

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA VEGETAL



Dissertação

Síntese de betalaínas induzida pela luz em espécies do gênero *Alternanthera*

Andressa Reis

Pelotas, 2013

ANDRESSA REIS

Síntese de betalaínas induzida pela luz em espécies do gênero *Alternanthera*

**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 Fisiologia Vegetal.**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eugenia Jacira Bolacel Braga

Co-orientador: Prof. Dr. Luciano do Amarante

Pelotas, 2013

Banca Examinadora:

Dr^a. Eugenia Jacira Bolacel Braga (Orientadora)

Dr. Leandro Vieira Astarita

Dr^a. Rosa Lía Barbieri

Dr^a. Márcia Vaz Ribeiro (Suplente)

Ao meu marido Rafael
À minha mãe Zenita e irmã Lígiane
Aos meus sogros, Graça e José Antônio, com amor
Dedico

Agradecimentos

A CAPES por me agraciar com uma bolsa de estudos que me possibilitou entrar no brilhante mundo da Fisiologia Vegetal.

À Universidade Federal de Pelotas, em especial ao PPG em Fisiologia Vegetal por me acolher durante estes dois anos de intenso aprendizado para obtenção do grau de Mestre em Fisiologia Vegetal.

À minha orientadora Eugenia Jacira Bolacel Braga, pela compreensão, auxílio, dedicação, puxadas de orelha e força ao longo de todo o processo, foi um enorme privilégio.

Ao meu companheiro, Rafael Freda Reis, sem palavras para descrever tamanho amor, companheirismo, compreensão, amizade e tudo o mais, és o meu chão!

À minha mãe, por SEMPRE me influenciar a estudar, a seguir os meus sonhos, a ir em frente e por ser essa coragem em forma de mãe mais linda do mundo.

À minha irmã Ligiane com quem eu gostaria de ter sido muito mais presente, me fazes uma falta enorme, és o meu orgulho e sempre serás.

Aos meus sogros, Graça e José Antônio, não tenho como agradecer por tudo o que fizeram, fazem e continuarão fazendo por mim, minha gratidão e amor por vocês são eternos.

Ao meu companheirinho de jornada de estudos, o lhasa apsu que mais sabe de fisiologia vegetal no mundo, o meu Zeca.

À Alitcia Kleinowski por ter sido essa parceirona, amiga que a pós-graduação me deu e que eu vou colocar uma glicose e “armazenar” no coração, obrigada por tudo.

Ao meu co-orientador, prof. Luciano do Amarante pela paciência, ensinamentos e “auxílios bioquímicos”.

À minha bolsista do coração, Renata, que incorporou o nosso amor pelos metabólitos secundários.

À Fátima Rosane e à Priscila, que me ajudaram sempre que podiam.

À Letícia Benitez que muito me auxiliou nas estatísticas.

Ao prof. Dr. José A. Peters pelos ensinamentos iniciais na área de biotecnologia vegetal.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica que sempre me acolheram maravilhosamente bem, com um cafezinho amigo, em especial ao Júnior e ao Júlio, minhas enciclopédias bioquímicas.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas pelos ótimos momentos de convivência, alegrias e aprendizado.

Ao pesquisador Fernando Gandia-Herrero por possibilitar os ensaios do HPLC-MS.

À professora Beatriz Rocha por auxiliar na minha volta aos estudos, após anos distante do meio acadêmico.

Por fim, agradeço a todos aqueles que sempre me acolheram com palavras amigas e olhares sinceros, pois isso melhora o dia de qualquer um.

"Grandes descobertas científicas
são realizadas a partir de um olhar profundo
sobre aquilo que se parece óbvio à primeira vista."

Autor desconhecido

RESUMO

REIS, Andressa. **Síntese de betalaínas induzida pela luz em espécies do gênero *Alternanthera***. 2013. 102f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas.

Uma característica de plantas e outros organismos sésseis é a sua capacidade de sintetizar uma enorme variedade de compostos de baixo peso molecular, chamados de metabólitos secundários. Dentre estes compostos, encontram-se as betalaínas, moléculas hidrofílicas de dois tipos: betalaínas vermelho-rosáceas e betaxantinas amarelas. Esses fitoquímicos têm sido amplamente utilizados devido as suas elevadas atividades antioxidantes e eliminadora de radicais livres. A intensidade e qualidade de luz são fatores importantes no crescimento e desenvolvimento vegetal e mudanças específicas na qualidade de luz afetam severamente os parâmetros fisiológicos, morfológicos e bioquímicos das plantas. Dessa maneira o presente trabalho teve o objetivo de avaliar o efeito da qualidade de luz no crescimento e acúmulo de metabólitos secundários de calos e plantas de espécies do gênero *Alternanthera*, assim como o estabelecimento de um protocolo para indução de calogênese destas plantas. As espécies *A. brasiliana*, *A. philoxeroides* e *A. sessilis* tiveram seus explantes, colocadas em meio MS, com diferentes combinações de reguladores de crescimento. No experimento de indução de calogênese foram utilizadas somente plantas de *A. brasiliana*, as quais foram mantidas por 45 dias de cultivo sob luz branca e no segundo experimento, já com o protocolo de indução estabelecido, foram utilizadas as três espécies de *Alternanthera* e os calos mantidos por 40 dias em cultivo sob diferentes qualidades de luz (azul, branco e vermelho). As análises de quantificação das betacianinas em HPLC-MS no experimento com calos de *A. brasiliana* confirmaram que estes apresentam conteúdo expressivo de amarantina e no ensaio com calos de diferentes espécies, a melhor resposta foi observada em plantas de *A. brasiliana* e os entrenós foram considerados os melhores explantes. Os estudos de calos em diferentes qualidades de luz demonstraram que a luz azul induz a produção de betaxantinas e betacianinas glicosiladas. Dessa forma, conclui-se que a qualidade de luz afeta sensivelmente a biossíntese de betacianinas, betaxantinas e flavonoides, assim como os padrões de crescimento em plantas de *Alternanthera*.

Palavras chave: Plantas medicinais, betacianina, flavonoides, calos, cultura de tecidos.

ABSTRACT

REIS, Andressa. **Betalains synthesis induced by light in *Alternanthera* genus species**. 2013. 102p. Dissertation (Masters) – Graduation Program in Vegetal Physiology. Federal University of Pelotas.

A characteristic of plants and other sessile organisms is their ability to synthesize a wide variety of low molecular weight compounds, called secondary metabolites. Among these compounds are the betalains, hydrophilic molecules of two types: red-violet betalains and yellow betaxanthins. These phytochemicals have been widely used because of their high antioxidant activity and free radicals scavenging. The light intensity and quality are important factors in plant growth and development and specific changes in light quality severely affect physiological, morphological and biochemical plant parameters. Thus, the aim of the present study was to evaluate the effect of light quality on growth and accumulation of secondary metabolites from callus and plant species of the genus *Alternanthera*, as well as a protocol establishment for callus induction of these plants. The species *A. brasiliana*, *A. philoxeroides* and *A. sessilis* had their explants placed on MS medium with different combinations of growth regulators. In the experiment of callus induction only plants of *A. brasiliana* were used, which were maintained for 45 days of culture under white light and in the second experiment, with the induction protocol already established, were used the three species of *Alternanthera* and the callus maintained in culture for 40 days under different light qualities (blue , white and red). The analysis to quantify betacyanin in HPLC-MS on experiment in *A. brasiliana* callus confirmed that they have expressive content of amaranthin and on calluses of different species experiment, the best response was observed in *A. brasiliana* plants and the internodes were considered the best explants. Studies of callus in different light qualities demonstrated that blue light induces the production of glycosylated betacyanin and betaxanthins. Thus, it is concluded that the quality of light significantly affects the biosynthesis of betacyanin, betaxanthins and flavonoids, as well as the growth patterns of *Altemanthera* plants.

Key-words: Medicinal plants, betacyanin, flavonoids, callus, tissue culture.

Sumário

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO GERAL..... | 12 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA..... | 14 |
| 2.1 Plantas medicinais | 14 |
| 2.2 <i>Alternanthera</i> | 14 |
| 2.3 Betalaínas | 16 |
| 2.4 Cultura de tecidos | 16 |
| 2.5 Elicitor | 17 |
| 3. REFERÊNCIAS | 19 |
| ARTIGO 1 –Revista de la Facultad de Agronomía – La Plata..... | 24 |
| Resumo:..... | 24 |
| Abstract: | 25 |
| 1. INTRODUÇÃO:..... | 25 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS | 28 |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 30 |
| 4. CONCLUSÕES..... | 37 |
| 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 37 |
| Figuras | 46 |
| ARTIGO 2: REVISTA BRASILEIRA DE PLANTAS MEDICINAIS | 52 |
| RESUMO:..... | 52 |
| ABSTRACT: | 53 |
| Referência Bibliográfica: | 65 |
| ARTIGO 3 – Journal of Integrative Plant Biology | 71 |
| Resumo:..... | 71 |

| | |
|----------------------------------|----|
| Introdução | 71 |
| Resultados | 74 |
| Discussão..... | 85 |
| Material e métodos..... | 91 |
| Agradecimentos | 97 |
| Referências bibliográficas | 97 |

1. INTRODUÇÃO GERAL

Desde os primórdios da humanidade, os metabólitos secundários presentes nas plantas têm sido utilizados pelos seres humanos para tratar infecções, distúrbios de saúde e doenças. Somente nos últimos 100 anos, os produtos naturais têm sido substituídos parcialmente pelas drogas sintéticas, porém, as estruturas vegetais levam vantagem em muitos casos (KARUPPUSAMY, 2009).

Do ponto de vista farmacológico, a ordem Caryophyllales apresenta moléculas singulares, chamadas betalaínas, uma classe de metabólitos secundários que substituem as antocianinas na maioria das famílias destas angiospermas. As betalaínas são pigmentos nitrogenados hidrossolúveis ou cromoalcaloides, que são compostas por betacianinas vermelho-rosáceas e betaxantinas amarelas. São imônio conjugados do ácido betalâmico com a *cyclo*-DOPA e aminoácidos ou aminas, respectivamente (HILOU; MILLOGO-RASOLODIMBY; NACOULMA, 2013). Esses pigmentos apresentam uma forte atividade antioxidante e podem ser utilizados como antioxidantes ou colorantes naturais alimentícios, impulsionando trabalhos nesta área (CAI et al., 2003).

Pesquisas com o objetivo de sintetizar quimicamente estes compostos já foram realizadas e não apresentaram resultados promissores, devido ao fato de a sua síntese apresentar múltiplos passos na síntese do ácido betalâmico e consequentemente baixo rendimento (GANDIA-HERRERO et al., 2006). Dessa maneira, a cultura de tecidos e células é uma alternativa atrativa como fonte de substâncias bioativas de plantas, incluindo os pigmentos betalâmicos (RAO; RAVISHANKAR, 2002).

Pensando nisso, as abordagens biotecnológicas, em especial a cultura de células e tecidos, pode ser uma alternativa a essas tecnologias clássicas que apresentam produção industrial limitada pelo meio ambiente ou influências geográficas, (RAO; RAVISHANKAR, 2002). Essa técnica apresenta um papel essencial nas pesquisas para a produção de compostos medicinais desejáveis das plantas, oferecendo muitas vantagens frente o cultivo convencional, como por exemplo, a planta ou órgão são cultivados em ambiente asséptico, com condições controladas, sem variações nas propriedades do clima ou do solo (VANISREE et al., 2004).

A família Amaranthaceae, é composta por espécies com capacidade de armazenar metabólitos secundários de grande interesse e diversidade química (SALVADOR; DIAS, 2004), como compostos anti-inflamatórios, imunomodulatórios, antitumorais, antimicrobianos e antioxidantes (BROCHADO et al., 2003). Alguns estudos fitoquímicos realizados com espécies do gênero *Alternanthera* demonstraram a presença de pigmentos flavonoídicos, cromoalcaloides, antraquinonas, betalaínas, saponinas, triterpenos e esteroides, compostos responsáveis por atividades medicinais variadas (SILVEIRA, 2000).

Uma grande variedade de estímulos (químicos e físicos) é capaz de desencadear mudanças na célula vegetal, que em última análise, resultam na formação e acumulação de metabólitos secundários. A luz afeta a biossíntese de betalaínas em todos os tipos de sistemas de plantas *in vitro* e vários estudos relatam maior acúmulo de betacianinas e amarantina quando as mudas são cultivadas na luz com relação ao escuro, quando calos verdes foram expostos à luz, iniciaram a formação de massas celulares com segmentos de coloração vermelha (GIROD; ZRYD, 1987). Algumas vezes, este incremento dos metabólitos por meio do efeito que a luz proporciona, depende da qualidade ou da quantidade de luz incidida no tecido.

Desse modo, a presente dissertação está dividida em três artigos: o primeiro investiga a influência da qualidade de luz no crescimento e metabólitos secundários de *Alternanthera brasiliana*, *Alternanthera philoxeroides*, *Alternanthera sessilis* e *Alternanthera tenella*, o segundo avalia a indução de calogênese em plantas de *Alternanthera brasiliana*, *Alternanthera philoxeroides* e *Alternanthera sessilis*, enquanto o terceiro busca esclarecer os possíveis efeitos resultantes das diferentes qualidades luminosas quando incididas em calos de *Alternanthera brasiliana* no período de crescimento.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Plantas medicinais

Os fitoterápicos têm sido usados desde épocas antigas como medicamentos para o tratamento de uma ampla gama de doenças, sendo que em muitas comunidades e grupos étnicos o conhecimento acerca de plantas medicinais representa algumas vezes o único recurso terapêutico disponível (LOPEZ, 2006).

As plantas apresentam uma via metabólica primária, onde são produzidos compostos como açúcares, proteínas, lipídeos, RNA, DNA, entre outros e a via secundária, na qual há produção de compostos chamados metabólitos secundários. Os metabólitos secundários de plantas podem ser definidos como compostos que têm um papel importante na interação da planta com o seu ambiente, sendo produzidos para atrair polinizadores e dispersar sementes, como sinais de comunicação entre plantas e microrganismos simbióticos ou para proteção contra a luz UV e outros estresses físicos (WINK, 2003, 2008). A sua distribuição nas plantas é muito mais restrita do que o de metabolitos primários, apresentando produção geralmente baixa (menos de 1% da massa seca), e que depende grandemente da espécie, estágio fisiológico e desenvolvimento da planta (SMETANSKA, 2008).

Devido às suas grandes atividades biológicas, os produtos da via secundária têm sido utilizados há séculos na medicina tradicional. Hoje em dia, eles correspondem a compostos valiosos, tais como produtos farmacêuticos, cosméticos, química fina, ou, mais recentemente, nutracêuticos. Estudos têm demonstrado que nos países ocidentais, em que a química é a espinha dorsal da indústria farmacêutica, 25% das moléculas utilizadas são de origem vegetal natural (BOURGAUD et al., 2001)

2.2 *Alternanthera*

Entre as famílias existentes na flora brasileira produtoras de betalaínas tem-se a Amaranthaceae, que apresenta espécies capazes de acumular substâncias naturais com grande diversidade de constituintes químicos (SALVADOR; DIAS, 2004; TOMEI, 2008) e dentre esta, as espécies do gênero *Alternanthera* merecem destaque, pela ocorrência de alcaloides, antraquinonas, cumarinas, esteroides, pigmentos das classes das betalaínas (betacianinas e betaxantinas), ecdisteroides, terpenoides, flavonoides, saponinas e sapogeninas (FERREIRA; DIAS, 2000;

BROCHADO et al., 2003; SALVADOR; DIAS, 2004; CANALES; MARTINEZ et al., 2005; SALVADOR et al., 2006).

