicações e avanços na área da biotecnologia vegetal. **Revista**
261 **Boletim de Biotecnologia**, v. 66, p. 22-27, 2000.
- 262 14. OLIVEIRA, M. C. et al. Enraizamento de estacas de oliveira submetidas à aplicação de
263 fertilizantes orgânicos e AIB. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, p. 337-344, 2009.
- 264 15. PEROTTI, J. C. et al. Produção de betacianina em erva-de-jacaré cultivada *in vitro* com
265 diferentes concentrações de sulfato de cobre. **Ciência Rural**, v. 40, p. 1874-1880,
266 2010.
- 267 16. RATTANATHONGKOM, A. et al. Evaluation of chikusetsusaponin IVa isolated from
268 *Alternanthera philoxeroides* for its potency against viral replication. **Planta medica**, v.
269 75, p. 829-835, 2009.
- 270 17. SARKER, R. H. et al. In vitro Regeneration in Lentil (*Lens culinaris* Medik.). **Plant**
271 **Tissue Culture Micropropagation**, v. 13, p. 155-163, 2003.
- 272 18. SILVA, N. C. B. et al. Developmental effects of additional ultraviolet a radiation growth
273 regulators and tyrosine in *Alternanthera brasiliiana* (L.) Kuntze cultured in vitro.
274 **Brazilian archives of biology and technology**, v. 48, p. 779-786, 2005.
- 275 19. SOARES, Anderson. **Lignificação de raízes de soja sob a ação de L-**
276 **diidroxifenilalanina (L-Dopa)**. Dissertação (mestrado) - 41f Universidade Estadual de
277 Maringá. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Maringá, 2006.

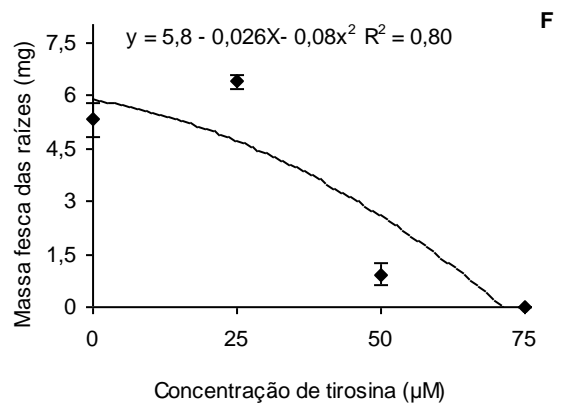
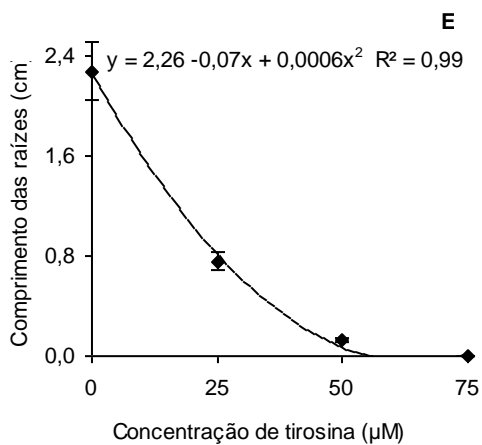
- 278 20. STRACK, D.; VOGT, T.; SCHLIEMANN, W. Recent advances in betalain research.
279 **Phytochemistry**, v. 62, p. 247–269, 2003.
- 280 21. TANAKA, Y.; SASAKI, N.; OHMIYA, A. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins,
281 betalains and carotenoids. **The Plant Journal**, v. 54, p. 733–749, 2008.
- 282 22. TAHA, H. S. et al. In *vitro* studies on Egyptian *Catharanthus roseus* (L.) G Effects of
283 extra tryptophan decarboxylase and strictosidine synthase genes indole alkaloid
284 production. **Journal of Cell and Molecular Biology**, v. 2, p. 18-23, 2008.
- 285 23. TESORIERE, L. et al. Increased resistance to oxidation of betalain-enriched human low
286 density lipoproteins. **Free Radical Research (Journal Seek)**, v. 37, p. 689–696, 2003.
- 287 24. TREJO-TAPIA, G. et al. Influence of cobalt and other microelements on the production
288 of betalains and the growth of suspension cultures of *Beta vulgaris*. **Plant Cell, Tissue
289 and Organ Culture**, v. 67, p.19-23, 2001.
- 290 25. VERPOORTE, R.; MARASCHI, M. Engenharia do metabolismo de plantas medicinais.
291 In: Yunes, R. A., Calixto, J. B. (org.). **Plantas medicinais sob a ótica da química
292 medicinal moderna**, p. 381-432, 2001.
- 293 26. VOLP, A. C. P.; RENHE, I. R. T.; STRINGUETA, P. C. Pigmentos naturais bioativos.
294 **Alimentos e nutrição**, v. 20, p. 157-166, 2009.
- 295 27. ZHAO, J.; DAVIS, L. C.; VERPOORTE, R. Elicitor signal transduction leading to
296 production of plant secondary metabolites. **Biotechnology**, v. 23, p.283–333, 2005.
- 297



298



299

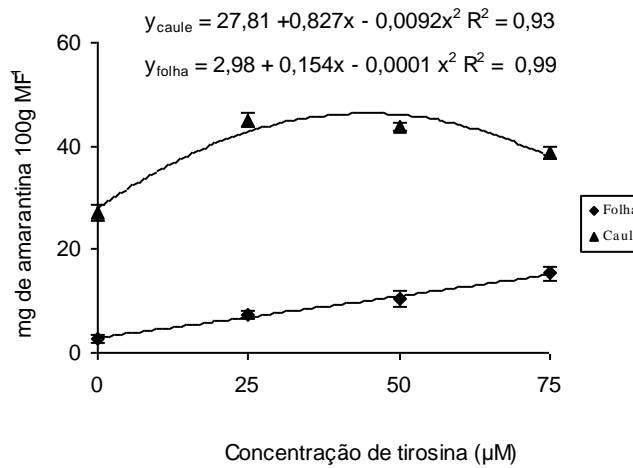


300

301 FIGURA 1- Número de gemas (A), número de brotos (B), altura (C), massa fresca da parte aérea
 302 (D), comprimento de raízes (E) e massa fresca da raiz (F) de plantas de *Alternanthera philoxeroides*,
 303 cultivadas *in vitro*, por 40 dias em meio MS com diferentes concentrações de tirosina. Barras verticais
 304 representam o erro padrão da média de cinco repetições

305

306

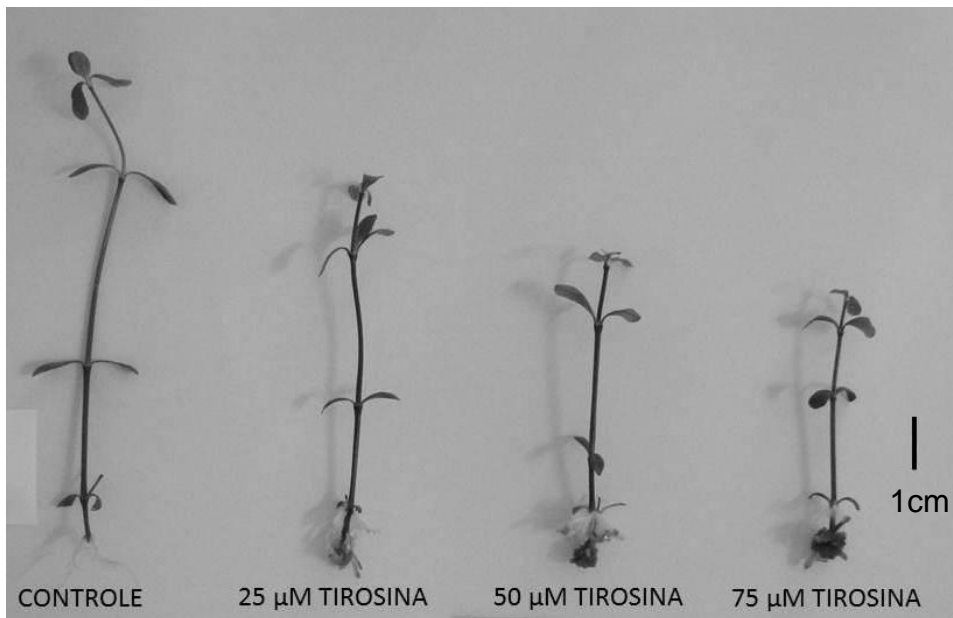


307

308 FIGURA 2- Produção de betacianina em plantas de *Alternanthera philoxeroides*, cultivadas *in vitro*, por
 309 40 dias, em meio MS com diferentes concentrações de tirosina. Barras verticais representam o erro padrão
 310 da média de cinco repetições.

311

312



313

314 FIGURA 3- Plantas de *Alternanthera philoxeroides* cultivadas *in vitro*, por 40 dias, em meio MS com
 315 diferentes concentrações de tirosina.