Alternanthera brasiliana (L.) Kuntze, popularmente conhecida como penicilina, apresenta ampla distribuição de exemplares na América do Sul (DELAPORTE et al., 2005). É uma planta herbácea, perene, empregada na medicina tradicional para o tratamento de infecções (BROCHADO et al., 2003), possui atividade analgésica, conforme estudos de Souza et al. (1998) e Macedo et al. (2004). Apresenta atividade inibitória da proliferação de linfócitos humanos *in vitro* (BROCHADO et al., 2003) e atividade antioxidante, sem evidências de correlação entre teores de polifenóis e essa atividade (PEREIRA, 2007).

Alternanthera philoxeroides (Mart.) Grisebach, popularmente conhecida como erva de jacaré, é uma dicotiledônea anfíbia, nativa da América do Sul, que invade habitats terrestres e aquáticos nos Estados Unidos, Austrália, China e outros países (BUCKINGHAM, 2002; GENG et al., 2007). Possui grande tolerância à seca, à salinidade (400mM NaCl), ao frio, à cátions de metais pesados e uma faixa ampla de pH (3-12). (WANG; LI; WANG, 2005; WANG; QIN, 2006; LIU et al., 2007; GAO et al., 2008). *A. philoxeroides* possui em seus extratos flavonoides glicosilados, saponinas e betalainas. Suas utilizações na medicina popular são como antialérgico, diurético, antipirético e antiulceroso, além de demonstrar comprovada ação antitumoral e antiviral *in vitro*, contra o vírus da Síndrome de Imuno Deficiência Adquirida, AIDS (JIANG; LUO; KUANG, 2005; FANG et al., 2007; RATTANATHONGKOM et al., 2009,).

Alternanthera sessilis (L.) R. Br. ex DC. violácea ou rubra, como é conhecida popularmente, é uma planta invasiva de áreas agrícolas, nativa do Brasil, com preferência por regiões úmidas, mas pode ocorrer em terras altas e sobreviver em uma variedade de condições de solo, em regiões tropicais e subtropicais do mundo todo (SCHER, 2004; GUNASEKERA, 2008). Apresenta efeito hepatoprotetor (LIN et al., 1994), esteróis com atividade cicatrizante (JALALPURE et al., 2008) e é uma potencial fonte de antioxidantes naturais. Foi observado um incremento da sua atividade antioxidante com o aumento da concentração do seu conteúdo de flavonoides e fenóis (BORAH; YADAV; UNNI, 2011).

Alternanthera tenella Colla, é uma planta herbácea, conhecida como apaga-fogo, frequentemente encontrada no norte do Brasil (GUERRA et al., 2003). Apresenta atividade antibacteriana, antifúngica e antiparasitária (*Trypanosoma cruzi* e *Leishmania*

amazonensis) (SALVADOR et al., 2003; SALVADOR, 2005); ação imunomoduladora e anti-inflamatória (BIELLA et al., 2008) e redutora de células tumorais (GUERRA et al., 2003). Salvador et al. (2006) testou a capacidade antioxidante do extrato, frações e compostos isolados de *A. tenella* que demonstraram atividade antioxidante *in vitro*. Com base nos estudos acima citados, acredita-se que *A. brasiliensis*, *A. philoxeroides*, *A. sessilis* e *A. tenella* são plantas potenciais para estudos sobre o efeito positivo ou negativo da luz no conteúdo de betacianinas.

2.3 Betalaínas

As betalaínas são pigmentos de plantas com características hidrossolúveis e compostas por nitrogênio, cuja gama de cores vai desde o amarelo até o magenta. Como as antocianinas elas servem como atratores ópticos para polinizadores e dispersão de sementes. A sua produção é induzida pela radiação UV em *Mesembryanthemum crystallinum* L. e por infecção viral em *Beta vulgaris* L., sugerindo que estas moléculas atuem como radioprotetoras e antivirais. O recente aumento do interesse nas betalaínas decorre de suas propriedades médicas e farmacológicas quimicamente desejáveis: são quimicamente estáveis em um longo intervalo de pH, mais amplo do que as antocianinas, são potentes antioxidantes, e que têm atividade anti-inflamatória e anticarcinogênica (PAVOKOVIC; KRSNIK-RASOL, 2011)

As betalaínas dividem-se em dois grupos estruturais, as betacianinas (compostos vermelhos ao vermelho violeta) e as betaxantinas (compostos de coloração amarela) (CAI; SUN; CORKE, 2005). Dentre suas propriedades funcionais, as betalaínas são identificadas como antioxidantes naturais (VOLP; RENHE; STRINGUETA, 2009); promovem a proteção da partícula do LDL-colesterol contra modificações oxidativas (TESORIERE et al., 2004); devido às suas propriedades antioxidantes atuam na prevenção de alguns tipos de câncer (pele e fígado); agem como antivirais e antimicrobianas (DAVIES, 2004; STINTZING; CARLE, 2004; VOLP; RENHE; STRINGUETA, 2009).

2.4 Cultura de tecidos

Existem limitações que devem ser superadas para que os compostos derivados das plantas possam ser utilizados para fins medicamentosos, tais como: a pequena quantidade do princípio ativo no extrato da planta; a separação do composto desejado, que é de alto custo financeiro; a concentração do metabólito

desejado que depende, na maioria das vezes, das condições climáticas e fisiológicas das plantas e o fato de algumas espécies vegetais serem endêmicas e crescerem em lugares geograficamente ou politicamente inacessíveis (TOMEI, 2008).

Uma alternativa que pode contribuir para a solução de algumas dessas dificuldades pode ser o uso da cultura de células e tecidos vegetais, que apesar de apresentar certos empecilhos (condições de meios de cultivo; balanço entre reguladores de crescimento; reprodutibilidade à planta *in natura*) apresentam como vantagens: condições de crescimento controladas, o que resulta em reprodutibilidade no rendimento do produto final desejado; potencialidade de ampliação de escala e pelo fato de que a produção de metabólitos *in vitro* não é afetada por variações ambientais (cheias, secas, etc.), localização geográfica, ataque de patógenos; admissão do uso de precursores exógenos e estimuladores ou indutores (físicos, químicos e biológicos) da biossíntese de substâncias micromoleculares (VALLE, 2003; TOMEI, 2008).

2.5 Elicitor

Elicitores são compostos ou estímulos que aumentam a produção de metabólitos secundários em plantas cultivadas. São classificados como bióticos e abióticos, os primeiros têm origem biológica, sendo derivados de patógenos ou da própria planta e os elicitores abióticos não tem origem biológica e são agrupados em fatores físicos e compostos químicos (VASCONSUELO; BOLAND, 2007). Estes estímulos, tanto bióticos quanto abióticos vêm sendo amplamente empregados em cultura de tecidos vegetais, com o intuito de maximizar a produção de compostos químicos de interesse. A submissão de plantas a meios contendo elicitores tem sido apontada como estimulador da biossíntese de metabólitos secundários incluindo terpenos, flavonoides, alcaloides, betacianinas e fenilpropanoides, entre outros (BHUIYAN; ADACHI, 2003; ZHAO et al., 2005).

Uma grande variedade de estímulos (químicos e físicos) é capaz de desencadear mudanças na célula vegetal, que em última análise, resultam na formação e acúmulo de metabólitos secundários. Como fatores físicos, a luz é especialmente importante para a produção de betalaínas, conforme visto em trabalhos realizados com beterraba (GIROD; ZRYD, 1987; SHIN et al., 2003) e

Suaeda salsa (WANG et al., 2006). Zhao et al. (2010) demonstraram que a qualidade e quantidade de luz afetam a síntese de betacianinas.

3. REFERÊNCIAS

- BHUIYAN, N. H.; ADACHI, T. Stimulation of betacyanin synthesis through exogenous methyl jasmonate and other elicitors in suspension-cultured cells of *Portulaca*. **Journal Plant Physiology**, v.160, p.1117-1124, 2003.
- BIELLA, C. A.; SALVADOR, M. J.; DIAS, D. A.; BARUFFI, M. D.; CROTT, L. S. P. Evaluation of immunomodulatory and anti-inflammatory effects and phytochemical screening of *Alternanthera tenella* Colla (Amaranthaceae) aqueous extracts. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.103, p.569-577, 2008.
- BORAH, A.; YADAV, R.N.S.; UNNI, B.G. *In vitro* antioxidant and free radical scavenging activity of *Alternanthera sessilis*. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v.2, p.1502-1506, 2011.
- BOURGAUD, F.; GRAVOT, A.; MILESI, S. GONTIER, E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Science**, v.161 p. 839– 851, 2001.
- BROCHADO, C. O.; ALMEIDA, A. P.; BARRETO, B. P.; COSTA, L. P.; RIBEIRO, L. S.; PEREIRA, R. L. da C.; GONÇALVES-KOATZ, V. L.; COSTA, S. S. Flavonol robinobiosides and rutinosides from *Alternanthera brasiliiana* (Amaranthaceae) and their effects on lymphocyte proliferation *in vitro*. **Journal Brazilian Chemistry Society**, v.14, p.449-451, 2003.
- CAI, Y. Z.; SUN, M.; CORKE, H. Characterization and application of betalain pigments from plants of the *Amaranthaceae*. **Trends Food Science Technology**, v.16, p.370-376, 2005.
- CAI, Y.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidante activity of betalains from plants of the *Amaranthaceae*. **Journal Agriculture Food and Chemistry**, v.51, p.2288-2294, 2003.
- DAVIES, K.M. **Plant pigments and their manipulation**. Annual Plant Reviews, v.12, Oxford/Boca Raton: Black-well Publishing, 2004, 352p.
- DELAPORTE, R. H.; GUZEN, K. P.; TAKEMURA, O. S.; MELLO, J. C. P. Estudo mineral das espécies vegetais *Alternanthera brasiliiana* (L.) Kuntze e *Bouchea fluminensis* (Vell) Mold. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, p.133-136, 2005.
- FANG, J. B.; JIAB, W.; GAO, W. Y.; YAO, Z.; TENGA, J.; ZHAO B, A. H.; DUANA, H. Q. Antitumor constituents from *Alternanthera philoxeroides*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v.9, p.511-515, 2007.
- FERREIRA, E. O.; DIAS, D. A. A methylenedioxyflavonol from aerial parts of *Blutaparon portulacoides*. **Phytochemistry**, v.53, p.145-7, 2000.

GANDÍA-HERRERO, F., GARCÍA-CARMONA, F., ESCRIBANO, J. Development of a protocol for the semi-synthesis and purification of betaxanthins. **Phytochemical Analysis**, v.17, p.262–269, 2006.

GAO, J. M.; XIAO, Q.; DING, L. P.; CHEN, M. J.; YIN, L.; LI, J. Z.; ZHOU, S. Y.; HE G. Y. Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in *Alternanthera philoxeroides* and *Oryza sativa* subjected to drought stress. **Plant Growth Regulation**, v. 56, p.89–95, 2008.

GENG, Y. P.; PAN, X. Y.; XU, C. Y.; ZHANG, W. J.; LI, B.; CHEN, J. K.; LU, B. R.; SONG, Z. P. Phenotypic plasticity rather than locally adapted ecotypes allows the invasive alligator weed to colonize a wide range of habitats. **Biological Invasions**, v.9, p.245-256, 2007.

GIROD, P. A., ZRYD, J. P. Isolation and culture of betaxanthins and betacyanins producing cells of red beet (*Beta vulgaris* L). **Experientia**, v.43, p. 660–661, 1987.

GUERRA, R. N. M.; PEREIRA, H. A. W.; SILVEIRA, L. M. S.; OLEA, R. S. G. Immunomodulatory properties of *Alternanthera tenella* Colla aqueous extracts in mice. **Brazilian Journal Of Medical and Biological Research**, v.36, p. 1215-1219, 2003.

GUNASEKERA, L. **Sessile joyweed (*Alternanthera sessilis*): a popular leafy vegetable in South East Asia but federal noxious weed in USA**. Department of Primary Industries, Catchment and Agriculture Services, Frankston Centre, 40 Ballarto Road, Frankston, Victoria 3199, Australia. Sixteenth Australian Weeds Conference, 2008.

HILOU, A.; MILLOGO-RASOLODIMBY, J.; NACOUUMA, O. G. Betacyanins are the most relevant antioxidant molecules of *Amaranthus spinosus* and *Boerhavia erecta*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, n.11, p. 645-652, 2013.

JALALPURE, S. S.; AGRAWAL, 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.141-144, 2008.

JIANG, W. L.; LUO, X. L.; KUANG, S. J. Effects of *Alternanthera philoxeroides* Griseb. against dengue virus *in vitro*. **Journal of First Military Medical University**, v. 25, p.454-456, 2005.

KARUPPUSAMY, S. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ and cell cultures. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 3, n.13, p. 1222-1239, 2009.

LIN, S. C.; LIN, Y. H.; SHYUU, S. J.; LIN, C. C. Hepatoprotective effects of Taiwan folk medicine – *Alternanthera sessilis* on liver damage induced by various hepatotoxins. **Phytotherapy Research**, v.8, p.391-398, 1994.

LIU, J. G.; DONG, Y.; XU, H.; WANG, D. K.; XU, J. K. Accumulation of Cd, Pb and Zn by 19 wetland plant species in constructed wetland. **Journal Hazard Mater**, v.147, p.947–953, 2007.

LOPEZ, C. A. A. Considerações gerais sobre plantas medicinais. **Ambiente: Gestão e Desenvolvimento**, v.1, p.19-27, 2006.

MACEDO, A. F.; LAGE, C. L.; ESQUIBEL, M. A.; SOUZA, M. M.; SILVA, K. L.; NIERO, R.; CECHINEL-FILHO, V. Preliminary phytochemical and pharmacological studies on plantlets of *Alternanthera brasiliana* cultured under different spectral quality of lights. **Acta Farm. Bonaerense**, v.23, p.515-519, 2004.

PAVOKOVIC, D.; KRSNIK-RASOL, M. Complex biochemistry and biotechnological production of betalains. **Food Technology and Biotechnology**, v.49, n. 2, p. 145–155, 2011.

PEREIRA, D. F. **Morfoanatomia e histoquímica comparativa entre *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze e *Alternanthera dentata* (Moench) Stuchlik; estudo fitoquímico e biológico de *Alternanthera brasiliana***. 2007, p.111. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Santa Maria Santa Maria.

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.; LEE, J. B.; HAYASHI, T.; SRIPANIDKULCHAI, B. O. Inhibitory effect on nitric oxide production of raw macrophage cell of an active compound from *Alternanthera philoxeroides*. **Khon Kaen University Research Journal**, v.9, p.9-16, 2009.

SALVADOR, M. J. **Estudo químico, biológico e biotecnológico de *Alternanthera maritima* e *Alternanthera tenella* (Gomphreneae, Amaranthaceae)**. 2005. 407p Tese (Doutorado) Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo.

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.

SALVADOR, M. J.; FERREIRA, E. O.; MERTENS-TALCOTT, S. U.; WHOCELY, V. C.; BUTTERWECK, V.; DERENDORF, H.; DIAS, D. A. Isolation and HPLC quantitative analysis of antioxidant flavonoids from *Alternanthera tenella* Colla. **Verlag der Zeitschrift für Naturforschung**, v.61, p.19-25, 2006.

SALVADOR, M. J.; FERREIRA, J. C.; ZULETA, L. M. C.; BOLZANI, V. S.; DIAS, D. A.; CANDIDO, R. C. Antifungal susceptibility tests of crude extracts from *Alternanthera maritima*, *A. tenella* Colla and *Calycophyllum spruceanum* Benth against four *Candida* ssp determined by agar-well diffusion and Broth macrodilution methods. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.39, p.240, 2003.

SHIN, K. S.; MURTHY, H. N.; HEO, J. W.; PAEK, K. Y. Induction of betalain pigmentation in hairy roots of red beet under different radiation sources. **Biologia Plantarum**, v.47, p.149–152, 2003.

SILVEIRA, L. M. S. **Caracterização fitoquímica, biológica e mineral de partes aéreas de *Alternanthera tenella* Colla (Amaranthaceae)**. 2000. 134 f. Dissertação (Mestrado em Química)-Universidade Federal do Maranhão, São Luiz, MA.

SMETANSKA, I. Production of secondary metabolites using plant cell cultures. **Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology**, v.111, p.187–228, 2008.

SOUZA, M. M.; KERN, P.; FLORIANI, A. E. O.; CECHINEL-FILHO, V. Analgesic properties of a hydroalcoholic extract obtained from *Alternanthera brasiliana*. **Phytotherapy Research**, v.12, p.279–281, 1998

STINTZING, C. F.; CARLE, R. Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. **Trends in Food Science & Technology**, v.15, p.19-38, 2004.

TESORIERE, L.; ALLEGRA, M.; BUTERA, D.; LIVREA, M.A. Absorption, excretion, and distribution of dietary antioxidant betalains in LDLs: potential health effects of betalains in humans. **American Journal of Nutrition**, v.80, n.4, p.941-945, 2004.

TOMEI, R. R. **Prospecção de antioxidantes em *Alternanthera marítima* (planta *in natura* e obtida por cultura de células), Brasil**. 2008. 123f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)- Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba

VALLE, R. C. S. C. **Estratégias de cultivo de células de pimenta longa (*Piper hispidinervium*) e determinação de parâmetros cinéticos**, Brasil. 2003. 184f. Tese de doutorado, Departamento Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina.

VANISREE, M., LEE, C. Y., LO, S. F., NALAWADE, S. M., LIN, C. Y., TSAY, H. S. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v.45, p.1–22, 2004.

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.

VOLP, A. C. P.; RENHE, I. R. T.; STRINGUETA, P. C. Pigmentos naturais bioativos. **Alimentos e Nutrição**, v.20, n.1, p.157-166, 2009.

WANG, B. R.; LI, W. G.; WANG, J. B., Genetic diversity of *Alternanthera philoxeroides* in China. **Aquatic Botany**, v.81, p.277–283, 2005.

WANG, C. Q.; ZHAO, J. Q.; CHEN, M.; WANG, B. S. Identification of betacyanin and effects of environmental factors on its accumulation in halophyte *Suaeda salsa*. **Journal of Plant Physiology and Molecular Biology**, v.32, n.2, p.195-201, 2006.

WANG, X. S.; QIN, Y. Removal of Ni (II), Zn (II) and Cr(VI) from aqueous solution by *Alternanthera philoxeroides* biomass. **Journal of Hazardous Materials**, v.138, p.582–588, 2006.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. **Phytochemistry**, v.64, n.1, p.3-19, 2003.

WINK, M. Plant secondary metabolism: Diversity, function and its evolution. **Natural Products Communications**, v.3, n.8, p.1205-1216, 2008.

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

ZHAO, S. Z.; SUN, H. Z.; CHEN, M.; WANG, B. S. Light-regulated betacyanin accumulation in euhalophyte *Suaeda salsa* calli. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v.102, p.99-107, 2010.

ARTIGO 1 –Revista de la Facultad de Agronomía – La Plata
Qualidade de luz no crescimento *in vitro* e produção de pigmentos em espécies do
gênero *Alternanthera*

Resumo:

Em cultura de tecidos, vários fatores químicos e fisiológicos influenciam na produção de metabólitos secundários. As respostas de crescimento e incremento de metabólitos secundários, geradas pelo ambiente luminoso, podem ser utilizadas para a determinação de um habitat favorável para o cultivo e conservação de plantas medicinais. Dessa maneira, o presente trabalho buscou avaliar a influência da qualidade de luz no crescimento e produção de metabólitos secundários em plantas de *Alternanthera sessilis* (L.) R. Br. ex DC. (violácea), *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Grisebach (erva-de-jacaré), *Alternanthera tenella* Colla (apaga-fogo) e *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze (doril, perpétua-do-Brasil), cultivadas *in vitro*. As espécies foram cultivadas em meio MS, durante 45 dias, em distintas qualidades de luz (branca, azul e vermelha). Parâmetros de crescimento e análises bioquímicas foram realizados ao final deste estudo. Assim, de acordo com os resultados obtidos, a luz vermelha permitiu o maior acúmulo de biomassa para a maioria das espécies, as lâmpadas vermelhas e brancas foram ótimas indutoras da produção de betacianinas e o incremento de flavonoides foi favorecido na luz azul. Dessa forma, a qualidade de luz afeta a síntese de betacianinas, betaxantinas e flavonoides, assim como os padrões de crescimento em *Alternanthera* e com base nos dados apresentados, sugere-se que as qualidades de luz codificam genes específicos da produção dos pigmentos, que apresentam diferentes padrões de ativação nas distintas espécies.

Palavras-chave: Plantas medicinais, betacianinas, metabólitos secundários, cultivo *in vitro*, estresse abiótico.

Qualidade de luz em espécies do gênero *Alternanthera*

Light quality on *in vitro* growth and pigment production in species of the genus

Alternanthera

Abstract:

In tissue culture, several chemical and physiological factors influence the production of secondary metabolites. The growth response and secondary metabolites increasing, generated by luminous environment, can be used to determine a favorable habitat for the growth and conservation of medicinal plants. Thus, the present study aimed to evaluate the influence of light quality on growth and production of secondary metabolites in *Alternanthera sessilis* (L.) R. Br. ex DC. (sessile joyweed), *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Grisebach (alligatorweed), *Alternanthera tenella* Colla (joyweed) e *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze (Brazilian joyweed) plants, cultured *in vitro*. The species were grown in MS medium, for 45 days, in different light qualities (white, blue and red). Growth parameters and biochemical analysis were performed at the end of the study. This way, according to the results, the red light allowed the larger accumulation of biomass in most species, red and white lamps were great inducing the production of betacyanin and enhancement of flavonoids was favored in blue light. In this manner, light affects the quality of betacyanin, betaxantinas and flavonoids synthesis, as well as growth patterns in *Alternanthera* and, based on the data presented, it is suggested that the light qualities encode specific genes of the pigment production, which exhibit distinct activation patterns in different species.

Keywords: Medicinal plants, betacyanin, secondary metabolites, *in vitro* culture, abiotic stress.

1. INTRODUÇÃO:

Estudos farmacológicos têm confirmado que algumas plantas do gênero *Alternanthera* (Amaranthaceae), incluindo *Alternanthera sessilis* (L.) R. Br. ex DC., *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Grisebach, *Alternanthera tenella* Colla e *Alternanthera*

brasiliiana (L.) Kuntze exercem importantes atividades que podem justificar a sua utilização popular (Souza et al., 1998; Biella, 2007).

Alternanthera brasiliiana, conhecida como doril ou perpétua-do-Brasil, é uma espécie frequentemente empregada em fitoterapia sendo suas folhas utilizadas para tratar várias patologias, incluindo tosse, diarreia, além de suas propriedades anti-inflamatórias e analgésicas (Facundo et al., 2012). *Alternanthera philoxeroides*, erva-de-jacaré, tem sido empregada no tratamento de febre cerebral aguda, sarampo, herpes zoster, influenza, encefalite B, dengue e HIV (Khatun et al., 2012; Wang & Sun, 2011; Fang et al., 2007). As plantas de *Alternanthera sessilis* popularmente chamada de violácea, apresentam confirmada ação hepatoprotetora (Lin et al., 1994), anti-diabética (Tan & Kim, 2013), anti-inflamatória (Subhashini et al., 2010) e antioxidante natural (Borah et al., 2011). E a espécie *Alternanthera tenella*, popularmente conhecida como apaga-fogo, também se encontra entre as várias espécies do gênero *Alternanthera* que vêm sendo estudadas, exibindo comprovada atividade antibacteriana, antifúngica e antiparasitária (Salvador, 2005; Salvador et al., 2003) ação imunomodulatória, antioxidante e anti-inflamatória (Biella et al., 2008), inibidora da proliferação de linfócitos (Biella, 2007) e redutora de células tumorais (Guerra et al., 2003).

Estudos fitoquímicos em plantas da família Amaranthaceae sugerem a presença de compostos como antraquinonas, auronas, betalainas (betacianinas e betaxantinas), cromoalcaloides, exdiesteroides, flavonoides, protoalcaloides, saponinas, esteroides e triterpenos (Wiese, 2008). As betalainas, um grupo de metabólitos secundários nitrogenados, derivados da L-tirosina, são pigmentos vegetais hidrofílicos, armazenados no vacúolo e empregados como corantes alimentícios, exibindo vasta gama de atividades biológicas desejáveis, incluindo antioxidantes, anti-inflamatórios, hepatoprotetores e propriedades anticancerígenas (Tanaka et al., 2008; Georgiev et al., 2010).

(Figura 1, aqui)

Existem dois tipos de betalainas, as betaxantinas, que *in natura* são obtidas pela condensação do ácido betalâmico com aminas ou aminoácidos e as betacianinas,

caracterizadas por uma estrutura ciclo-dihidroxifenilalanina (*ciclo-DOPA*) com substituições adicionais através de diferentes padrões de glicosilação e de acilação no C-5 ou C-6, produzem deslocamentos hipso e bathocrômico (Fig. 1) (Stintzing & Carle, 2004). As betaxantinas são amarelas, com espectro de absorbância com comprimento de onda de aproximadamente 480nm e as betacianinas são vermelho-violáceas, com espectro de absorbância em 536nm. A coloração amarela, laranja ou violeta dos vegetais que contém estes pigmentos, se dá pela presença de betaxantinas e betacianinas, ou mesmo das duas (Gandia-Herrero & Garcia-Carmona, 2013). Um fator bastante importante com relação às plantas que acumulam betalainas é de que não há relatos que possuam outros pigmentos, como os flavonoides antocianinas, as razões evolutivas ainda não foram explicadas, no entanto, bioquimicamente, tem sido demonstrado que as enzimas relevantes para a produção de antocianinas, como a antocianina sintase, não são expressos em plantas produtoras de betalainas (Georgiev et al., 2008;Gandia-Herrero & Garcia-Carmona, 2013).

Os avanços na área de biotecnologia vegetal têm sido bastante eficazes no estudo e produção de metabólitos secundários *in vitro* e no melhoramento de plantas medicinais (Ramakrishna & Ravishanka, 2011). A cultura de tecidos de plantas é uma fonte alternativa de substâncias bioativas, incluindo os pigmentos betalâmicos, além de oferecer algumas vantagens frente ao *ex vitro*, como a capacidade de manter condições assépticas, controladas, independentemente das variações nas propriedades do clima ou do solo. A capacidade de definir e controlar as condições da produção ajuda a garantir o fornecimento contínuo de produtos, com qualidade e rendimento uniformes, independentemente da sua localização geográfica (Rao & Ravishanka, 2002; Vanisree et al., 2004).

O emprego de elicitores tem sido amplamente utilizado buscando o aumento da produção ou a indução da síntese *de novo* de metabólitos secundários em culturas de células de plantas, tecidos ou órgãos *in vitro* (Ramakrishna & Ravishanka, 2011; Georgiev et al., 2008). Sabe-se que a luz pode afetar a produção de compostos bioativos de plantas e que as luzes branca, vermelha e azul são capazes de aumentar a transdução de sinais e a biossíntese de betalainas (Kishima et al., 1995). Segundo Macedo et al., (2004) a produção

de plantas de *A. brasiliiana* utilizando a luz vermelha pode ser uma importante estratégia de se obter compostos com atividade analgésica. Além disso, Zhao et al., (2010) relataram que tanto a qualidade, quanto a intensidade luminosa provocam alterações na síntese de betalainas em calos e em culturas de raízes de beterraba incrementando a produção desses compostos, quando induzidos pela luz azul e vermelha distante juntas (Girod & Zryd, 1987; Shin et al., 2003).

Com base nos estudos acima citados, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência da qualidade de luz no crescimento e na produção de metabólitos secundários em plantas de *A. sessilis*, *A. philoxeroides*, *A. tenella* e *A. brasiliiana*, cultivadas *in vitro*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas como material vegetal as plantas de *A. brasiliiana*, *A. philoxeroides*, *A. sessilis* e *A. tenella* estabelecidas em meio MS (Murashige & Skoog, 1962), com 30 g L⁻¹ de sacarose, 8g L⁻¹ de ágar, 100mg L⁻¹ de inositol. As plantas foram mantidas em câmara de crescimento com densidade de fluxo de fótons de 22μmol m⁻² s⁻¹, 16h de fotoperíodo e temperatura de 25°C ±2, por 30 dias e pertencentes ao Banco de Plantas *in vitro* do Laboratório de Cultura de Tecidos da Universidade Federal de Pelotas, Brasil.

Para o estabelecimento do experimento, segmentos nodais de aproximadamente 0,5-1 cm de comprimento, contendo uma gema, foram utilizados como explantes e inoculados em frascos erlenmeyer, em meio MS, contendo 30 g L⁻¹ de sacarose, 8g L⁻¹ de ágar, 100mg L⁻¹ de inositol e ausência de reguladores de crescimento, utilizou-se uma bucha de algodão para fechar o frasco. O material permaneceu sob fotoperíodo de 16h, com temperatura de 25°C ±2, em diferentes condições de luminosidade, por um período de 45 dias.

As distintas qualidades de luz foram fornecidas por três tipos de lâmpada: luz branca (fluorescentes tubulares - Sylvania® - 40W, luz azul (fluorescente azul compacta - Taschibra® - 14W, com pico de emissão de 470nm) e luz vermelha (fluorescente compacta vermelha -G-light®- 15W, com pico de emissão de 660nm). As densidades de fluxo de

fótons para as luzes branca, azul e vermelha, medidas com luxímetro (Hansatech® Quantum Sensor QSRED) foram 25, 12 e 22 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, em esquema fatorial 4x3, composto por quatro espécies de plantas e três fontes de luz. Foram realizadas 10 repetições, sendo considerada a unidade experimental um frasco contendo quatro explantes. Os dados biométricos foram submetidos à análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro, com auxílio do software estatístico WinStat (Machado & Conceição, 2002).

2.1. Variáveis analisadas

2.1.1. Crescimento das plantas

Ao final dos 45 dias, os efeitos de cada tratamento foram avaliados de acordo com os seguintes parâmetros: número de gemas, comprimento da maior brotação e massa fresca da parte aérea. A medida da massa fresca foi efetuada imediatamente após a retirada das plantas dos frascos para prevenir a desidratação.

2.1.2. Quantificação de betaxantinas

Para a extração de betaxantinas foram utilizados 250mg da parte aérea de planta fresca e tampão fosfato 10mM, pH 6,0, com 10mM de ascorbato de sódio. As plantas foram maceradas em almofariz de porcelana e o homogeneizado filtrado em gaze e centrifugado a 10000g, por 20min, a 4°C, seguindo a metodologia proposta por Gandia-Herrero et al., (2005). Para as leituras foi utilizado espectrofotômetro T80 UV/VIS Spectrometer (PG Instruments Ltd) acoplado a sistema de aquecimento PTC-2 Peltier Temperature Controller, com o software UVWin80 v5.0.5, a 25°C. A concentração de betaxantina foi calculada através da leitura da absorbância em um comprimento de onda de 480nm, tendo como coeficiente de extinção molar de $\varepsilon=48,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Schliemann et al., 1999).