316

ARTIGO 2- CIÊNCIA RURAL

Potencial alelopático e antibacteriano da erva-de-jacaré

Potential allelopathic and antibacterial from alligator weed

Alírcia Moraes kleinowski^I; Gládis Aver Ribeiro^{II}; José Antonio Peters^{III}; Eugenia Jacira

Bolacel Braga^{III}

RESUMO

Alternanthera philoxeroides (erva-de-jacaré), é uma espécie promissora como fonte de moléculas com potencial farmacológico. Para acelerar esse processo a escolha de métodos multidisciplinares, como o teste de alelopátia em sementes e técnica de difusão de disco em bactérias, é uma excelente alternativa. O objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos alelopáticos e a capacidade antibacteriana dos extratos de folhas e caules de *A. philoxeroides*. Os extratos foram obtidos por partição líquido-líquido, com solventes de polaridade crescente (hexano, diclorometano, acetato de etila, butanólico e aquoso) de folhas e caules, separadamente. A avaliação da atividade antibacteriana foi realizada por meio da técnica de difusão de discos com cinco cepas de referência. Os ensaios de germinação de sementes e crescimento bacteriano foram realizados com os extratos nas concentrações de 0; 1,0; 2,0 e 3,0mg mL⁻¹, em placas de petri, contendo 30 sementes de alface no ensaio de germinação e 10 sementes no teste de crescimento. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 4x2x4 (quatro tipos de extratos, dois órgãos e quatro concentrações de extratos) resultando em 32 tratamentos. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo

I. Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, Instituto de Biologia, Departamento de Botânica Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil E mail: amk.bio@gmail.com.

II. Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Microbiologia e Parasitologia do Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil

III. Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, Instituto de Biologia, Departamento de Botânica Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil

23 teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. A germinabilidade da alface foi influenciada
24 pela fração acetato de etila obtida de folhas de *A. philoxeroides* na maior concentração e, a
25 velocidade de germinação e o crescimento da radícula foram afetados significativamente por
26 todos os extratos a partir da concentração de 1,0mg mL⁻¹. Esses resultados demonstram efeito
27 alelopático de diferentes extratos dessa espécie, embora não tenham interferido no
28 crescimento das cepas bacterianas utilizadas.

29

Palavras-chave: *Alternanthera philoxeroides*, alelopatia, germinação, disco difusão

30

31 **ABSTRACT**

32 *Alternanthera philoxeroides* (alligator weed) is a promising species in the search for new
33 molecules with biological effects. To accelerate this process the choice methods, such as the
34 test of allelopathy in seeds and disk-diffusion technique in bacteria, it is indispensable. The
35 purpose of this study was to evaluate the allelopathic effects of extracts from *A. philoxeroides*
36 and verify the antibacterial properties of this plant. The extracts were obtained by liquid-
37 liquid. To evaluate the antibacterial activity was used disc diffusion technique with five
38 reference strains. The germination test was conducted with the extracts at concentrations of
39 1,2,3 0 mg mL⁻¹ in a petri dish with 30 of lettuce and the growth trial was used 10 seeds. The
40 experimental design was completely randomized in factorial (four extracts two sources four
41 concentrations resulting in 32 treatments) each with four replicates and the averages
42 compared by Tukey test at 5% level of probability. The results indicate that the germination
43 of lettuce was influenced by ethyl acetate fraction obtained from leaves of *Alternanthera*
44 *philoxeroides* in higher concentration has the force and radicle growth of lettuce seeds was
45 significantly affected by all the extracts concentration from 1mg.mL⁻¹ these results
46 demonstrate allelopathic effect of different extracts of this species, but none of the extracts of *A.*
47 *philoxeroides* the concentration tested interfered with the growth of the strains used.

48

Key words: *Alternanthera philoxeroides*, allelopathy, germination, disc diffusion

49

50 **INTRODUÇÃO**

51 A riqueza da biodiversidade da flora brasileira, associada aos levantamentos
52 etnobotânicos e farmacognósticos, permite aos pesquisadores isolar compostos
53 biologicamente ativos a partir de diferentes espécies vegetais, os quais podem se constituir em
54 modelos tanto para a síntese de fármacos quanto para produtos de aplicação agrícola ou
55 florestal (GUERRA & NODARI, 2001).

56 Dentre à flora brasileira a espécie *Alternanthera philoxeroides*, gênero *Alternanthera*
57 (*Amaranthaceae*), conhecida popularmente como erva-de-jacaré, merece destaque, pois
58 prospecções fitoquímicas desta têm revelado uma variedade de compostos biologicamente
59 ativos, entre eles os triterpenoides, flavonoides e betalaínas (SOUZA et al., 1998;
60 BROCHADO et al., 2003). Esses compostos possuem propriedades comprovadas de ação
61 antitumoral, antiviral (FANG et al., 2007), antiinflamatória e imunomodulatória
62 (SALVADOR & DIAS, 2004) sendo, portanto, material promissor para a busca de novas
63 moléculas com efeitos biológicos. Para acelerar esse processo a escolha de métodos simples,
64 sensíveis, práticos, confiáveis e que eliminem etapas no processo de separação de
65 constituintes bioativos torna-se indispensável (CUNICO et al., 2006).

66 A alelopatia vem sendo definida pela Sociedade internacional de alelopatia como
67 processos que envolvem a produção de metabólitos secundários por plantas e microrganismos
68 que influenciam no crescimento e desenvolvimento de sistemas biológicos com efeitos
69 positivos e negativos (MALHEIROS & PEREZ, 2001; PINTO et al., 2002). Sendo assim, se
70 aceita alelopatia como ciência abrangente, podendo ser utilizada no controle de doenças,
71 microrganismos e plantas daninhas que competem com as plantas medicinais,
72 proporcionando matéria-prima com qualidade para a indústria de fitoterápicos (DIAS, 2005).

73 Os testes de germinação de sementes e crescimento inicial de radícula na presença de
74 extratos de plantas medicinais são de grande interesse científico, visto que, muitos
75 aleloquímicos são utilizados na medicina popular para tratamento de diversas doenças. Além
76 disso, esta interação pode ser fonte de descobertas para novos compostos fitotóxicos naturais
77 com baixa toxicidade aos organismos não alvos de controle (DIAS et al., 2008).

78 A tolerância aos metabólitos secundários que atuam como aleloquímicos é variável com
79 a espécie vegetal, sendo algumas altamente sensíveis, consideradas bioindicadoras como, por
80 exemplo, *Lactuca sativa* (alface), muito utilizada em biotestes de laboratório (FERREIRA &
81 ÁQUILA, 2000). Além disso, outro teste biológico, utilizado no escopo de moléculas com
82 propriedades biológicas e mais precisamente antimicrobianas é a Técnica de Difusão de Disco
83 que utiliza cepas de bactérias de referência como bioindicadoras (NASCIMENTO et al.,
84 2007).

85 Dentro do gênero *Alternanthera* já foram realizados alguns estudos promissores na
86 busca de moléculas com potencial antibacteriano. CAETANO et al. (2002) analisaram o
87 extrato bruto de *Alternanthera brasiliana* quanto a sua atividade antimicrobiana e verificaram
88 ação positiva frente a cepas de *Staphylococcus aureus* e de isolados hospitalares. Também foi
89 atribuído à atividade antimicrobiana ao extrato de *Alternanthera maritima*, contra as bactérias
90 Gram-positivas (SALVADOR et al., 2004).

91 Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi realizar estudos para avaliar os
92 efeitos alelopáticos e a capacidade antibacteriana dos extratos de caules e folhas de *A.*
93 *philoxeroides*

94

95

96

97

98 MATERIAL E MÉTODOS

99 O trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas do
100 Departamento de Botânica/IB - UFPel e no Laboratório de Bacteriologia do Departamento de
101 Microbiologia e Parasitologia/IB da UFPel. Plantas de *A. philoxeroides* cultivadas *in vitro*,
102 foram aclimatizadas em casa de vegetação por 90 dias, com umidade relativa de 80% e
103 temperatura entre 18 e 23°C.

104 Preparo dos Extratos

105 Folhas e caules de *Alternanthera philoxeroides* foram secos em estufa de ventilação
106 forçada por 10 dias a 35°C, pulverizados em moinho de facas e submetidos, separadamente, à
107 extração por maceração a frio com extrato hidroalcoólico (70%) na proporção de 1:1 (m/v),
108 durante sete dias. Os extratos foram filtrados e 100mL destes foram coletados para obtenção
109 de um extrato bruto (EB). Com o extrato restante, foi realizada partição líquido-líquido com
110 solventes de polaridades crescentes (hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol) da
111 marca Sigma[®]. As frações e o EB foram concentrados em rotaevaporador, sob pressão
112 reduzida, até sua secagem total, segundo metodologia descrita por CECHINEL & YUNES
113 (1998).