2.1.3. Quantificação de betacianinas totais

A extração das betacianinas, betanidina e betanina, foi realizada com dois tipos de tampão extrator, tampão acetato/metanol e tampão fosfato, respectivamente. A primeira análise foi realizada com 70% de tampão acetato na concentração de 10 mM e 30% de

metanol (v/v), pH 5,0, acrescido de ascorbato de sódio 10mM. A segunda análise foi realizada utilizando tampão fosfato 10mM, pH 6,0, acrescido de ascorbato de sódio 10mM, sem adição de solvente orgânico. Para ambas as análises foram utilizadas 250mg da parte aérea de planta fresca que foram maceradas em almofariz de porcelana e o homogeneizado filtrado em gaze e centrifugado a 10000g, por 20min, a 4°C., conforme Gandia-Herrero et al., (2007). O coeficiente de extinção molar utilizado para o cálculo de betanidina foi de $\epsilon = 54000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e para betanina foi de $\epsilon = 65000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, conforme relatado por Schwartz & Von Elbe (1980), em um comprimento de onda de 536nm. As leituras foram realizadas nas mesmas condições da análise anterior.

2.1.4. Quantificação de flavonoides totais

A extração foi feita nas mesmas condições do experimento anterior utilizando tampão acetato/metanol como extrator. Foi realizada espectrofotometria de varredura, na faixa de 230 a 800nm, para identificação do comprimento de onda mais adequado para o método, através do qual plotou-se a curva de calibração padrão, que variou entre 1-5mg L⁻¹ de quercetina, em tampão acetato/metanol (70/30%, v/v), possibilitando o cálculo das concentrações de flavonoides nas amostras que foram computadas e expressas em μmol de quercetina por grama de massa fresca. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro, conforme descrito anteriormente em 330nm.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.2. Crescimento das plantas

Os resultados referentes aos efeitos da qualidade de luz sobre os parâmetros de crescimento, número de gemas, altura e massa fresca, após 45 dias de cultivo, nas quatro espécies de *Alternanthera* são apresentados na Figura 2. Observou-se que para número de gemas (Fig. 2-A), independente da espécie, a cor branca é a melhor para o favorecimento desta variável. Porém, para plantas de *A. sessilis*, esse tratamento foi semelhante à luz vermelha e em *A. philoxeroides* pela luz azul. Nossos dados foram condizentes com os

resultados apresentados por Pasa et al., (2012), nos quais plantas de amoreira-preta (*Morus nigra*) *in vitro* apresentaram incremento no seu número de gemas, em meios MS com acréscimo de BAP, na luz branca com relação à azul, vermelha ou ao escuro e diferindo de estudos realizados por Yuan et al., (2009), no qual as brotações de variedades de uvas (Fenghuang 51, Pinot Noir, Beta e Kyoho), assim como o seu crescimento radicular foram promovidos sob luz vermelha ou amarela. Nas espécies *A. brasiliiana* e a *A. tenella* não houve diferenças estatísticas quanto às três qualidades de luz avaliadas.

(Figura 2, aqui)

Para o comprimento das brotações (Fig. 2-B e Fig. 3), foi evidenciada que a luz vermelha é a mais efetiva para duas espécies, sendo que a luz branca também apresentou efeito positivo para *A. sessilis* e *A. philoxeroides*. Os resultados estão de acordo com Puspa et al. (2008) que afirmou que o alongamento das brotações e dos entrenós de uva foram maiores sob luz LED vermelha. Porém, as respostas obtidas foram contrárias às de Heo et al., (2002), nas quais houve maior comprimento caulinar em plantas de *Calendula officinalis* em luz azul monocromática. Conforme Baque et al., (2011) a mistura de luzes vermelha e azul aumenta o crescimento e desenvolvimento pelo aumento da fotossíntese líquida, devido ao fato de o espectro de distribuição destas energias (vermelha e azul) coincidirem com o da absorção de clorofila. A luz vermelha monocromática causa um desequilíbrio da disponibilidade de energia luminosa requerida para o ótimo funcionamento do fotossistema I e II, o que, conseqüentemente, inibiria o crescimento da parte aérea, diferente dos resultados obtidos em na recente pesquisa, o que sugere que esta diferença seja devido a interações sinérgicas dos receptores da luz azul e fitocromo na promoção e inibição do alongamento do caule (Li et al., 2010).

(Figura 3, aqui)

Os resultados indicaram que a cor vermelha permitiu o maior acúmulo de biomassa (Fig. 2-C), para a maioria das espécies, sendo que em *A. philoxeroides* a cor da luz não influenciou no aumento de massa. Observou-se também uma ação da luz branca nas espécies, *A. sessilis* e *A. brasiliiana*. As respostas divergem das apresentadas por Macedo et

al., (2004), nas quais as plantas de *A. brasiliana* apresentaram maior acúmulo de biomassa em luz azul e branca, sendo que na luz vermelha o conteúdo foi menor e em estudos com cultura de raízes, foi percebido maior incremento de massa no tratamento com vermelho distante (Shin et al., 2003). Resultados diferentes foram observados por Shin et al., (2008), quando avaliaram plantas de *Doritaenopsis*, nas quais houve incremento de massa sob luz vermelha acrescida de luz azul. A cultura de tecidos vegetal utiliza como fonte luminosa lâmpadas fluorescentes brancas, estas fornecem comprimentos de onda desnecessários, de baixa qualidade para a promoção do crescimento (Kim et al., 2004), conforme observado em nossos resultados, o maior incremento de massa foi observado na luz vermelha, demonstrando que a qualidade de luz apresenta um papel importante nos processos de fotossíntese e fotomorfogênese, influenciando na maneira mais eficiente com que a luz será absorvida e utilizada pelos pigmentos fotossintéticos ou fotomorfogênicos.

3.3. Quantificação de betaxantinas e betacianinas totais

A luz tem demonstrado ser um importante regulador na formação de betalainas, conforme reportado por Zhao et al., (2010) em trabalho com calos de *Suaeda salsa*. Neste, tanto a qualidade de luz, quanto a sua quantidade afetaram a síntese de betacianinas, além deste, outros estudos realizados por Bhuiyan et al., (2002) demonstraram que as células no escuro ficavam brancas e somente iniciaram a síntese dos pigmentos quando expostas à luz.

(Figura 4, aqui)

No presente estudo, verificou-se que o teor de betaxantinas (Fig. 4) demonstrado em *A. brasiliana* apresentou maior síntese desse pigmento quando em luz azul e branca, ao contrário do que aconteceu com *A. philoxeroides* que obteve aumento da biossíntese em luz vermelha, porém mantendo o efeito positivo sob luz branca. Os resultados apresentados por Nicola et al., (1973) com plântulas de *Celosia plumosa*, demonstraram a promoção da síntese de betaxantinas na luz vermelho distante, porém com uma taxa de acúmulo mais lenta da ocorrida em luz branca. As plantas de *A. sessilis* e *A. tenella* não apresentaram diferenças significativas no conteúdo de betaxantinas, nas três qualidades luminosas em

que foram cultivadas, diferentemente dos resultados demonstrados por Bhuiyan et al., (2002), nos quais as culturas celulares de *Portulaca* aumentaram significativamente o seu teor de betaxantinas quando em luz azul.

As respostas diferenciais na síntese de betaxantinas são atribuídas a diferentes níveis de ativação do sistema gênico envolvidos na síntese do pigmento nessas espécies, conforme relatado anteriormente (Nicola et al., 1973; Schliemann et al., 1999) com plantas de *C. plumosa* e *A. tricolor*, nos quais os pigmentos relatados (betacianinas e betaxantinas) possuem uma unidade de dihidropiridina idêntica biogeneticamente, derivada de DOPA, as semelhanças nas reações de luz sugerem que o controle da sua síntese ocorra em nível de formação de um intermediário comum dos pigmentos. E mesmo com tais diferenças pode-se dizer que a biossíntese de betaxantinas em plantas de *Alternanthera* é fortemente estimulada pela luz, se não induzida pela luz, conforme constatado por Bohm et al., (1991).

As betalaínas são altamente solúveis em água e o pH 6,0 favorece a sua estabilidade (Huang & Von Elbe, 1987). Em estudos mais recentes (Gandia-Herrero et al., 2005; 2007; 2010), há relatos de diferentes pH em distintos tampões de extração, nos quais o pH 6,0 (tampão fosfato) favorece a extração de betanina e das betaxantinas e o pH 5,0 (tampão acetato) é ideal para a estabilidade da betanidina, podendo haver comprometimento com diferentes potenciais de hidrogênio ou de hidroxila.

(Figura 5, aqui)

Portanto, para quantificação das betacianinas (Fig. 5-A), extraídas com tampão fosfato, foi verificado que em *A. sessilis* e *A. tenella* não houve diferenças significativas nas luzes testadas, porém, *A. brasiliiana* obteve melhor produtividade deste pigmento quando cultivada em luz branca e luz azul. Para a espécie *A. philoxeroides*, a luz vermelha foi mais efetiva, seguida da luz branca, que também foi indutora da biossíntese e acúmulo desses pigmentos. Dessa maneira, pode-se dizer que a luz branca foi a mais eficiente para a síntese destes pigmentos, a partir da extração com esse tampão, considerando todas as espécies analisadas. Esses resultados são complementares aos de Berlin et al., (1986), no qual plântulas de *Amaranthus tricolor* e *Chenopodium rubrum* apresentaram maior

biossíntese de betacianinas em luz branca, contrariando os estudos de Kishima et al., (1995) que relataram que a luz azul foi mais efetiva na indução de betalaínas em calos de *Portulaca*. Análises realizadas por Zhao et al., (2010), em calos de *Salsa sueda*, determinaram que a qualidade de luz mais efetiva na indução desse pigmentos foi a luz branca, quando comparada com a luz azul, vermelha e escuro e corroborando os resultados.

Quando os pigmentos foram extraídos com tampão acetato/metanol (Fig. 5-B), a luz vermelha foi a que induziu maior produção, na maioria das espécies. Em *A. sessilis*, esta qualidade de luz foi igual à luz azul, porém, em *A. philoxeroides*, as luzes que obtiveram maior indução de betacianinas foram azul e branca. Esses resultados diferem em parte, dos apresentados por Bhuiyan et al., (2002), nos quais houve um aumento drástico na produção de betacianinas em culturas celulares de *Portulaca* sp., quando irradiadas com luz azul, assim como em estudo com beterraba, no qual o vermelho distante foi mais adequada no acúmulo de betalaínas (Shin et al., 2003). Os resultados encontrados no presente trabalho foram semelhantes aos de Elliott (1979), que em plântulas de *A. tricolor* obteve grande acúmulo de betacianinas na luz vermelha, porém, somente quando fornecia um pré-tratamento em elevada temperatura (37°C). A espécie *A. tenella* não apresentou diferenças significativas na síntese de betacianinas nas distintas cores de lâmpadas.

Segundo Stintzing & Carle (2004) as betalaínas podem funcionar como osmólitos que mantém os processos fisiológicos. Em espécies de *Opuntia*, um cacto bem adaptado ao clima semi-árido, foi detectado altos níveis de prolina e altos níveis de betaxantinas, esta óbvia correlação sugere que as betaxantinas podem servir como osmorreguladores, direta ou indiretamente, através da modulação do pool de aminoácidos e a clivagem ou síntese destas. Outras funções potenciais, segundo os mesmos pesquisadores, porém, não comprovadas até então são o seu papel como açúcar (betacianinas), compostos amino (betaxantinas) e, geralmente, como reservatório de nitrogênio, para reduzir o potencial osmótico no vacúolo ou reabastecer os ciclos metabólicos em períodos de desequilíbrio fisiológico.

A significativa correlação entre as betalainas e a capacidade antioxidativa indica que os vegetais que contêm esses pigmentos possuem alta atividade antioxidante (Kanner et al., 2001). Esses pigmentos acabam atuando como antioxidantes nos tecidos vegetais, estruturalmente, porque as betacianinas e betaxantinas transportam porções de compostos amino aromáticas e são suscetíveis à estabilização de radicais, devido à sua natureza aromática. Pensando nisso, sabe-se que as diferentes qualidades de luz proporcionam um ambiente onde a planta apresenta maior estresse e produz maior quantidade de radicais livres, produzindo pigmentos captadores desses radicais para se proteger e manter a homeostase celular.

A variabilidade de respostas entre as espécies pode ser explicada pelo fato de os pigmentos de uma planta variar frequentemente entre indivíduos, populações e espécies, mesmo entre as folhas dentro de um dossel. Uma vez que, tanto a clorofila quanto o conteúdo de betalainas possam depender de fatores genéticos, a escolha de espécies pode afetar na qualidade e no rendimento (Trezzini, 1990). Pensando nisso o desenvolvimento destes fenótipos de cor pode ocorrer de duas maneiras: por mecanismos capazes de ativar tipos celulares específicos que codificam os genes da biossíntese de betaxantinas e betacianinas ou que o genoma é composto por famílias multigênicas, com genes que apresentam padrões específicos de ativação. Se os mesmos conjuntos de genes foram expressos nos diferentes fenótipos, amarelo-laranja ou o vermelho-violeta, a biossíntese de betalainas é codificada por uma família multigênica, na qual diferentes membros podem ser expressos em diferentes fenótipos (Girod & Zryd, 1991).

3.4. Quantificação de flavonoides totais

Os flavonoides são o mais diverso e variado grupo de compostos naturais e, provavelmente os fenóis naturais mais importantes. Estes compostos possuem um largo espectro de atividades químicas e biológicas. Sendo assim, a sua extração ocorreu utilizando tampão com o acréscimo de metanol, devido ao fato de a maioria dos compostos ativos serem encontrados em extratos metanólicos (Batubara et al., 2012). A absorbância máxima observada nas amostras, através da varredura em espectrofotômetro e que

coincidiu com o observado por Salvador et al., (2006), foi 330nm. A concentração de flavonoides de plantas de *Alternanthera* foi calculada usando a curva padrão: $y = 0,1526 - 0,0039x$, $R^2 = 0,9789$).

Entre todos os fatores ecológicos, luz e temperatura são os mais importantes para a síntese de flavonoides. Estes são produtos derivados das rotas do ácido chiquímico (ou chiquimato) e também do acetato (acetil coenzima A) e são regulados não somente por genes, mas também por outros fatores, como a fotossíntese, estágio de desenvolvimento, sazonalidade, forma de reprodução da planta e variedade cultivada. Dos fatores ambientais, a luz é uma das mais importantes variáveis que afeta as concentrações fitoquímicas nas plantas, a intensidade luminosa é positivamente relacionada ao acúmulo de compostos do metabolismo secundário, porém os efeitos da qualidade de luz são mais complexos e frequentemente relatados com grande variação (Li & Kubota, 2009).

O cultivo de *A. philoxeroides*, *A. brasiliana* e *A. tenella* sob diferentes qualidades de luz não apresentam diferenças e nem incrementos destes compostos fenólicos. Porém para plantas de *A. sessilis*, o cultivo em luz azul, promove um aumento significativo da biossíntese destes compostos. Dessa maneira, os resultados da quantificação de flavonoides totais (Fig. 6), obtidos em plantas de *Alternanthera*, demonstraram que a luz azul é a melhor opção para todas as espécies. Estudos realizados por Duell-Pfaff & Wellmann (1982) em culturas celulares de salsa (*Petroselinum hortense*), concordaram que a resposta à luz azul foi maior do que a luz vermelha e vermelha distante na indução da biossíntese de flavonoides. Wang et al., (2010) trabalhando com plantas de pepino (*Cucumis sativus*) confirmaram estes resultados, relatando que ao crescerem sob luz azul e roxa apresentaram maior atividade enzimática da PAL e maior nível de flavonoides em comparação com outras qualidades de luz.

(Figura 6, aqui)

O efeito de longos períodos de irradiação é similar à alta taxa de fluência ocorrida na luz vermelha ou vermelha distante e pode ser explicado, principalmente, pela ação do fitocromo, e no caso da luz azul, pela ação de um fotorreceptor que serve como um

mediador para a luz azul, o criptocromo. Estudos empregando a luz monocromática têm mostrado que a luz azul promove a expressão de genes da chalcona sintase e dihidroflavonol-4-redutase, que regulam a rota dos flavonoides (Li & Kubota, 2009). Conforme relatado por Meng et al., (2004), a luz azul promove a expressão de genes da rota dos flavonoides, que são ativados pelo recebimento de luz nas folhas, iniciando a sinalização e os fotorreceptores como o fitocromo, criptocromos e UV-B desempenham papéis na fotorregulação destes compostos.

4. CONCLUSÕES

A resposta das plantas à luz vermelha, azul e branca suscita diferentes expressões da via de percepção e transdução de sinais das rotas bioquímicas, com diferenças nos teores de betalaínas, flavonoides, assim como na biomassa de plantas de *Alternanthera*, o que permite concluir que o controle da qualidade de luz com taxas apropriadas de branco, azul ou vermelho pode melhorar o conteúdo fitoquímico de plantas cultivadas.

A espécie *A. sessilis* apresenta os maiores níveis de miraxantina, betanina, betanidina e compostos fenólicos, em todas as qualidades de luz, porém não foi influenciada pelas mesmas em relação ao crescimento *in vitro*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baque, M.A., Y. Shin, T. Elshari, E. Lee & K. Paek.** 2011. Effect of light quality, sucrose and coconut water concentration on the micropropagation of *Calanthe* hybrids ('Bukduseong' × 'Hyesung' and 'Chunkwang' × 'Hyesung'). *Australian Journal of Crop Science* 5: 1247-1254.
- Batubara, I., S. Kotsuka, K. Yamauchi, H. Kuspradini, T. Mitsunaga & L.K. Daarusan.** 2012. TNF- α production inhibitory activity, phenolic, flavonoid and tannin contents of selected Indonesian medicinal plants. *Research Journal Medicinal Plant* 6: 406-415.

Berlin, J., S. Sieg, D. Strack, M. Bokern & H. Harms. 1986. Production of betalains by suspension-cultures of *Chenopodium- rubrum* L. Plant Cell Tissue Organ Culture 5: 163–174.

Bhuiyan, N.H., K. Murakami & T. Adachi. 2002. Variation in betalain content and factors affecting the biosynthesis in *Portulaca* sp. 'Jewel' cell cultures. Plant Biotechnology 19: 369-376.

Biella, C. A. 2007. Avaliação da atividade imunomoduladora de *Alternanthera tenella* Colla e investigação de ações do extrato aquoso em modelo de artrite experimental. Tese de doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil. 106 pp.

Biella, C. A., M.J. Salvador, D.A. Dias, M.D. Baruffi & L.S.P. Crott. 2008. Evaluation of immunomodulatory and anti-inflammatory effects and phytochemical *screening* of *Alternanthera tenella* Colla (Amaranthaceae) aqueous extracts. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 103: 569-577.

Bohm, H., L. Bohm & E. Rink. 1991. Establishment and characterization of a betaxanthin-producing cell culture from *Portulaca grandiflora*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 26: 75-82.

Borah, A., R.N.S. Yadav & B.G. Unni. 2011. In vitro antioxidant and free radical scavenging activity of *Alternanthera sessilis*. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research 2: 1502-1506.

Duell-Pfaff, N. & E. Wellmann. 1982. Involvement of phytochrome and a blue light photoreceptor in UV-B induced flavonoid synthesis in parsley (*Petroselinum hortense* Hoffm.) cell suspension cultures. Planta 156: 213-217.

Elliott, D.C. 1979. Temperature-sensitive responses of red light-dependent betacyanin synthesis. *Plant Physiology* 64: 521-524.

Facundo, V.A., M.S. Azevedo, R. V. Rodrigues, L.F. do Nascimento, J.S.L.T. Militão, G. V.J. da Silva & R. Braz-Filho. 2012. Chemical constituents from three medicinal plants: *Piper renitens*, *Siparuna guianensis* and *Alternanthera brasiliana*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 22: 1134-1139.

Fang, J.B., W. Jiab, W.Y. Gao, Z. Yao, J. Tenga, A.H. Zhao & H.Q. Duana. 2007. Antitumor constituents from *Alternanthera philoxeroides*. *Journal of Asian Natural Products Research* 9: 511-515.

Gandia-Herrero, F. & F. Garcia-Carmona. 2013. Biosynthesis of betalains: yellow and violet plant pigments. *Trends in Plant Science* 18: 334-343.

Gandia-Herrero, F., J. Escribano & F. Garcia-Carmona. 2005. Betaxanthins as substrates for tyrosinase. An approach to the role of tyrosinase in the biosynthetic pathway of betalains. *Plant Physiology* 138: 421-432.

Gandia-Herrero, F., J. Escribano & F. Garcia-Carmona. 2007. Characterization of the activity of tyrosinase on betanidin. *Journal Agriculture Food Chemistry*. 55:1546-1551.

Gandia-Herrero, F., J. Escribano & F. Garcia-Carmona. 2010. Structural implications on color, fluorescence, and antiradical activity in betalains. *Planta* 232: 449–460.

Georgiev, V., M. Ilieva, T. Bley & A. Pavlov. 2008. Betalain production in plant *in vitro* systems. *Acta Physiologiae Plantarum* 30: 581-593.

Georgiev, V.G., J. Weber, E. Kneschke, P.N. Denev, T. Bley & A.I. Pavlov. 2010. Antioxidant activity and phenolic content of betalain extracts from intact plants and hairy root cultures of the red beet root *Beta vulgaris* cv. Detroit dark red. *Plant Foods Humam Nutrition* 65: 105–111.

Girod, P.A. & J.P. Zryd. 1987. Isolation and culture of betaxanthins and betacyanins producing cells of red beet (*Beta-Vulgaris* L). *Experientia* 43: 660–661.

Girod, P.A. & J.P. Zryd. 1991. Secondary metabolism in cultured red beet (*Beta vulgaris* L.) cells: Differential regulation of betaxanthin and betacyanin biosynthesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 25: 1-12.

Guerra, R.N.M., H.A.W. Pereira, L.M.S. Silveira & R.S.G. Olea. 2003. Immunomodulatory properties of *Alternanthera tenella* Colla aqueous extracts in mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 36: 1215-1219.

Heo, J.W., C.W. Lee; D. Chakrabarty & K.Y. Paek. 2002. Growth responses of marigold and salvia bedding plants as affected by monochromic or mixture radiation provided by a light emitting diode (LED). *Plant Growth Regulation* 38: 225–230.

Huang, A.S. & J.H. Von Elbe. 1987. Effect of pH on the degradation and regeneration of betanine. *Journal of Food Science* 52: 1689–1693.

Kanner, J., S. Harel & R. Granit. 2001. Betalains a new class of dietary cationized antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 5178–5185.

Khatun, F., F. Zaman, T. Mosaib, F. Mostafa, M. Zaman, F. Rehana, D. Nasrin, F. Jamal, N. Nahar & M. Rahmatullah. 2012. Evaluation of antinociceptive and antihyperglycemic activities in methanol extracts of whole plants of *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb. (Amaranthaceae) in mice. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 25: 583-587.

Kim, S.J., E.J. Hahn, J.W. Heo & K.Y. Paek. 2004. Effects of LEDs on net photosynthetic rate, growth and leaf stomata of *Chrysanthemum* plantlets *in vitro*. *Scientia Horticulturae* 101: 143–151.

- Kishima, Y., A. Shimaya & T. Adachi.** 1995. Evidence that blue light induces betalain pigmentation in *Portulaca* callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 43: 67-70.
- Li, H., Z. Xu, & C. Tang.** 2010. Effect of light-emitting diodes on growth and morphogenesis of upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plantlets *in vitro*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 103: 155–163.
- Li, Q. & C. Kubota.** 2009. Effects of supplemental light quality on growth and phytochemicals of baby leaf lettuce. *Environmental and Experimental Botany* 67: 59–64.
- Macedo, A.F., C.L. Lage, M.A. Esquibel, M.M. de Souza, K.L. da Silva, R. Niero & V. Cechinel-Filho.** 2004. Preliminary phytochemical and pharmacological studies on plantlets of *Alternanthera brasiliana* cultured under different spectral quality of lights. *Acta Farmaceutica Bonaerense* 23: 515-519.
- Machado, A. & A.R. Conceição.** Programa estatístico WinStat – Sistema de Análise Estatístico para Windows, versão 2.0. Pelotas, RS, 2002.
- Meng, X.C., T. Xing & X.J. Wang.** 2004. The role of light in the regulation of anthocyanin accumulation in *Gerbera hybrida*. *Journal of Plant Growth Regulation* 44: 243–250.
- Murashige, T & F. Skoog.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Nicola, M.G. de, M. Piattelli & V. Amico.** 1973. Effect of continuous far red on betaxanthin and betacyanin synthesis. *Phytochemistry* 12: 2163-2166.
- Pasa, M. da S., G.L. Carvalho, M.W. Schuchi, J.D. Schmitz, M. de M. Torchelsen, G.K. Nickeli, L.R. Sommer, T.S. Lima & S.S. Camargo.** 2012. Qualidade de luz e fitorreguladores na multiplicação e enraizamento *in vitro* da amoreira-preta 'Xavante'. *Ciência Rural* 42: 1392-1396.

Puspa R.P., K. Ikuo & M. Ryosuke. 2008. Effect of red-and blue-light emitting diodes on growth and morphogenesis of grapes. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 92:147–153.

Ramakrishna, A. & G.A. Ravishanka. 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior* 6: 1720-1731.

Rao, S.R. & G.A. Ravishankar. 2002. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances* 20:101–153.

Salvador, M. J., E.O. Ferreira, S.U. Mertens-Talcott, V.C. Whocely, V. Butterweck, H. Derendorf & D.A. Dias. 2006. Isolation and HPLC quantitative analysis of antioxidant flavonoids from *Alternanthera tenella* Colla. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung* 61: 19-25.

Salvador, M. J., P.S. Pereira, S.C. França, R.C. Candido, I.Y. Ito & D.A. Dias. 2009. bioactive chemical constituents and comparative antimicrobial activity of callus culture and adult plant extracts from *Alternanthera tenella*. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung* 64: 373-381.

Salvador, M.J. & D.A. Dias. 2004. Flavone C-glycosides from *Alternanthera marítima* (Mart) St.Hil. (Amaranthaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 32: 107-110.

Salvador, M.J. 2005. Estudo químico, biológico e biotecnológico de *Alternanthera marítima* e *Alternanthera tenella* (Gomphreneae, Amaranthaceae). PhD Thesis. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. 407 pp.

Salvador, M.J., J.C. Ferreira, L.M.C. Zuleta, V.S. Bolzani, D.A. Dias & R.C. Candido. 2003. Antifungal susceptibility tests of crude extracts from *Alternanthera marítima*, *A. tenella* Colla and *Calycophyllum spruceanum* Benth against four *Candida* ssp determined by agar-

well diffusion and Broth macrodilution methods. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences 39: 240-240.

Salvador, M.J., O.L.A.D. Zucchi, R.C. Candido, I.Y. Ito & D.A. Dias. 2004. *In vitro* antimicrobial activity of crude extracts and isolated constituents of *Alternanthera maritima* (Amaranthaceae). Pharmaceutical Biology 42: 138-148.

Schliemann, W., N. Kobayashi & D. Strack. 1999. The decisive step in betaxanthin biosynthesis is a spontaneous reaction. Plant Physiology 119: 1217–1232.

Schwartz, S.J. & J.H. Von Elbe. 1980. Quantitative determination of individual betacyanin pigments by high-performance liquid chromatography. Journal of Agricultural and Food Chemistry 28: 540–543.

Shin, K.S., H.N. Murthy, J.W. Heo & K.Y. Paek. 2003. Induction of betalain pigmentation in hairy roots of red beet under different radiation sources. Biologia Plantarum 47:149-152.

Shin, K.S., H.N. Murthy, J.W. Heo, E.J. Hahn & K.Y. Paek. 2008. The effect of light quality on the growth and development of *in vitro* cultured *Doritaenopsis* plants. Acta Physiologiae Plantarum 30: 339–343.

Souza, M.M. de, P. Kern, A.E.O. Floriani & V. Cechinel-Filho. 1998. Analgesic properties of a hydroalcoholic extract obtained from *Alternanthera brasiliana*. Phytotherapy Research 12: 279–281.

Stintzing, C.F. & R. Carle. 2004. Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. Trends in Food Science & Technology 15: 19-38.

Subhashini, T., B. Krishnaveni & R.C. Srinivas. 2010. Anti- inflammatory activity of leaf extracts of *Alternanthera sessilis*. Hygeia Journal for Drugs and Medicines 2: 54-57.

- Tan, K.K. & K.H. Kim.** 2013. *Alternanthera sessilis* red ethyl acetate fraction exhibits antidiabetic potential on obese type 2 diabetic rats. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2013: 1-8.
- Tanaka, Y., N. Sasaki & A. Ohmiya.** 2008. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. The Plant Journal 54: 733-749.
- Trezzini, G.F.** 1990. Génétique des bétalaines chez *Portulaca grandiflora* Hook. PhD thesis. University of Lausanne, Switzerland.
- Vanisree, M., C.Y. Lee, S.F. Lo, S.M. Nalawade, C.Y. Lin & H.S. Tsay.** 2004. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. Botanical Bulletin- Academia Sinica Taipei 45: 1–22.
- Wang, H., Y.P. Jiang, H. Yu, X.J. Xia, K. Shi, Y.H. Zhou & J.Q. Yu.** 2010. Light quality affects incidence of powdery mildew, expression of defence-related genes and associated metabolism in cucumber plants. European Journal of Plant Pathology 127: 125–135.
- Wang, L. & F. Sun.** 2011. Study on the quality standard of alligator *Alternanthera* herb. Medicinal Plant 2: 13 -16.
- Wiese, L. P. L.** 2008. Avaliação de atividade antioxidante e anti-inflamatória de extrato e frações de *Alternanthera tenella* Colla. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis, SC, Brasil. 123 pp.
- Yuan, L., L. Sheng, M. ShaoYing, Z. Zhen, Z. QingSong, L. LiYuan, X. Chong & P. XiaoLi.** 2009. Effects of light quality on the growth and development of *in vitro* cultured grape plantlets. Acta Horticulturae Sinica 36: 1105-1112.

Zhao, S.Z., H.Z. Sun, M. Chen & B.S. Wang. 2010. Light-regulated betacyanin accumulation in euhalophyte *Suaeda salsa* calli. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 102: 99-107.