114 Ensaio da inibição germinativa e crescimento inicial da radícula (alelopatia)

115 Os extratos secos foram redissolvidos em água destilada obtendo-se soluções em
116 concentrações de 1,0, 2,0 e 3,0 mg mL⁻¹ e água destilada como testemunha. Os testes de
117 germinação e crescimento foram realizados em placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro,
118 contendo duas folhas de papel filtro e 4,0 mL de cada extrato. Para superação da dormência as
119 sementes de alface utilizadas nos experimento foram submetidas a resfriamento de 4°C por
120 72h (BRASIL, 2009).

121 Foram semeadas 30 sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) por placa e em seguida, as
122 placas foram levadas para BOD com temperatura de 20° C e fotoperíodo de 12 h para os

123 testes de germinação (BRASIL, 2009). Os testes de crescimento foram feitos nestas mesmas
124 condições, no entanto, foram semeadas 10 sementes em cada placa.

125 A taxa de germinação foi verificada a cada 24 horas, durante sete dias, utilizando-se a
126 protrusão radicular como critério para a germinabilidade. Foram determinadas as seguintes
127 variáveis: Primeira Contagem (PC), Germinação (G), Índice de Velocidade de Germinação
128 (IVG) e Comprimento da Radícula, segundo as Regras para Análise de Sementes (BRASIL,
129 2009).

130 Todos os tratamentos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizados em
131 esquema fatorial 4x2x4 (quatro tipos de extratos, dois órgãos e quatro concentrações de
132 extratos) resultando em 32 tratamentos cada um com quatro repetições. Os resultados foram
133 submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey (5%) com
134 auxílio do software WinStat (MACHADO & CONCEIÇÃO, 2002).

135 **Ensaio da atividade antibacteriana**

136 A avaliação da atividade antibacteriana foi realizada com os extratos orgânicos e o EB
137 ressolubilizados em Dimetilsulfóxido (DMSO), padronizados na concentração de 100mg mL^{-1}
138 em razão de ser o rendimento máximo obtido de todos os extratos, por meio da Técnica de
139 Difusão de Disco. Foram avaliadas cinco cepas de referência, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus*
140 *aureus* (ATCC 25923), *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) e
141 *Escherichia coli* (ATCC 8739) pertencentes à Bacterioteca do Laboratório de Bacteriologia
142 do Departamento de Microbiologia e Parasitologia do Instituto de Biologia da UFPel. As
143 cepas foram mantidas em ágar-conservação e antes dos testes foram recuperadas em Ágar
144 *Brain Heart Infusion* (BHI - Acumedia®) e incubadas por 24h a 36°C.

145 Na técnica de difusão de disco os inóculos bacterianos, padronizados na concentração
146 de $1,5 \cdot 10^8$ UFC mL^{-1} foram semeados na superfície do meio de cultura Ágar Mueller-Hinton.
147 Após, discos de papel filtro estéreis de seis milímetros de diâmetro embebidos dos extratos,

148 DMSO (controle negativo) e cloranfenicol (controle positivo) foram dispostos sobre as placas,
149 as quais foram em seguida incubadas a 36°C durante 24 horas. O experimento foi feito em
150 triplicata para cada cepa bacteriana e a leitura dos resultados foi realizada verificando-se a
151 presença ou ausência de halos de inibição.

152

153 **RESULTADOS E DISCUSSÕES**

154 **Inibição da germinação e crescimento da radícula**

155 Para a variável primeira contagem de germinação houve interação significativa entre
156 concentração dos extratos e tipos de solventes utilizados, sendo que o extrato acetato de etila
157 na maior concentração foi o que apresentou influência negativa nesta variável (Tabela 1).
158 Estes resultados são semelhantes ao verificado por DIAS et al. (2007) que analisando o efeito
159 de extrato bruto e frações hexano, diclorometano e acetato de etila de caules, folhas e flores
160 de *Aster lanceolatus* (margarida-de-são-miguel) em sementes de alface, verificaram que o
161 extrato acetato de etila de caules e folhas influenciaram negativamente a resposta do teste de
162 primeira contagem.

163 Com a utilização da metodologia de partição líquido-líquido descrita por CECHINEL &
164 YUNES (1998) a fração acetato de etila pode carrear grande parte dos compostos fenólicos
165 presentes no extrato bruto. Essas moléculas fenólicas são conhecidas pelo seu poder na
166 inibição da germinação, já que muitos desses compostos atuam em nível celular e na
167 membrana plasmática provocando a interrupção de uma gama de processos celulares com a
168 liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (ELDEEN et al., 2006). Além disso, são
169 capazes de inibir a ação das giberelinas, seja por interação com a molécula ou por bloqueio do
170 processo mediado pelas mesmas, como uma redução na síntese de enzimas hidrolíticas como
171 a amilase e a fosfatase ácida no endosperma das sementes, dificultando assim o processo
172 germinativo (SAMPIETRO, 2001).

173 Ainda para primeira contagem de germinação houve interação significativa entre a
174 concentração dos extratos e os tipos de órgão dos quais eles foram obtidos, sendo que o
175 extrato de folha na maior concentração foi o que apresentou diferença significativa (Tabela 2).
176 Em estudos comparando os efeitos inibitórios, em função da fonte de extrato de *Ateleia*
177 *glazioveana* Baill (timbó), sobre sementes de alface, foi observado que os extratos aquosos
178 oriundos das folhas provocaram efeitos inibitórios superiores aos do caule (ANESE et al.,
179 2007).

180 Para a variável germinação houve interação significativa entre os tipos de órgão
181 utilizados e os solventes extratores, sendo que o extrato acetato de etila obtido das folhas, foi
182 o que influenciou essa variável causando redução na germinação quando comparado aos
183 outros extratos (Tabela 3). As substâncias fenólicas carregadas por esse tipo de solvente como
184 descrevem CECHINEL & YUNES (1998), podem ter sido responsável por esse efeito,
185 semelhante ao que ocorreu na primeira contagem de germinação.

186 Neste trabalho o extrato bruto, obtido por maceração, em nenhuma das concentrações
187 testadas apresentou efeito negativo sobre a germinação, contrariando os resultados
188 encontrados por MAIRESSE et al. (2007), que estudando a bioatividade de diferentes
189 concentrações de extratos aquosos de *Alternanthera brasiliana* em sementes de alface,
190 constataram um efeito inibitório logo na primeira concentração de 25% utilizada, com isso
191 demonstrando o potencial alelopático dessa espécie.

192 O índice de velocidade de germinação sofreu influência significativa dos diferentes
193 solvente extratores e dos órgãos fontes (Tabela 4), sendo que os extratos de folha com acetato
194 de etila e caule com solvente butanólico e aquoso, foram os que mais causaram redução na
195 velocidade de germinação. Para que ocorra a germinação das sementes bioindicadoras nos
196 tratamentos utilizados, é necessário que haja detoxificação do substrato onde elas foram
197 semeadas, por meio de evaporação ou outros processos, das substâncias potencialmente

198 aleloquímicas e esse evento provoca alterações na curva de distribuição da germinação,
199 alongando-a através do eixo do tempo (FERREIRA & AQUILA, 2000)

200 Em relação às concentrações dos extratos (Tabela 5), levando em consideração todos os
201 solventes utilizados, houve interação significativa entre ambos os fatores, resultando em
202 decréscimo da velocidade de germinação das sementes bioindicadoras com o aumento da
203 concentração dos extratos, sendo que na maior concentração, a velocidade de protrusão da
204 radícula foi diminuída. Os autores FERREIRA & BORGHETTI (2004) destacam que
205 frequentemente, o efeito alelopático não ocorre através da redução da germinabilidade
206 (percentual final de germinação), mas sobre a velocidade de germinação diminuindo a sua
207 velocidade ao longo do tempo.

208 Quanto ao comprimento das radículas, pode-se observar que houve interação
209 significativa entre as concentrações e os tipos de solventes utilizados onde todos aos extratos
210 a partir da concentração de 1mg mL^{-1} diferiram estatisticamente do controle sendo que na
211 maior concentração foram obtidos os menores valores de comprimento de radícula (Tabela 6).
212 Esses resultados demonstram maior sensibilidade dessa variável, aos efeitos deletérios dos
213 aleloquímicos presentes nos extratos de *A. philoxeroides*.

214 Estudos realizados com *Artemisia annua* L., avaliando o efeito alelopático, na
215 germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de alface, foi constatado que o sistema
216 radicular das plantas é o mais sensível a ação de aleloquímicos, porque o seu alongamento
217 depende da divisão celular que, se inibida, compromete o seu desenvolvimento normal
218 (MAGIERO et al., 2009).