Figuras

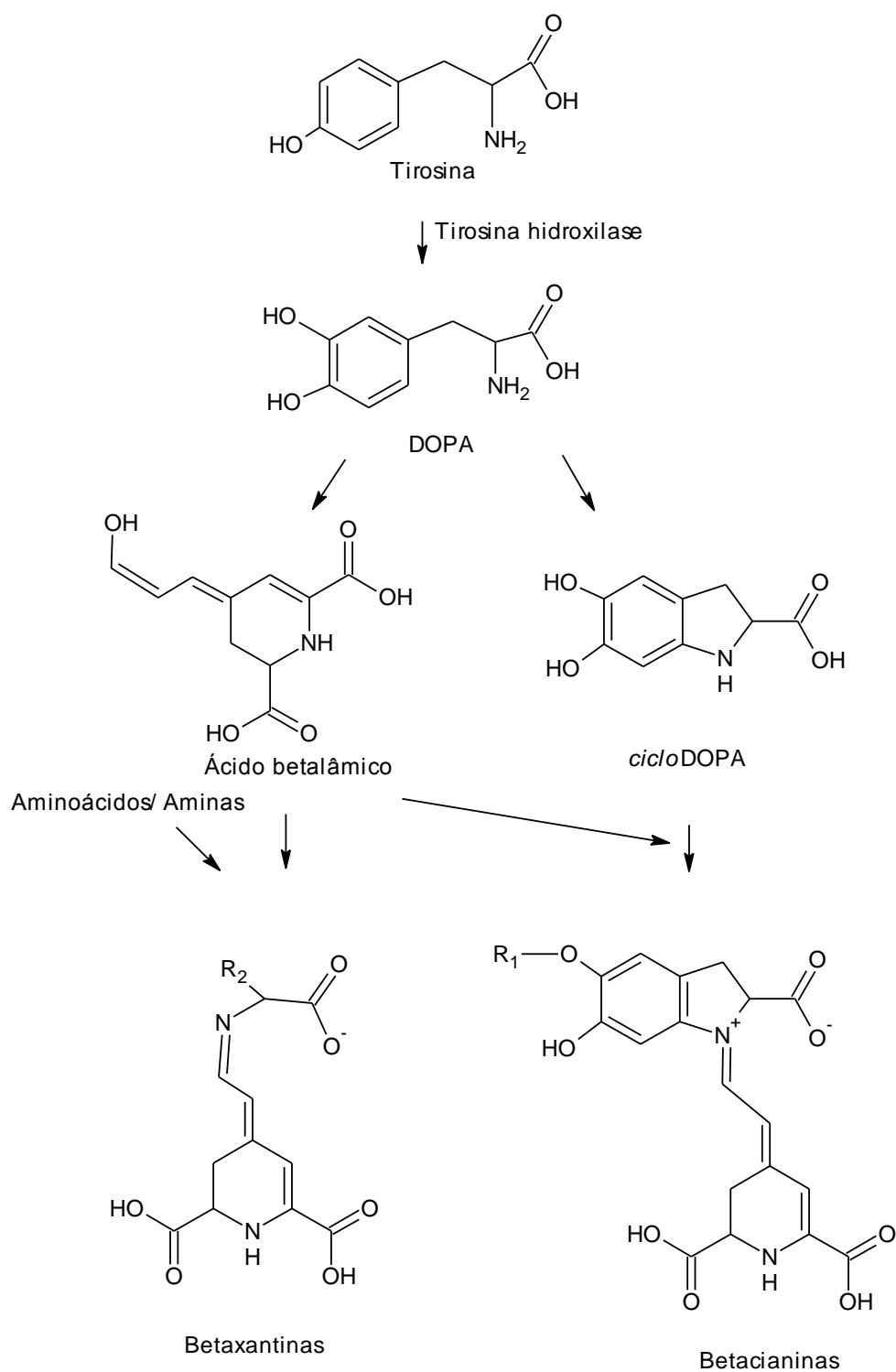
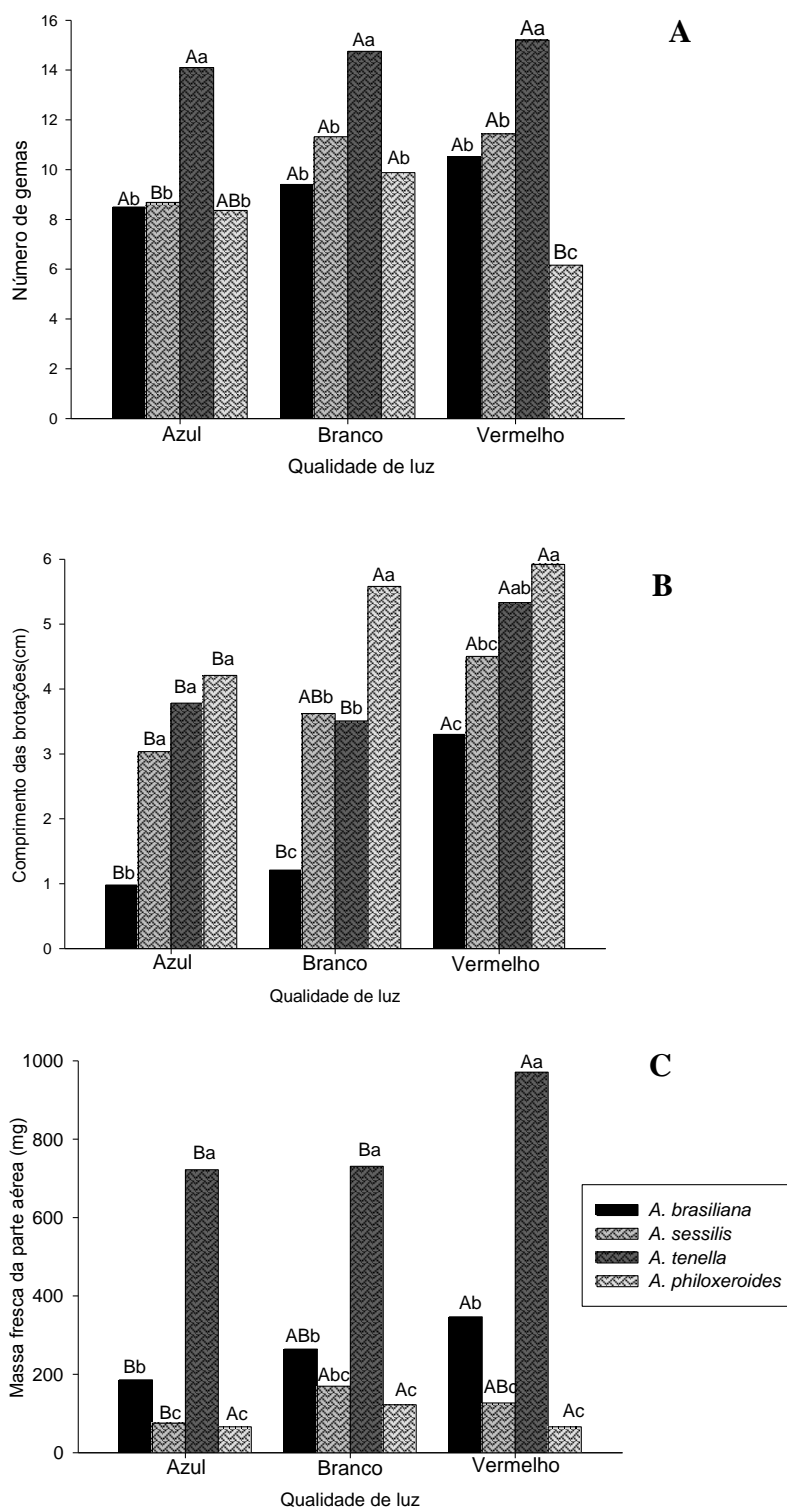


Figura 1 – Rota biossintética das betalainas. (R_1 : glicose no caso da betanina e H no caso da betanidina; R_2 : cadeia lateral de aminoácidos ou compostos amino, como a glutamina no caso da vulgaxantina I e R_2 é $-(CH_2)_2 - CO - NH_2$) (BHUIYAN; MURAKAMI; ADACHI, 2002).



Fi

Figura 2 – Efeito da qualidade de luz no número de gemas (A), comprimento (B) e massa fresca da parte aérea (C) em quatro espécies do gênero *Alternanthera*, cultivadas *in vitro*, durante 35 dias. Médias seguidas de letras maiúsculas distintas diferem entre si para qualidade de luz e médias seguidas de letras minúsculas distintas diferem entre si para espécie, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0.05$).



Figura 3. Plantas de *Alternanthera brasiliana* (A), *Alternanthera philoxeroides* (B), *Alternanthera tenella* (C) e *Alternanthera sessilis* (D) cultivadas *in vitro*, em meio MS, em diferentes qualidades de luz, durante 45 dias. A barra indica 1 cm e as plantas estão organizadas de acordo com a exposição nas luzes branca, azul e vermelha.

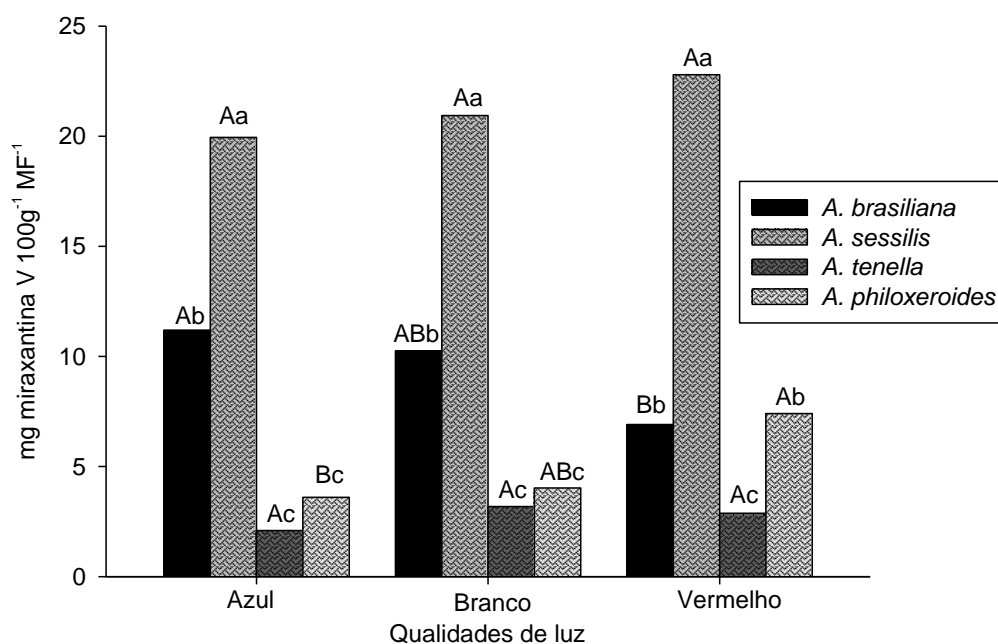


Figura 4 - Teor de betaxantinas totais da parte aérea de plantas de quatro espécies do gênero *Alternanthera*, cultivadas *in vitro*, sob diferentes qualidades de luz, durante 35 dias. Médias seguidas de letras maiúsculas distintas diferem entre si para qualidade de luz e médias seguidas de letras minúsculas distintas diferem entre si para espécie, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0.05$).

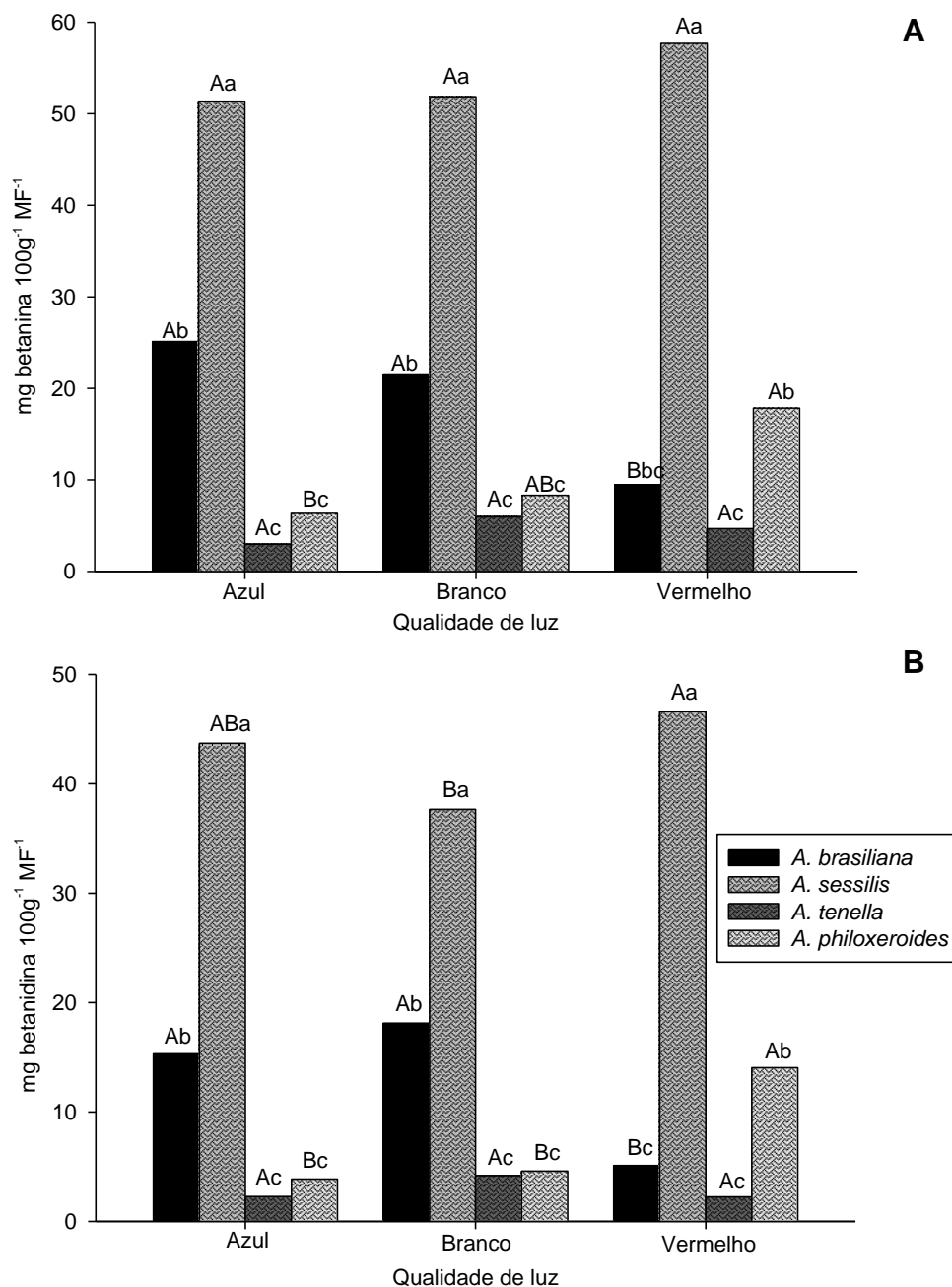


Figura 5 - Teor de betacianinas totais da parte aérea de plantas de quatro espécies do gênero *Alternanthera*, cultivadas *in vitro*, sob diferentes qualidades de luz, durante 35 dias. Foi utilizado como solvente o tampão fosfato, pH 6,0, (A) e tampão acetato/metanol (70/30%), pH 5,0 (B). Médias seguidas de letras maiúsculas distintas diferem entre si para qualidade de luz e médias seguidas de letras minúsculas distintas diferem entre si para espécie, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0.05$).

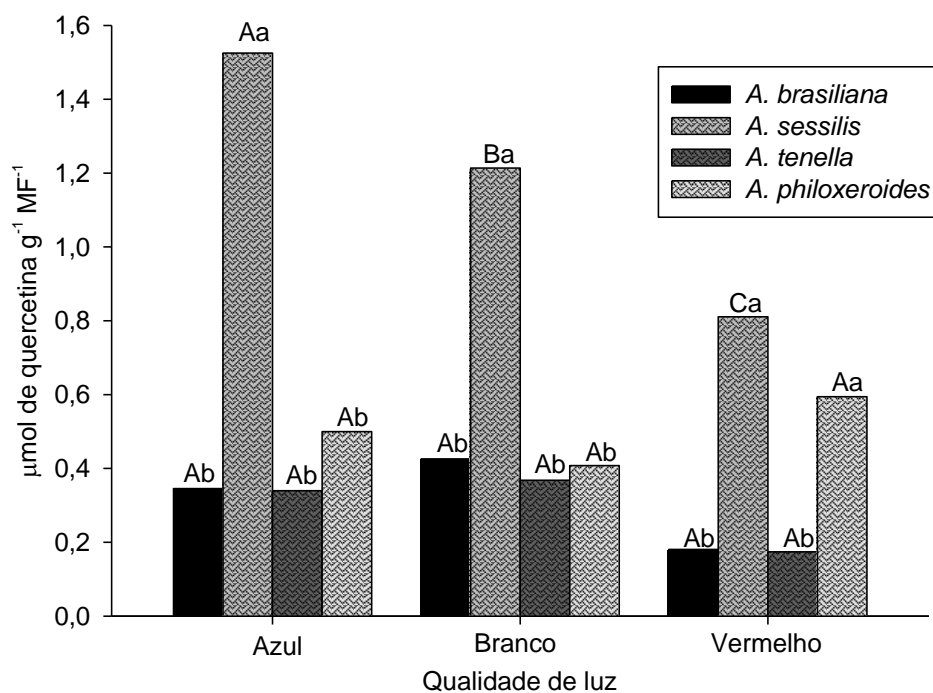


Figura 6 - Teor de flavonoides totais da parte aérea de quatro espécies do gênero *Alternanthera*, cultivadas *in vitro*, em diferentes qualidades de luz, durante 35 dias. Médias seguidas de letras maiúsculas distintas diferem entre si para qualidade de luz e médias seguidas de letras minúsculas distintas diferem entre si para espécie, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0.05$).

ARTIGO 2: REVISTA BRASILEIRA DE PLANTAS MEDICINAIS

Screening de reguladores de crescimento visando indução de calos em plantas do gênero *Alternanthera*

RESUMO:

Visando um passo inicial nos procedimentos relacionados à síntese de metabólitos secundários em calos, o presente estudo teve o objetivo de estabelecer um protocolo para indução de calos em plantas do gênero *Alternanthera*. As espécies *Alternanthera brasiliana*, *Alternanthera philoxeroides* e *Alternanthera sessilis* tiveram suas folhas e entrenós utilizados como explantes, cultivados em meio MS, em diferentes combinações de reguladores de crescimento, na ausência de luz. De acordo com os resultados encontrados, em *A. sessilis* e *A. brasiliana*, pôde-se demonstrar que os segmentos internodais proporcionaram maior indução de calogênese. A melhor resposta na formação de calos para explantes foliares em *A. sessilis* foi identificada nos meios formados somente por auxinas. Já em plantas de *A. brasiliana*, os entrenós foram melhores nos meios 2,5 mg L⁻¹ de ANA + 1,0 mg L⁻¹ de BAP; 0,75 mg L⁻¹ de AIA + 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D; 0,5 mg L⁻¹ de BAP + 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e 1,0 mg L⁻¹ de BAP + 0,5 mg L⁻¹ de 2,4-D. No meio 1,0 mg L⁻¹ de Cin + 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D, os dois explantes (folhas e entrenós) podem ser utilizados para a indução do processo de calogênese. A cultura de calos é extremamente importante em biotecnologia, pois proporciona muitas vantagens como sistema experimental, dessa forma, através desse estudo foi possível estabelecer um protocolo de indução de calos *in vitro*, em plantas de *Alternanthera*, que será utilizado como ferramenta para estudos visando o aumento da biossíntese de compostos fitoquímicos *in vitro*.

Palavras-chave: Fitorreguladores, indução de calos, calogênese, cultivo *in vitro*, plantas medicinais.

ABSTRACT:

Growth regulator screening aiming callus induction in *Alternanthera* plant genus. Targeting an early step in the procedures related to the secondary metabolites synthesis in callus, the present study has the aim to establish a callus induction protocol in genus *Alternanthera* plants. *Alternanthera brasiliana*, *Alternanthera philoxeroides* and *Alternanthera sessilis* plants had their leaves and internodes used as explants, cultivated on MS medium, in different combinations of growth regulators, in the absence of light. According to the results found in *A. sessilis* and *A. brasiliana*, it could be demonstrated that the internodal segments showed greater induction of callus formation. The best response in callus formation for leaf explants in *A. sessilis* was identified in the media only formed by auxin. Now for *A. brasiliana* plants, internodes were best in media ANA 2,5 mg L⁻¹ + BA 1,0 mg L⁻¹, IAA 0,75 mg L⁻¹ + 2,4-D 1,0 mg L⁻¹, BA 0,5 mg L⁻¹ + 2,4-D 1,0 mg L⁻¹ and BA 1,0 mg L⁻¹ + 2,4-D 0,5 mg L⁻¹. In the medium KIN 1,0 mg L⁻¹ + 2,4-D 1,0 mg L⁻¹, the two explants (leaves and internodes) can be used for callogenesis induction. The callus culture is extremely important in biotechnology because it provides many advantages as an experimental system, thus, through this study it was possible to establish a *in vitro* callus induction protocol, in *Alternanthera* plants, which will be used as a tool for studies aiming at increasing the biosynthesis of *in vitro* phytochemical compounds.

Key words: Phytoregulators, callus induction, callogenesis, in vitro culture, medicinal plants.

Várias espécies do gênero *Alternanthera* (Amaranthaceae) têm sido encontradas em países da América do Sul. No Brasil, estas plantas têm sido

comumente utilizadas na medicina popular para o tratamento de doenças. Estudos farmacológicos têm confirmado que algumas plantas desse gênero, incluindo *Alternanthera sessilis*, *Alternanthera philoxeroides* e *Alternanthera brasiliana* apresentam importantes características farmacológicas que justificam a sua utilização popular (Souza et al., 1998).

Uma espécie frequentemente empregada no tratamento de diversas doenças é a *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze, utilizada em processos infecciosos (Brochado et al., 2003) e dolorosos (Souza et al., 1998; Macedo et al., 2004), assim como, importantes atividades antioxidante e inibitória da proliferação de linfócitos humanos (Brochado et al., 2003; Pereira, 2007). Outra planta medicinal que vem sendo pesquisada quanto aos seus efeitos preventivos e terapêuticos é a *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Grisebach, é utilizada na medicina contra alergia, como diurética e antipirética, e em tratamentos de feridas e úlceras, além de apresentar comprovada ação antitumoral e antiviral (Perotti et al., 2010). As plantas de *Alternanthera sessilis* (L.) R. Br. ex DC. têm sido relatadas como colagogas, galactogogas, abortivas, febrífugas, digestivas, cicatrizantes, hepatoprotetoras e antioxidante natural (Lin et al., 1994; Anandkumar & Sachidanand, 2001; Jalalpure et al., 2008; Borah et al., 2011).

A cultura de células de plantas e de calos, atualmente, é uma importante estratégia para bioprospecção de produtos naturais (Salvador et al., 2009). As culturas de calos consistem em células vegetais com certo grau de diferenciação, que podem ser induzidas em resposta a estímulos organogênicos, utilizando distintos reguladores de crescimento e condições ambientais e, em geral, apresentam forma e tamanhos variados e paredes celulares com certo grau de espessamento (Gamborg & Phillips, 1995; Carvalho et al., 2011). A modificação da

concentração e do tipo de meio de cultura permite um significativo aumento na produção de biomassa e no acúmulo de metabólitos secundários (Rodríguez-Sahagún et al., 2012). A produção *in vitro* em grande escala de compostos bioativos para serem utilizados como fitoterápicos, produtos farmacêuticos, aditivos alimentares e cosméticos, deve ser incentivada devido à sua importância científica, econômica e ecológica (Salvador et al., 2009).

Dessa maneira, visando um passo inicial nos procedimentos relacionados à síntese de metabólitos secundários em calos, o presente estudo teve o objetivo de estabelecer um protocolo para indução de calos em plantas do gênero *Alternanthera*.

Foram utilizadas plantas de *A. brasiliana*, *A. philoxeroides* e *A. sessilis* estabelecidas em meio MS (Murashige & Skoog, 1962), com 30 g L⁻¹ de sacarose, 8g L⁻¹ de ágar, 100mg L⁻¹ de inositol, por 30 dias. As plantas foram mantidas em câmara de crescimento com densidade de fluxo de fótons de 22 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 16h de fotoperíodo e temperatura de 25°C ± 2 , pertencentes ao Banco de Plantas *in vitro* do Laboratório de Cultura de Tecidos da Universidade Federal de Pelotas, Brasil.

As plantas inteiras de *A. philoxeroides* (erva-de-jacaré), *A. brasiliana* (doril-anador) e *A. sessilis* (violácea) foram coletadas nos municípios de Rio Grande/RS (2006), Frederico Westphalen/RS (2005) e Pelotas/RS (2006), respectivamente. Após a identificação foi realizada pela agrônoma Élen Nunes Garcia e as suas exsiccatas foram depositadas no Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pelotas, RS, sob os números 24535, 24138 e 24534.

Foram utilizados como explantes folhas e entrenós de plantas de *A. sessilis*, *A. philoxeroides* e *A. brasiliana*, cultivadas *in vitro*. As folhas das três espécies foram seccionadas em segmentos de 0,5x1cm e laceradas diagonalmente três vezes,

enquanto que os entrenós de *A. sessilis* e *A. philoxeroides* mediam 1cm, e para a espécie *A. brasiliiana*, 0,1-0,2cm. Os explantes foram colocados em meio MS (Murashige; Skoog, 1962) contendo 30 g L⁻¹ de sacarose e 2g L⁻¹ de phytigel, suplementado de 100mg L⁻¹ de inositol, 0,5 mg L⁻¹ de adenina e 3 mg L⁻¹ de ácido ascórbico (AA), em placas de Petri (90 x 15mm), com diferentes combinações de reguladores de crescimento e mantidos em câmara de crescimento, na ausência de luz, a 25°C ±2.

Foram testadas cinco combinações de reguladores de crescimento para *A. brasiliiana*: Meio 1: 1mg L⁻¹ de cinetina (CIN) e 1mg L⁻¹ de ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D); Meio 2: 2,5 mg L⁻¹ de ácido naftalenoacético (ANA) e 1mg L⁻¹ de 5-benzilaminopurina (BAP); Meio 3: 0,75 mg L⁻¹ de ácido indolacético (AIA) e 1mg L⁻¹ de 2,4-D; Meio 4: 0,5 mg L⁻¹ de BAP e 1mg L⁻¹ de 2,4-D e Meio 5: 1 mg L⁻¹ de BAP e 0,5 mg L⁻¹ de 2,4-D. Os explantes permaneceram no escuro (E) durante 22 dias, e após esse período foram transferidos para a luz (L), onde ficaram durante oito dias, sob fotoperíodo de 16h, com temperatura de 25°C ±2.

Os explantes de *A. philoxeroides* foram inoculados em meios contendo diferentes concentrações de 2,4 D (0; 0,5; 1; 1,5 e 2mg L⁻¹) e BAP (0; 0,5; 1; 1,5 e 2mg L⁻¹), totalizando 25 combinações de reguladores. Para *A. sessilis* foram utilizados 20 meios, formados por diferentes combinações de fitorreguladores, sendo estes: 0,5; 1; 1,5 e 2mg L⁻¹ de BAP x 0,5; 1; 1,5 e 2mg L⁻¹ de 2,4-D e 2mg L⁻¹ de 2,4-D x 0,25; 0,5; 0,75 e 1mg L⁻¹ de AIA. Os explantes de *A. sessilis* permaneceram durante 15 dias em cultivo e os de *A. philoxeroides* durante 30 dias, ambos no escuro. Os meios foram renovados em intervalo máximo de 20 dias para todas as espécies.

A indução de calos em plantas de *A. sessilis*, *A. philoxeroides* e *A. brasiliiana* foi avaliada em dois tipos de órgãos, folhas e entrenós, buscando verificar a influência do meio MS acrescido de diferentes tipos de reguladores de crescimento, na indução de calos, com avaliações verificadas em dias determinados, após a inoculação dos explantes.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5x2 (cinco tipos de meio e dois órgãos) para *A. brasiliiana*; 20x2 (20 tipos de meio e dois órgãos) para *A. sessilis* e 25x2 (25 tipos de meios e dois órgãos) para *A. philoxeroides*. Cada tratamento foi constituído de quatro repetições, sendo considerada a unidade experimental uma placa de Petri contendo cinco explantes para *A. brasiliiana* e uma placa de Petri contendo 10 explantes para as demais. Os dados foram submetidos à análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro, com auxílio do software estatístico WinStat (Machado, Conceição 2002).

O desenvolvimento de culturas de calos é uma importante estratégia para bioprospecção de produtos naturais. No entanto, a produção *in vitro* de metabólitos bioativos pode ser considerada como resultado da interação das condições ambientais e do genótipo das plantas em cultura. Dessa maneira, fatores como meio de cultura e os seus constituintes (carboidratos, minerais, vitaminas e fitormônios), luz e temperatura, controle do metabolismo e o crescimento podem induzir o processo de calogênese, a obtenção de culturas celulares e a diferenciação celular (Salvador et al., 2003). A indução de calos ocorreu no escuro, onde há menor produção de compostos clorofilados e estes têm maior crescimento quando comparados com a condição luminosa, visto que a luz não ajuda no crescimento dos calos, conforme Hamideh et al. (2012).

TABELA 1. Percentagem de indução de calos em *Alternanthera philoxeroides*, cultivada em meio MS, com diferentes combinações de fitorreguladores (mg L^{-1}), após 30 dias no escuro

| Meios de Indução | Indução de calos (%)* | |
|-------------------------------|-----------------------|----------|
| | Folhas | Entrenós |
| Meio 1 (sem fitorregulador) | 0 | 0 |
| Meio 2 (0,5 BAP) | 0 | 0 |
| Meio 3 (1,0 BAP) | 0 | 16,5 |
| Meio 4 (1,5 BAP) | 18 | 8,25 |
| Meio 5 (2,0 BAP) | 0 | 33 |
| Meio 6 (0,5 2,4-D) | 0 | 0 |
| Meio 7 (0,5 2,4-D + 0,5 BAP) | 8,25 | 0 |
| Meio 8 (0,5 2,4-D + 1,0 BAP) | 0 | 0 |
| Meio 9 (0,5 2,4-D + 1,5 BAP) | 22 | 5,5 |
| Meio 10 (0,5 2,4-D + 2,0 BAP) | 0 | 0 |
| Meio 11 (1,0 2,4-D) | 8,25 | 16,5 |
| Meio 12 (1,0 2,4-D + 0,5 BAP) | 0 | 8,25 |
| Meio 13 (1,0 2,4-D + 1,0 BAP) | 0 | 8,25 |
| Meio 14 (1,0 2,4-D + 1,5 BAP) | 25 | 33,25 |
| Meio 15 (1,0 2,4-D + 2,0 BAP) | 37,5 | 18 |
| Meio 16 (1,5 2,4-D) | 0 | 8,25 |
| Meio 17 (1,5 2,4-D + 0,5 BAP) | 33,25 | 16,5 |
| Meio 18 (1,5 2,4-D + 1,0 BAP) | 16,5 | 8,25 |
| Meio 19 (1,5 2,4-D + 1,5 BAP) | 0 | 0 |
| Meio 20 (1,5 2,4-D + 2,0 BAP) | 16,5 | 24,75 |
| Meio 21 (2,0 2,4-D) | 16,5 | 8,25 |
| Meio 22 (2,0 2,4-D + 0,5 BAP) | 0 | 11 |
| Meio 23 (2,0 2,4-D + 1,0 BAP) | 25 | 16,5 |
| Meio 24 (2,0 2,4-D + 1,5 BAP) | 25 | 25 |
| Meio 25 (2,0 2,4-D + 2,0 BAP) | 25 | 25 |

*Não houve diferenças estatísticas entre os distintos órgãos e nem entre os diferentes meios.