219 Para a variável comprimento da radícula também foi verificada interação significativa
220 entre os órgãos e os solventes extratores sendo que o extrato acetato de etila obtido a partir
221 das folhas e o butanólico obtido do caule foram o que mais interferiram negativamente no
222 crescimento da radícula (Tabela 7).

223 Em um trabalho realizado para verificar o potencial alelopático de lixiviados de folhas
224 de plantas invasoras como *Amaranthus viridis* (Amarantaceae) e *Leonurus sibiricus*, Cândido
225 et al., 2010 demonstraram que extratos dessas plantas, causaram inibição na porcentagem de
226 germinação (> 40%) e o crescimento da raiz (\geq 70%) de sementes de alface, além disso esses
227 autores também constataram que o teste biométrico (medição da radícula) é mais sensível na
228 determinação dos efeitos alelopáticos e pode ser favorecida pelo contato físico da raiz com o
229 substrato de papel filtro utilizado.

230 **Atividade antibacteriana**

231 Os extratos de *A. philoxeroides* não inibiram o crescimento das cepas de referência,
232 *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas*
233 *aeruginosa* (ATCC 9027) e *Escherichia coli* (ATCC 8739).

234 Estes resultados são de certa forma, inesperados, à medida que os metabólitos presentes
235 nesta espécie vêm sendo identificados e foi verificado que os compostos fenólicos,
236 naturalmente, eficientes contra microrganismos patogênicos estão amplamente distribuídos
237 nessa espécie (FANG et al., 2007).

238 CAETANO et al. (2002) analisaram o extrato bruto de *A. brasiliana* quanto a sua
239 atividade antimicrobiana frente a cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538 e ATCC
240 9144) e *S. aureus* de isolados hospitalares (metilicina resistentes e não resistentes) e o extrato
241 mostrou uma atividade bastante semelhante ao cloridrato de tetraciclina utilizado como
242 padrão.

243 Também foi registrada atividade antimicrobiana dos extratos brutos de *A. maritima*,
244 principalmente, *versus* bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* (ATCC6538),
245 *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) e os extratos etanólicos e hexânicos das partes aéreas da
246 *A. marítima* mostraram alguma inibição contra bactérias Gram-negativas como *Escherichia*
247 *coli* (ATCC 10538) e *E. coli* (ec 26.1). Os autores ainda sugerem que estes extratos podem ser

248 utilizados como aditivo antimicrobiano natural em cosméticos ou na indústria alimentícia ou
249 então auxiliar na síntese de novas drogas (SALVADOR et al., 2004).

250 A ausência de atividade antimicrobianas verificado neste trabalho para os extratos
251 orgânico (hexano, diclorometano, acetato de etila, butanólico) e inorgânico (extrato bruto)
252 instigam a realização de novos testes com outras espécies de microrganismos indicadores
253 outros solventes extratores e ainda outras concentrações de extratos para que se obtenha uma
254 melhor definição do perfil de atividades antibacterianas da espécie *A. philoxeroides*.

255

256 CONCLUSÃO

257 Todos os extratos orgânicos e inorgânicos estudados apresentam efeito alelopático
258 porque agem diminuindo a velocidade de germinação e o comprimento da radícula das
259 sementes de alface. Não há atividade antibacteriana nos extratos de *Alternanthera*
260 *philoxeroides* contra as cepas de referências utilizadas neste experimento.

261

262 REFERÊNCIAS

263 ANESE, S. et al. Atividade alelopática de *Ateleia glazioveana* Baill (timbó) sobre *Lactuca*
264 *sativa* L. (alface). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 147-149, 2007.

265 BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, **Regras para análise de**
266 **sementes** / Brasília: Mapa/ACS, 2009. 399 p.

267 BROCHADO, C.O. et al. Flavonol robinobiosides and rutinosides from *Alternanthera*
268 *brasiliiana* (Amaranthaceae) and their effects on lymphocyte proliferation *in vitro*. **Jornal**
269 **Brazil Chemical Society**, v. 14, p. 449-451, 2003.

270 CAETANO, N. et al. Determinação de atividade antimicrobiana de extratos de plantas de uso
271 popular como antiinflamatório. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 132-135,
272 2002.

- 273 CÂNDIDO, A.C.S. et al. Potencial alelopático de lixiviados das folhas de plantas invasoras
274 pelo método sanduíche. **Revista Brasileira de Biociência**, v. 8, p. 268-272, 2010.
- 275 CECHINEL, F.V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos
276 farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. **Química Nova**, v. 21, p. 99-105,
277 1998.
- 278 CUNICO, M.M. et al. Potencial antimicrobiano e alelopático das amidas isoladas do extrato
279 das raízes de *Ottonia martiana* Miq. **Química Nova**, v. 29, p. 746-749, 2006.
- 280 DIAS, J.F.G. **Estudo alelopático aplicado de *Aster lanceolatus*, Willd.** 2005. 47f.
281 Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde,
282 Universidade Federal do Paraná.
- 283 DIAS, J.F.G.; MIGUEL, O.G.; MIGUEL, M.D. Cromatografia gasosa e avaliação da
284 atividade alelopática das frações hexano, diclorometano e acetato de etila de *Aster lanceolatus*
285 willd. (Asteraceae). **Visão Acadêmica**, v. 8, p. 11-19, 2007.
- 286 DIAS, G.; ZUCOLOTO, M.; CALDAS, Z.M. Estresse oxidativo em células vegetais
287 mediante aleloquímicos. **Revista Facultad Nacional de Agronomía**, v. 61, p. 4237-4247,
288 2008.
- 289 ELDEEN, I.M.S. et al. A bioactive compound from the roots of *Terminalia sericea*. **Journal**
290 **of Ethnopharmacology**, v. 103, p. 135-138, 2006.
- 291 FANG, J.B. et al. Antitumor constituents from *Alternanthera philoxeroides*. **Journal of Asian**
292 **natural products research**, v. 9, p. 511-515, 2007.
- 293 FERREIRA, A.G.; AQUILA, M.E.A. Alelopatia: Uma área emergente da ecofisiologia.
294 **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, p. 175-204, 2000.
- 295 FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre,
296 Artmed. 2004. 324 p.

- 297 GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e
298 éticos. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**.
299 Florianópolis/Porto alegre: UFSC/UFRS, 2001. p. 13- 26.
- 300 MACHADO, A.; CONCEIÇÃO, A.R. Programa Estatístico WinStat – **Sistema de Análise**
301 **Estatístico para Windows**. Versão 2.0. Pelotas: UFPEL, 2002.
- 302 MAGIERO, E.C. et al. Efeito alelopático de *Artemisia annua* L. na germinação e
303 desenvolvimento inicial de plântulas de alface (*Lactuca sativa* L.). **Revista Brasileira de**
304 **Plantas Mediciniais**, v. 11, p. 317-324, 2009.
- 305 MAIRESSE, L.A.S. et al. Bioatividade de extratos vegetais sobre alface (*Lactuca sativa* L.).
306 **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, v. 14, p. 1-12. 2007.
- 307 MALHEIROS, A; PERES, M.T.L.P. Alelopatia: interações químicas entre espécies. In:
308 YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal**
309 **moderna**. Chapecó: Ed. Argos, 2001. p. 503-523.
- 310 NASCIMENTO, P.F.C. et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem
311 multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 108-113, 2007.
- 312 SALVADOR, M.J. et al. In vitro antimicrobial activity of crude extracts and isolated
313 constituents of *Alternanthera maritima* (Amaranthaceae). **Pharmaceutical Biology**, v. 42, p.
314 138-148, 2004.
- 315 SALVADOR, M.J.; DIAS, D.A. Flavone C-glycosides from *Alternanthera maritima* (Mart.)
316 St. Hil. (Amaranthaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, p. 107–110, 2004.
- 317 SAMPIETRO, D.A. **Alelopatía: Concepto, características, metodología de estudio e**
318 **importância**. Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes 23p. 2001. Disponível na
319 *internet: <http://fai.unne.edu.ar/biologia/plantas/alelopatia>*. Acessado em dezembro de 2010.
- 320 SOUZA, M.M. et al. Analgesic properties of a hydroalcoholic extrat obtained from
321 *Alternanthera brasiliana*. **Phytotherapy Research**, v. 12, p. 279-281, 1998.

322 PINTO, A.C. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e Perspectivas. **Química Nova**, v.
323 25, p. 45-61, 2002.

324

325

326 **TABELA 1:** Primeira contagem de germinação de sementes de alface submetidas a diferentes
327 concentrações e tipos de extratos de *Alternanthera philoxeroides*

concentração dos extratos (mg L ⁻¹)	Primeira contagem (%)			
	solventes extratores			
	hexano	acetato de etila	butanólico	aquoso
0	100 Aa	100 Aa	100 Aa	100 Aa
1	100 Aa	98,5 Aa	100 Aa	100 Aa
2	100 Aa	98,2 Aa	100 Aa	100 Aa
3	100 Aa	96,5 Bb	100 Aa	99,0 Aa

328 *Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na coluna e minúsculas na linha não diferem estatisticamente pelo
329 teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

330

331

332 **TABELA 2:** Primeira contagem de germinação de sementes de alface submetidas a
333 diferentes tipos de solventes extratores e órgãos de *Alternanthera philoxeroides*

solventes extratores	Primeira contagem (%)	
	órgãos fontes	
	folha	caule
hexano	100 Aa	100 Aa
acetato de etila	96,5 Bb	100 Aa
butanólico	100 Aa	100 Aa
aquoso	99,7 Aa	100 Aa

334 *Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na coluna e minúsculas na linha não diferem estatisticamente pelo
335 teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

336

337

338

339 **TABELA 3:** Germinação de sementes de alface submetidas a diferentes tipos de solventes
 340 extratores e órgãos de *Alternanthera philoxeroides*

solventes extratores	Germinação (%)	
	órgãos fontes	
	folha	caule
hexano	100 Aa	100 Aa
acetato de etila	97,2 Bb	100 Aa
butanólico	100 Aa	100 Aa
aquoso	99,75Aa	100 Aa

341 *Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na coluna e minúsculas na linha não diferem estatisticamente pelo
 342 teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

343

344

345 **TABELA 4:** Índice de velocidade de germinação de sementes de alface submetidas a
 346 diferentes tipos de solventes extratores e órgãos de *Alternanthera philoxeroides*

solventes extratores	Índice de velocidade de Germinação	
	órgãos fontes	
	folha	caule
hexano	26,89 Aa	26,28 ABa
acetato de etila	24,71 Bb	26,81 Aa
butanólico	26,36 ABa	25,72 Ba
aquoso	25,68 Ba	25,51 Ba

347

348 *Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na coluna e minúsculas na linha não diferem estatisticamente pelo
 349 teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

350

351

352

353

354

355 **TABELA 5:** Índice de velocidade de germinação de sementes de alface submetidas a
 356 diferentes concentrações e tipos de extratos de *Alternanthera philoxeroides*

concentração dos extratos (mg mL ⁻¹)	Índice de velocidade de germinação			
	solventes extratores			
	hexano	acetato de etila	butanólico	aquoso
0	28,62 Aa	28,62 Aa	28,62Aa	28,62 Aa
1	27,25 Ba	26,07 Bab	26,25 Bab	25,51 Bab
2	25,92 Bb	25,88 Bb	25, 55 Bb	24,87 Bb
3	24,56 Ca	22,46 Cb	23,71 Cab	23,41 Cab

357

358 *Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na coluna e minúsculas na linha não diferem estatisticamente pelo
 359 teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

360

361

362 **TABELA 6:** Comprimento das radículas de sementes de alface submetidas a diferentes
 363 concentrações e tipos de extratos de *Alternanthera philoxeroides*

concentração dos extratos (mg mL ⁻¹)	Comprimento da radícula (cm)			
	solventes extratores			
	hexano	acetato de etila	butanólico	aquoso
0	2,3 Aa	2,3 Aa	2,3 Aa	2,3 Aa
1	2,1 Ba	1,4 Bb	1,3 Bb	1,5 Bb
2	1,9 Ca	1,3 Bb	1,1 Cc	1,3 BCb
3	1,5 Ca	1,0 Cc	1,0 Cc	1,2 Cb

364

365 *Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na coluna e minúsculas na linha não diferem estatisticamente pelo
 366 teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

367

368

369

370

371 **TABELA 7:** Comprimento das radículas de sementes de alface submetidas a diferentes tipos de
 372 solventes extratores e órgãos de *Alternanthera philoxeroides*

solventes extratores	Comprimento da radícula (cm)	
	órgãos fontes	
	folha	caule
hexano	1,9 Aa	1,9 Aa
acetato de etila	1,4 Cb	1,7 Ba
butanólico	1,5 BCa	1,4 Ca
aquoso	1,7 Ba	1,6 Ba

373
 374 *Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na coluna e minúsculas na linha não diferem estatisticamente pelo
 375 teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

376

377

378

379

380

381

382

1 ARTIGO 3- CIÊNCIA AGRONÔMICA

2 **Características morfológicas e produção de betacianina em apaga-fogo,**
3 **cultivadas *in vitro*, na presença de tirosina**

5 **Influence of tyrosine on morphological characteristics and pigment production plants**

6 ***Alternanthera tenella* Colla *in vitro*.**

7 **KLEINOWSKI, Alírcia Moraes ^{*1}; PETERS, José Antonio²; BRAGA, Eugenia**

8 **Jacira Bolacel²**

9
10 **Resumo** - O cultivo de plantas medicinais *in vitro* possui vantagens como o uso de elicitores
11 da via de biossíntese dos compostos de interesse, proporcionando maior síntese e acúmulo
12 destes produtos naturais. *Alternanthera tenella* Colla (Amaranthaceae) é uma planta medicinal
13 conhecida como apaga-fogo, que possui betacianinas, pigmentos nitrogenados, utilizados
14 como corantes naturais e antioxidantes. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da
15 tirosina sobre as características morfológicas e a produção de betacianina em plantas de *A.*
16 *tenella*, cultivadas *in vitro*. Para tanto, segmentos nodais, foram inoculados em meio MS com
17 diferentes concentrações de tirosina (0; 25; 50 e 75µM). Após 40 dias, foram avaliadas
18 algumas características morfológicas da planta inteira e a quantificação de betacianina na
19 parte aérea das plantas. Todas as características morfológicas avaliadas nas plantas de *A.*
20 *tenella* foram influenciadas negativamente pela presença de tirosina, sendo que a
21 concentração de 75µM foi deletéria para o desenvolvimento das plantas. A rizogênese foi
22 inibida na concentração de 50µM. Em relação à produção de betacianina, na parte aérea das
23 plantas, a presença da tirosina estimulou a síntese desse pigmento nos tratamentos utilizados,

1* Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Biologia, Departamento de Botânica - Pelotas, RS – CEP 354-960010-900, Brasil-Parte da dissertação do primeiro autor, apresentada no Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, com pesquisa financiada pela capes, amk.bio@gmail.com.

2 Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Biologia, Departamento de Botânica - Pelotas, RS – CEP 354-960010-900, Brasil

24 atingindo um valor médio de 36,95mg de amarantina 100g MF¹, na maior concentração.
25 Conclui-se que concentrações altas de tirosina apresentam efeito negativo para o crescimento
26 *in vitro*, porém aumenta a produção de betacianina em plantas de *A. tenella*.

27 **Palavras-chave** - Antioxidante, elicitores, metabólitos secundários, *Alternanthera tenella*

28
29 **Abstract** - The cultivation of medicinal plants in vitro has advantages such as the use of
30 elicitors of the biosynthesis of compounds of interest, providing increased synthesis and
31 accumulation of these natural products. *Alternanthera tenella* (Amaranthaceae) is a medicinal
32 plant known as *joyweed*, which has betacyanins, nitrogenous pigments, used as natural
33 colorants and antioxidants. The aim of this study was to evaluate the influence of tyrosine on
34 morphological characteristics and production betacyanin of plants of *A. tenella*, cultured in
35 vitro. For this, nodal segments, were inoculated on MS medium with different concentrations
36 of tyrosine (0, 25, 50 and 75µM). After 40 days, evaluated some morphological characteristics
37 of the whole plant and quantify betacyanin in the shoots. All morphological characteristics
38 measured in plants of *A. tenella* were affected negatively by the presence of tyrosine, and the
39 concentration of 75µM was totally deleterious to plant development. The rooting was
40 influenced by the presence of amino acid and that the concentration of 50µM no formation of
41 this organ. For the production of betacyanin in the shoots, the presence of tyrosine stimulated
42 the synthesis of this pigment in the treatments, reaching an average of 36.95 mg 100g
43 Amarantina MF¹, the highest concentration. We conclude that high concentrations of tyrosine
44 have a negative effect for growth in vitro, but increases the production betacyanin of plants of
45 *A. tenella*.

46
47 **Key-words** - Antioxidant, elicitors, secondary metabolism, *Alternanthera tenella*

49

50

51 **Introdução**

52 Os produtos naturais oriundos das plantas medicinais possuem um imenso potencial
53 para ser utilizado como fármacos, nutracêuticos e aditivos alimentares (SAVITHA et al.,
54 2006), porém, segundo Charlet et al. (2000) essas plantas bioativas são frequentemente
55 obtidas a partir de coleta predatória e indiscriminada. Assim à produção metabólitos
56 secundários em cultura *in vitro*, torna-se é vantajosa tanto do ponto de vista ecológico como
57 econômico.

58 De acordo com Oliveira (2000) o cultivo de plantas medicinais *in vitro*, abre novas
59 perspectivas de exploração sustentável dos recursos vegetais, através de abordagens
60 biotecnológicas para produção de produtos naturais. Além disso, as técnicas de
61 migropropagação possibilitam uso de precursores ou elicitores abióticos da via de biossíntese
62 dos compostos de interesse, proporcionando maior síntese e acúmulo desse metabólito
63 (SAVITHA et al., 2006; GEORGIEV et al., 2008).

64 *Alternanthera tenella* é uma planta medicinal conhecida como sempre-viva ou apaga-
65 fogo, pertence à família Amaranthaceae, sendo encontrada em todo o Brasil, inclusive em
66 lavouras onde é considerada uma planta invasora (SIQUEIRA, 1995)

67 Estudos da composição química dessas plantas indicam a presença de betalaínas
68 betacianinas, betaxantinas e cromoalcalóides (BROCHADO et al., 2003; SALVADOR;
69 DIAS, 2004).

70 As betalaínas são pigmentos naturais, nitrogenados, solúveis em água, característicos da
71 ordem Caryophyllales (TANAKA et al., 2008). Elas são classificadas em betacianinas
72 (violetas) e betaxantinas (amarela). A biossíntese das betalaínas começa com hidroxilação da
73 tirosina pela enzima tirosina hidroxilase (TOH) e continua por duas vias independentes a da
74 dihidroxifenilalanina (DOPA) e a do ácido betalâmico, esses dois compostos são essenciais
75 para a produção das betacianina e betaxantinas (STRACK et al., 2003; VOLP et al., 2009).

76 As betacianinas têm despertado um enorme interesse na indústria farmacêutica como
77 corantes naturais e biofármacos por possuírem propriedades como antioxidantes e
78 antiinflamatórias (KANNER et al., 2001; TESORIERE et al., 2003; TANAKA et al., 2008).

79 O uso de elicitores ou precursores para o incremento da produção de metabólitos
80 secundários *in vitro* já vem sendo descritos com sucesso em varias espécies como verificado
81 por Berlin et al. (1986), em calos de *Chenopodium rubrum* L. que aumentaram a produção de
82 betalaínas sob a influência da tirosina e do DOPA no meio de cultura. Também foi observado
83 por Silva et al. (2005), em *Alternanthera brasiliana* um aumento na produção de betacianina,
84 em meio MS semi-sólido, contendo tirosina. Este aminoácido também foi utilizado para
85 incrementar a produção de alcaloides em outros cultivos *in vitro* (ROCHA et al., 2005;
86 URMANTSEVA et al., 2005).

87 Em culturas de beterrabas (*Beta vulgaris*) já foram utilizados outros elicitores bióticos e
88 abióticos no intuito de aumentar a síntese de betacianina e os autores relataram resultados
89 promissores (BAIS et al., 2000; SURESH et al., 2004; SAVITHA et al., 2006).

90 Considerando a importância medicinal da betacianina e os resultados satisfatórios
91 obtidos com elicitores em outras espécies, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da
92 tirosina sobre as características morfológicas e a produção de betacianina em plantas de *A.*
93 *tenella*, cultivadas *in vitro*.

94 **Material e métodos**

95 Plantas de *A. tenella* pré-estabelecidas em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962)
96 foram utilizadas como fonte de explantes para a instalação do experimento com diferentes
97 concentrações de tirosina. Foi utilizado meio MS básico, sem reguladores de crescimento,
98 com pH ajustado para 5,8 e após, acrescentado 7g L⁻¹ de ágar . Os frascos contendo 40mL de
99 meio de cultura foram vedados com papel alumínio e autoclavados por 20 minutos a uma
100 temperatura de 121°C a pressão de 1,05 kg cm⁻². Após a autoclavagem, autoclavagem, quatro

101 concentrações de tirosina (0; 25; 50 e 75 μ M), foram solubilizadas em DMSO, filtradas e
102 adicionadas ao meio .

103 Segmentos nodais com aproximadamente 1cm foram inoculados nos meios de cultura,
104 em câmara de fluxo laminar em condições assépticas. Após, os frascos com os explantes
105 foram colocados em sala de crescimento, onde permaneceram sob fotoperíodo de 16 horas e
106 densidade de fluxo de fótons de 48 μ moles m⁻² s⁻¹, com temperatura de 25 \pm 2°C.

107 Após 40 dias foi avaliado o número médio de gemas e brotos, altura, massa fresca da
108 parte aérea, comprimento da raiz principal, massa seca das raízes e quantificação de
109 betacianina da parte aérea das plantas (caule e folhas).

110 A quantificação das betacianinas foi realizada de acordo com a metodologia descrita por
111 Cai et al. (1998), onde a parte aérea foi macerada com celite e acrescida de 5mL de água
112 destilada. O extrato obtido foi colocado em centrífuga a 13632g, a 4°C por 25min, e em
113 espectrofotômetro Ultrospec 2100 Pro da Amersham Biosciences®, foi realizada a leitura da
114 absorvância nos comprimentos de ondas de 536nm e 650nm. A concentração de betacianina
115 foi determinada levando em consideração o coeficiente de extração molar para amarantina
116 (5,66 x 10⁴) e o resultado foi expresso em mg amarantina 100g MF⁻¹.

117 O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com quatro
118 tratamentos (concentrações de tirosina), cada tratamento contendo quatro repetições, sendo
119 cada unidade experimental representada por um frasco contendo quatro explantes. Os
120 resultados foram, submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de
121 Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro, com auxílio do software estatístico WinStat
122 (MACHADO; CONCEIÇÃO, 2002).

123 **Resultados e discussões**

124 A presença do aminoácido tirosina, nos meios de cultura, teve influência negativa sobre
125 as características morfológicas avaliadas nas plantas de *A. tenella*, sendo que a maior

126 concentração deste (75 μ M) foi totalmente deletéria, não permitindo o desenvolvimento dos
127 explantes.

128 Em cultura *in vitro* a concentração do meio mineral e o uso conjunto de aminoácidos
129 com outras fontes de nitrogênio, para cada espécie, podem ser vitais para o seu
130 desenvolvimento (MOHAMED et al., 2004).

131 A presença de altos níveis de nitrogênio orgânico nos meios de cultura, neste trabalho,
132 pode ter dificultado a assimilação de nitrogênio na forma de nitrato que é preferencialmente
133 utilizada pelas plantas e está presente na formulação do meio MS. Essa dificuldade justificaria
134 o déficit no crescimento da parte aérea e raízes e a morte dos segmentos nodais de *A. tenella*
135 na concentração de 75 μ M, já que esse nutriente é essencial no crescimento e desenvolvimento
136 das plantas (TAIZ; ZEIGER, 2009).

137 A formação de novas gemas também foi influenciada negativamente com o aumento das
138 concentrações do aminoácido no meio de cultivo, sendo a menor média obtida na
139 concentração de 50 μ M. O nitrogênio é um constituinte de aminoácidos, nucleotídeos e
140 coenzimas (KANASHIRO et al., 2007), portanto existe relação entre a disponibilidade desse
141 elemento e a formação de novas gemas e brotações (Figura 1a e Figura 1b).

142 Em cultivo de cana-de-açúcar *in vitro* com diferentes fontes de nitrogênio Donato et al.
143 (1999) verificaram que a adição da glutamina (precursora dos demais aminoácidos),
144 combinada ao nitrato do meio de cultivo MS, diminuiu significativamente a altura e a
145 formação de brotos nessa espécie, semelhante ao que foi constatado neste trabalho onde
146 houve um decréscimo na altura das plantas de *A. tenella* (Figura 1c). Em *Pfaffia glomerata*
147 (Amaranthacea) foi observado que o crescimento em altura das brotações dessas plantas foi
148 maior na concentração usual do meio MS, e foi decrescendo à medida que foram aumentadas
149 as concentrações de nitrogênio (RUSSOWSKI; NICOLOSO, 2003).

150 A deficiência da organogênese na plantas de *A. tenella* nos tratamentos utilizados
151 influenciou na biomassa fresca dessas plantas e houve diminuição desta variável com
152 aumento das concentrações de tirosina utilizadas, sendo que a menor média (615mg) foi
153 encontrada no tratamento com 50 μ M de tirosina (Figura 1d). Esses resultados corroboram
154 Silva et al. (2005), que, testando além da tirosina outros fatores no cultivo *in vitro* de *A.*
155 *brasiliiana*, constataram que independente do tratamento utilizado a presença de tirosina no
156 meio de cultura proporcionou os menores valores de massa seca.

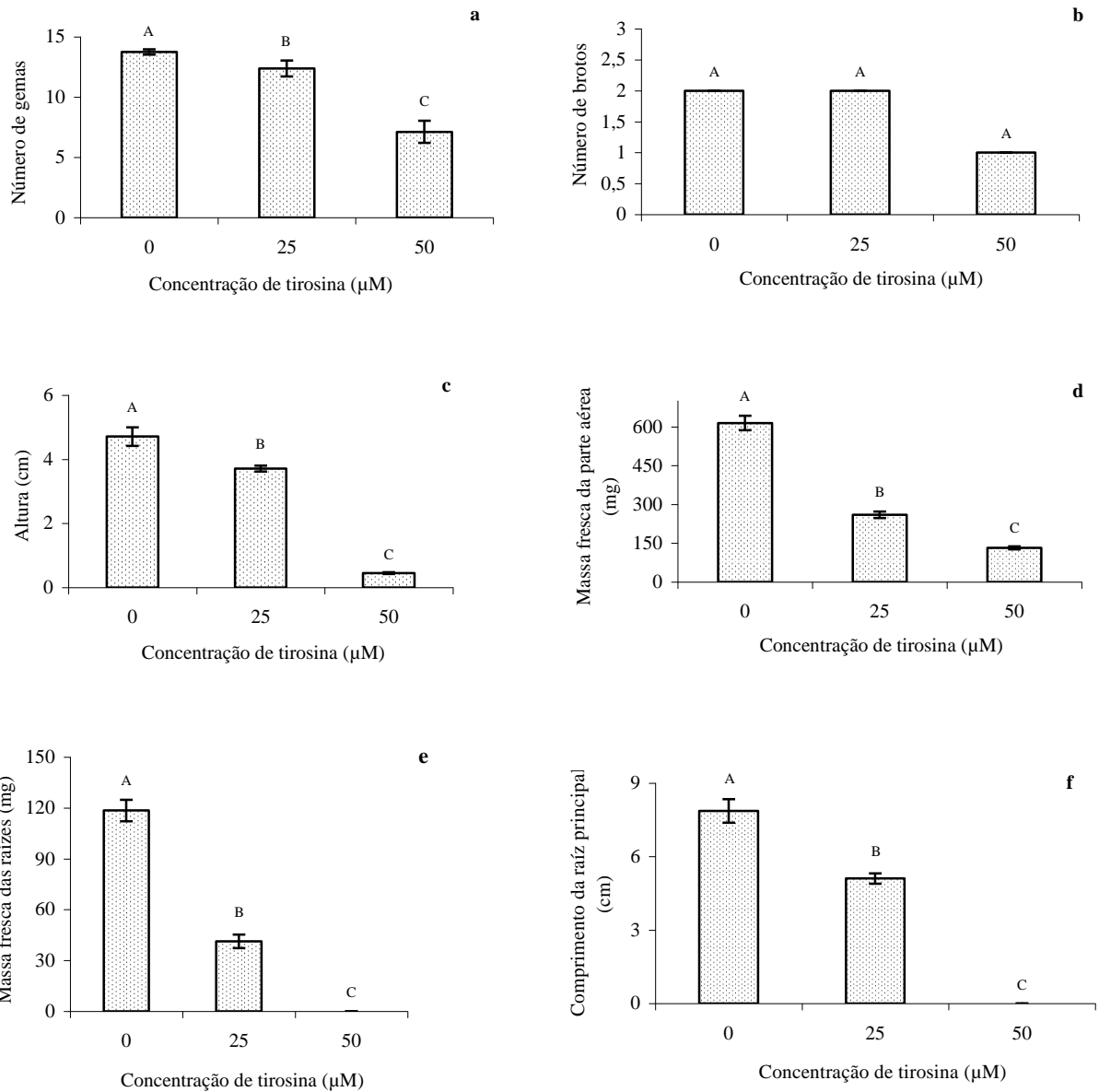
157 Estudos realizados com tirosina e Dopa em cultivos celulares de *Chenopodium rubrum*,
158 verificaram uma diminuição da massa seca celular com a utilização de 15 μ M de tirosina
159 demonstrando que, altos níveis desse aminoácido, podem ser tóxicos para multiplicação
160 celular desta espécie (BERLIN et al., 1986).

161 A rizogênese das plantas de *A. tenella* também foi intensamente alterada com a
162 presença da tirosina no meio de cultivo (Figura 2) sendo que os maiores valores de massa
163 fresca das raízes e do comprimento da raiz principal foi observado nas plantas cultivadas em
164 meio livre de tirosina (Figura 1e e 1f). Resultados semelhantes foram obtidos por Kanashiro
165 et al. (2007) que avaliando diferentes fontes de nitrogênio, constataram um decréscimo no
166 comprimento das raízes de *Aechmea blanchetiana* com o aumento da concentração de
167 nitrogênio no meio de cultivo.

168

169

170



171

172

173

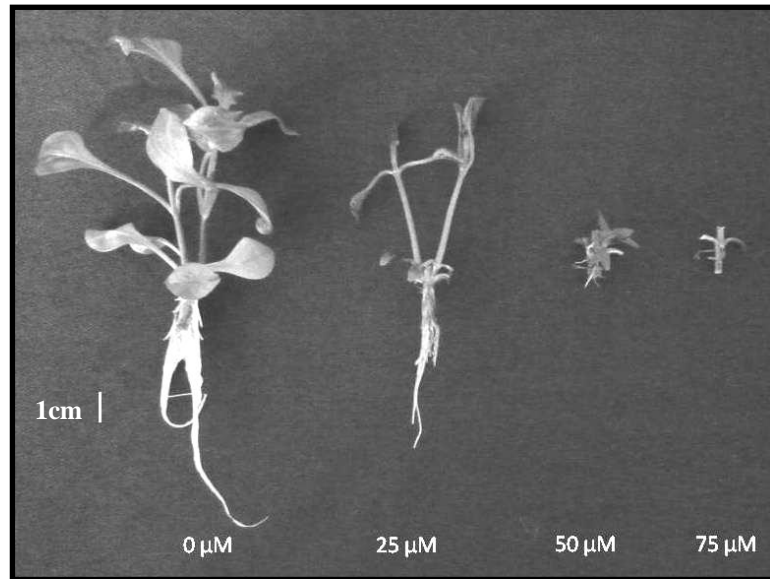
174 **FIGURA 2-** Número de gemas (a), número de brotos (b), altura (c), massa fresca da parte aérea (d), massa fresca
 175 das raízes (e) e comprimento da raiz principal (f) de plantas de *Alternanthera tenella* cultivadas *in vitro* por 40 dias
 176 em meio de cultura com diferentes concentrações de tirosina. Letras iguais não diferem estatisticamente a 5% de
 177 probabilidade pelo teste de TuKey. Barras verticais representam o erro padrão da média de quatro repetições

178

179 É importante salientar que na concentração intermediária de 50 μM , não houve formação
 180 de raízes nos explantes (Figura 1e e Figura 1f), esse acontecimento é justificado por Skrebsky
 181 et al. (2004) que utilizando altas doses de um determinado nutriente afetou negativamente o
 182 enraizamento através do aumento do potencial osmótico do meio, fator sabidamente

183 conhecido como inibidor do desenvolvimento radicular durante o processo de propagação
 184 vegetativa.

185

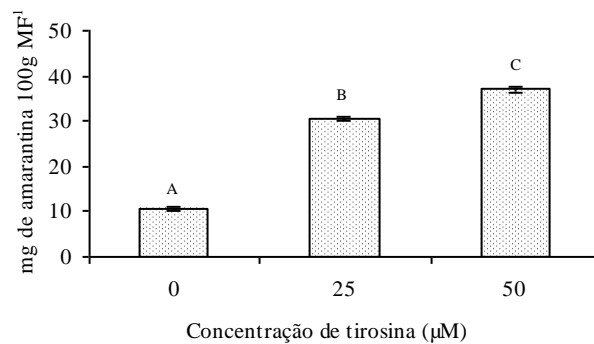


186

187 **FIGURA 2** - Plantas de *Alternanthera tenella* em meio MS com adição de tirosina cultivada por 40 dias.

188

189 Após 40 dias de cultivo ocorreu um incremento significativo no teor de betacianina, na
 190 concentração de 50 μ M de tirosina, atingindo um valor de 36,95mg de amarantina 100g MF⁻¹
 191 (Figura 3).



192

193 **FIGURA 3**- Produção de betacianina em plantas de *Alternanthera tenella*, cultivadas *in vitro*, por 40 dias, em
 194 meio de cultura com diferentes concentrações de tirosina. Letras iguais não diferem estatisticamente a 5% de
 195 probabilidade pelo teste de TuKey Barras verticais representam o erro padrão da média de quatro repetições.

196 A tirosina vem sendo testada como agente elicitador para produção de diversos
197 metabólitos secundários em várias espécies vegetais. Em culturas de calos de *Cereus*
198 *peruvianu* com adição de 1,1M deste aminoácido, foi verificado um aumento na produção dos
199 alcalóides tiramina e hordenina previamente identificados nesta espécie (ROCHA et al.,
200 2005). A tirosina, entre outros aminoácidos, foi testada para promover a elicitação do
201 alcalóide protobarberine no cultivo *in vitro* de *Thalictrum minus*, no entanto, Urmantseva et
202 al. (2005), constataram que este prejudicou a formação de alcalóides, tendo resultados
203 inferiores ao tratamento controle.

204 O incremento da produção de betacianina sob ação elicitora da tirosina já foi relatada
205 com sucesso em alguns trabalhos. Berlin et al. (1986) utilizaram o aminoácido na
206 concentração de 15 μ M em cultura de calos de *Chenopodium rubrum* e verificaram um
207 aumento na produção de betalaínas em 50 a 100%, após 28 dias de cultivo. Já em cultivo *in*
208 *vitro* de plantas de *A. brasiliiana*, por 45 dias, em meio MS acrescido de 10 μ M de tirosina,
209 Silva et al. (2005) constataram que ocorreu aumento na produção desse pigmento com relação
210 ao controle.

211 Outros elicitores também vêm sendo utilizados para incrementar a produção de
212 betalaínas em plantas, Savitha et al. (2006) testaram entre outros elicitores sete diferentes íons
213 metálicos em concentrações até dez vezes maiores do que as presentes no meio MS, esses
214 autores observaram que o cálcio foi o elemento abiótico mais bem sucedido para aumentar a
215 produção de betalaínas, elevando seus níveis em até 47%.

216 Bais et al. (2000) utilizando poliaminas como agentes elicitores dobraram a
217 produtividade de betalaínas em culturas de beterrabas semelhante aos resultados encontrados
218 por Suresh et al. (2004) que utilizando a putrescina e espermidina em biorreatores
219 aumentaram em 1,3 vezes o teor de betalaínas em culturas de *Beta vulgaris*.

220 Esses autores ressaltam que a presença dos elicitores no meio de cultivo pode
221 desencadear respostas no metabolismo secundário das plantas, interagindo com receptores de
222 membrana, além disso, Savitha et al. (2006) ressaltam que fatores estressantes também
223 seriam capazes de ativar genes específicos da maquinaria enzimática envolvida na biossíntese
224 de metabólitos secundários

225 No presente trabalho foi verificado um incremento da produção de betacianina nas doses
226 do aminoácido utilizado, este evento pode estar relacionado tanto ao estresse causado pela
227 presença do elicitor no meio de cultivo como, principalmente, pelo aumento da
228 disponibilidade da tirosina que é substrato inicial para ação da enzima (TOH) que converte a
229 tirosina em DOPA e que, por reações espontâneas, origina as betacianinas.

230

231 **Conclusões**

232 Altas concentrações de tirosina apresentam efeito negativo para o crescimento *in vitro*
233 de *Alternanthera tenella*, afetando a formação da parte aérea e das raízes, porém a adição
234 desse aminoácido ao meio de cultivo aumenta a biossíntese de betacianina nesta espécie.

235

236 **Referências**

237 BAIS, H. P. et al. Influence of polyamines on growth and formation of secondary metabolites
238 in hairy root cultures of *Beta vulgaris* and *Tagetes patula*. **Acta Physiology Plant**, v. 22, p.
239 151–158, 2000.

240 BERLIN, J. et al. Production of betalains by suspension cultures of *Chenopodium rubrum* L.
241 **Plant Cell Tissues Organ Culture**, v. 5, p. 163–174, 1986.

242 BROCHADO, C. O. et al. Flavonol Robinobiosides and Rutinosides from *Alternanthera*
243 *brasiliiana* (Amaranthaceae) and their Effects on Lymphocyte Proliferation *in vitro*. **Jornal**
244 **Brazilian Chemistry**, v. 14, p. 449-451, 2003.

- 245 CAI, Y. et al. Characterization and quantification of betacyanin pigments from diverse
246 *Amaranthus* species. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 46, p. 2063-2070,
247 1998.
- 248 CHARLET, S. et al. Immobilisation of *Solanum chrysotrichum* plant cells with Ca-alginate
249 gel beads to produce an antimycotic spirostanol saponin. **Plant Physiology and**
250 **biochemistry**, v. 8, p. 875-870, 2000.
- 251 DONATO, V. M. T.; ANDRADE, A. G.; CÂMARA, R. T. Variedades de cana-de-açúcar
252 cultivadas *in vitro* com diferentes fontes de nitrogênio. **Scientia Agricola**, v. 56, p. 1289-
253 1292, 1999.
- 254 GEORGIEV, V. et al. Betalain production in plant *in vitro* systems. **Acta physiologic plant**,
255 v. 30, p. 30581-593, 2008.
- 256 KANASHIRO, S. et al. Efeitos de diferentes concentrações de nitrogênio no crescimento de
257 *Aechmea blanchetiana* (Baker) cultivada *in vitro*. **Hoehnea**, v. 34, p. 59-66, 2007.
- 258 KANNER, J.; HAREL, S.; GRANIT, R. Betalains – a new class of dietary cationized
259 antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 5178–5185, 2001.
- 260 MACHADO, A.; CONCEIÇÃO, A. R. **Programa estatístico WinStat Sistema de Análise**
261 **Estatístico para Windows**. Versão 2.0. Pelotas: UFPel, 2002.
- 262 MOHAMED, S. V. et al. *In vitro* plant regeneration via somatic embryogenesis through cell
263 suspension cultures of *Macrotyloma uniflorum* (Lam.). **In Vitro Cellular & Developmental**
264 **Biology Plant**, v. 40 p. 284–289, 2004.
- 265 MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with
266 tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-97, 1962.
- 267 OLIVEIRA, M. M. Aplicações e avanços na área da biotecnologia vegetal. Revista Boletim
268 de Biotecnologia, Sociedade Portuguesa, n. 66, cap. **Biotecnologia Molecular: Avanços e**
269 **Aplicações**, 2000. p. 22-27.

- 270 ROCHA, K. L. et al. Effect of different culture medium components on production of alkaloid
271 in callus tissues of *Cerus peruvianus*. **Acta Scientiarium**, v. 27, p. 37-41, 2005.
- 272 RUSSOWSKI, D.; NICOLOSO, F. T. Nitrogênio e fósforo no crescimento de plantas de
273 ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] cultivadas *in vitro*. **Ciência Rural**,
274 v. 33 p. 57-63, 2003.
- 275 SALVADOR, M. J.; DIAS, D. A. Flavone C-glycosides from *Alternanthera maritima* (Mart.)
276 St. Hil. (Amaranthaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, p. 107–110, 2004.
- 277 SAVITHA, B. C. et al. Different biotic and abiotic elicitors influence betalain production in
278 hairy root cultures of *Beta vulgaris* in shake-flask and bioreactor. **Process Biochemistry**, v.
279 41, p. 50–60, 2006.
- 280 SIQUEIRA, J. C. Phytogeography of brasilian Amaranthaceae. **Pesquisa Botânica**, v. 45, p.
281 5-21, 1995.
- 282 SILVA, N. C. B. et al. Developmental effects of additional ultraviolet a radiation growth
283 regulators and tyrosine in *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze cultured *in vitro*. **Brazilian**
284 **archives of biology and technology**, v. 48, p. 779-786, 2005.
- 285 SKREBSKY, E. C. et al. Sacarose e período de cultivo *in vitro* na aclimatização *ex vitro* de
286 Ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* Spreng. Pedersen). **Ciência Rural**, v. 34, p. 1471-1477,
287 2004.
- 288 STRACK, D.; VOGT, T.; SCHLIEMANN, W. Recent advances in betalain research.
289 **Phytochemistry**, v. 62, p. 247–269, 2003.
- 290 SURESH, B. et al. Polyamine and methyl jasmonate-influenced enhancement of betalaine
291 production in hairy root cultures of *Beta vulgaris* grown in a bubble column reactor and
292 studies on efflux of pigments. **Process biochemistry**, v. 39, p. 2091-2096, 2004.
- 293
- 294
- 295

- 296 TANAKA, Y.; SASAKI, N.; OHMIYA, A. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins,
297 betalains and carotenoids. **The Plant Journal**, v. 54, p. 733–749, 2008.
- 298 TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Trad. SANTARÉM, E. R. et al. 4ª ed. UFV, 220 p,
299 2009.
- 300 TESORIERE, L. et al. Increased resistance to oxidation of betalain-enriched human low
301 density lipoproteins. **Free Radical**, v. 37, p. 689–696, 2003.
- 302 URMANTSEVA, V. V. et al. The Effect of Amino Acids as Components of Nutrient Medium
303 on the Accumulation of Protoberberine Alkaloids in the Cell Culture of *Thalictrum minus*
304 **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 52, p. 388–391, 2005.
- 305 VOLP, A. C. P.; RENHE, I. R. T.; STRINGUETA, P. C. Pigmentos naturais bioativos.
306 **Alimentos e nutrição**, v. 20, p. 157-166, 2009.