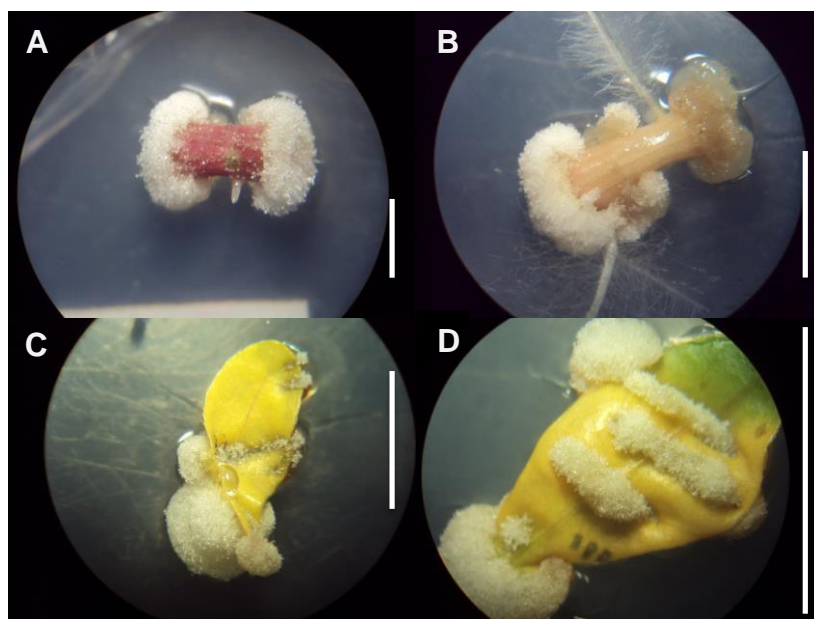


FIGURA 1 – Indução de calos em *Alternanthera philoxeroides*. (A e B) Calos foram induzidos em entrenós, sendo formados nas extremidades destes, 30 dias após a inoculação. (C e D) Calos formados nas extremidades e lacerações das folhas após 30 dias de cultivo em meio MS acrescido de fitorreguladores. A barra indica 1cm.

Dessa maneira, de acordo com os resultados obtidos com *A. philoxeroides*, visando à obtenção de combinações de reguladores de crescimento que promovam a formação de calos em cultura, não foram encontradas diferenças estatísticas que possam determinar o melhor órgão ou combinação de fitorreguladores, nos meios testados (Tab.1). No entanto, o maior percentual de calos formados foi nos meios 15 e 17, em explantes foliares, e nos meios 14 e 5, em explantes internodais, o que demonstra que a citocinina sozinha pode induzir a formação de calos em *A. philoxeroides*, porém a combinação de uma auxina e uma citocinina é mais efetiva na indução. Estes resultados mostram que concentrações iguais de auxinas e citocininas induz calos grandes e frágeis, com potencial para regeneração (Hamideh et al., 2012), diferindo do objetivo do presente trabalho.

TABELA 2. Percentual de indução de calos em *Alternanthera sessilis*, após 15 dias de cultivo no escuro, em meio MS, acrescido de diferentes combinações de fitorreguladores (mg L⁻¹)

| Meios de indução | Indução de calos (%)* | |
|--------------------------------|-----------------------|----------|
| | Folhas | Entrenós |
| Meio 1 (0,5 2,4-D + 0,5 BAP) | 0Cb | 20Aa |
| Meio 2 (0,5 2,4-D + 1,0 BAP) | 0Cb | 30Aa |
| Meio 3 (0,5 2,4-D + 1,5 BAP) | 16,7ABCb | 40Aa |
| Meio 4 (0,5 2,4-D + 2,0 BAP) | 0Cb | 30Aa |
| Meio 5 (1,0 2,4-D + 0,5 BAP) | 0Cb | 36,7Aa |
| Meio 6 (1,0 2,4-D + 1,0 BAP) | 0Cb | 43,3Aa |
| Meio 7 (1,0 2,4-D + 1,5 BAP) | 0Cb | 33,3Aa |
| Meio 8 (1,0 2,4-D + 2,0 BAP) | 16,7ABCa | 16,7Aa |
| Meio 9 (1,5 2,4-D + 0,5 BAP) | 0Cb | 20Aa |
| Meio 10 (1,5 2,4-D + 1,0 BAP) | 0Ca | 15Aa |
| Meio 11 (1,5 2,4-D + 1,5 BAP) | 0Ca | 16,7Aa |
| Meio 12 (1,5 2,4-D + 2,0 BAP) | 0Cb | 43,3Aa |
| Meio 13 (2,0 2,4-D + 0,5 BAP) | 0Cb | 30Aa |
| Meio 14 (2,0 2,4-D + 1,0 BAP) | 0Cb | 26,7Aa |
| Meio 15 (2,0 2,4-D + 1,5 BAP) | 13,3BCb | 33,3Aa |
| Meio 16 (2,0 2,4-D + 2,0 BAP) | 0Cb | 43,3Aa |
| Meio 17 (2,0 2,4-D + 0,25 AIA) | 50Aa | 46,7Aa |
| Meio 18 (2,0 2,4-D + 0,5 AIA) | 50Aa | 33,3Aa |
| Meio 19 (2,0 2,4-D + 0,75 AIA) | 36,7ABa | 46,7Aa |
| Meio 20 (2,0 2,4-D + 1,0 AIA) | 43,3ABa | 33,3Aa |

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

Inicialmente, houve intumescimento dos entrenós e formação de calos compactos, brancos, com escurecimento destes ao final das quatro semanas de estudo, conforme relatado por Irvani et al. (2010) e Noormi et al. (2012) em seus

trabalhos. O escurecimento dos calos demonstra sensibilidade dos tecidos ao 2,4-D, demonstrando que a cor é influenciada principalmente pela localização de compostos do metabolismo secundário, chamados fenóis, nas células. O acúmulo dos compostos fenólicos no citoplasma sofre a oxidação e polimerização e os produtos oxidados são de coloração parda (Sridhar & Naidu, 2011).

O surgimento dos calos ocorreu ao longo das bordas do corte, conforme pode ser visualizado na Fig. 1, confirmando o estudo realizado por Irvani et al. (2010), no qual os calos foram iniciados a partir de porções do corte do explante, em hipocótilos e cotilédones. Este fato pode ser explicado pelo fato de as células nas extremidades cortadas sofrerem mitose, o que leva à formação do calo devido à reação ao ferimento ou efeito do regulador do crescimento exógeno (Sridhar & Naidu, 2011).

A indução de calos em *A. sessilis* teve início aos 9 dias em cultivo, foi variável e dependeu das combinações de reguladores de crescimento aplicados e dos explantes utilizados. Em estudos *in vitro*, a aplicação de fitorreguladores perturba a polaridade celular e provoca desdiferenciação do tecido que resulta na formação de calo (Singh et al., 2011). Diferenças significativas e não significativas nos níveis de 2,4-D, BAP e AIA e suas interações podem ser visualizadas na Tab. 2. Ao final deste estudo, pôde-se demonstrar que os segmentos nodais proporcionaram maior indução de calogênese, diferindo de autores como Singh et al. (2011) e Kermanshahi et al. (2012) que determinaram hipocótilos e as gemas laterais como detentoras do maior percentual de indução.

A melhor resposta na formação de calos para explantes foliares foi identificada nos meios formados por auxinas (17 e 18, 19 e 20). Estudo realizado por Subbarayan et al. (2010) demonstraram a influência positiva do AIA, na formação do processo de calogênese em *A. sessilis*, visando a obtenção de linhagens celulares

produtoras de metabólitos, confirmando nossos resultados. Jiménez (2005) também relata que as auxinas estão relacionadas com a indução nas fases iniciais e altos níveis de AIA podem ser necessários para estabelecer um gradiente de maneira a tornar os tecidos competentes para a fase indutora da embriogênese ou organogênese.

Para entrenós de *A. sessilis* não foi verificada diferença estatística entre as 20 diferentes combinações de fitorreguladores utilizados, sendo que salientamos dentre eles os meios 17 e 19, com somente auxinas sendo utilizadas e os meios 6, 12 e 16, que apresentaram concentrações semelhantes de auxina e citocinina acrescidas ao meio MS, semelhante aos resultados encontrados por Singh et al. (2009). A presença de citocininas juntamente com auxinas com balanços hormonais intermediários é necessária para uma maior multiplicação celular e crescimento do calo (Skoog & Miller, 1957).

Na indução do processo de calogênese em folhas e entrenós, a textura dos calos variou de acordo com a natureza da proporção entre os reguladores: calos friáveis e translúcidos foram obtidos de ambos os explantes, nos meios 17, 18, 19 e 20, esse tipo de calo é especialmente utilizado em culturas celulares em suspensão, que podem ser explorados para produção comercial e isolamento de metabólitos secundários de interesse; nos demais meios, foram formados calos compactos, brancos, semelhante aos encontrados por Noormi et al. (2012) quando utilizaram altas concentrações de ANA, AIA e Dicamba na formação de calos em lírios (*Hymenocallis littoralis*).

TABELA 3. Percentual de indução de calos em *Alternanthera brasiliana*, cultivada em meio MS, acrescido de diferentes combinações de fitorreguladores (mg L^{-1}), após 22 dias no escuro e oito dias na luz

| Meios de indução | Indução de calos (%)* | |
|------------------------------|-----------------------|----------|
| | Folhas | Entrenós |
| Meio1 (1,0 Cin + 1,0 2,4-D) | 100Aa | 100Aa |
| Meio 2 (2,5 ANA + 1,0 BAP) | 70Bb | 100Aa |
| Meio 3 (0,75 AIA+ 1,0 2,4-D) | 0Bc | 95Aa |
| Meio 4 (0,5 BAP + 1,0 2,4-D) | 5Bc | 100Aa |
| Meio 5 (1,0 BAP + 0,5 2,4-D) | 0Bc | 100Aa |

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

Em *A. brasiliana*, os entrenós sofreram secção transversal e dessa forma foram inoculados no meio, conforme pode ser verificado na Fig. 2A. Ao final do estudo, nos meios testados observou-se que a utilização de explantes internodais se sobressai com relação aos explantes foliares. Entrenós foram melhores nos meios 2, 3, 4 e 5 e no meio 1, os dois explantes (folhas e entrenós) podem ser utilizados para a indução do processo de calogênese em plantas de *A. brasiliana*. Em estudo realizado por Gao et al. (2011) as hastes foram os explantes que apresentaram melhores condições na indução de calos em *A. philoxeroides*, com menor escurecimento do caule, com calos mais facilmente induzidos e com aumento rápido de tamanho comparado às folhas e pecíolos, confirmando nossos dados e diferindo de Macedo et al. (2004), que utilizou plântulas de *A. brasiliana* como explantes.

As pesquisas atuais têm conseguido produzir uma ampla variedade de fitoquímicos secundários em culturas de calos ou em suspensão, em outros casos, a produção destes compostos requer tecidos com maior diferenciação como órgãos em cultura ou microplantas. Um dos principais problemas é a falta de conhecimentos

básicos das vias biossintéticas e os mecanismos responsáveis pela produção dos metabólitos na planta (Karuppusamy, 2009). Alguns fatores *in vitro* podem coordenar ou alterar a taxa de produção de metabólitos secundários em plantas medicinais, como luminosidade, o tipo de frasco e o meio de cultura onde estas se encontram (Morais et al., 2012), de acordo com isso, as combinações de reguladores de crescimento empregadas no presente estudo, originaram distintas colorações nos calos, ao final dos 30 dias, como pode-se visualizar na Fig. 2B e 2C, nos quais alguns meios proporcionaram a formação de calos compactos brancos, enquanto outros produziram calos compactos pigmentados, de coloração rosácea. Exemplos como este são relatados em cultura de raízes, nas quais, em meios livres de hormônios os pigmentos formados eram semelhantes aos da cultivar da qual foram estabelecidos, porém, modificando os níveis de fitorreguladores foi possível aumentar o conteúdo de betacianinas e betaxantinas no sistema *in vitro*. Em culturas de calos de *Mammillaria candida*, as citocininas tiveram um efeito antagonista na produção de betalaínas (Georgiev et al., 2008).

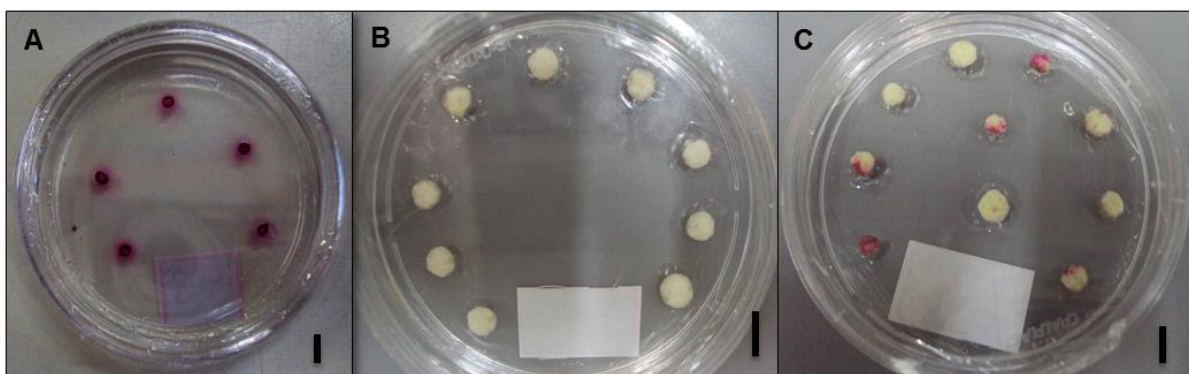


FIGURA 2 – Indução de calos em *Alternanthera brasiliana*. (A) Inoculação de explantes de entrenós em meio. (B) Calogênese em entrenós, gerando calos compactos, brancos e (C) calos compactos pigmentados, após 30 dias em cultivo (22 escuro + 8 luz).

A indução do crescimento de calos e subsequente diferenciação e organogênese é efetuada pela aplicação diferencial de reguladores de crescimento e controle das condições no meio de cultura. Com o estímulo de substâncias de

crescimento endógenas ou por adição de reguladores de crescimento exógenos ao meio, a divisão e crescimento celulares, assim como a diferenciação tecidual são induzidos (Tripathi & Tripathi, 2003). Segundo Gao et al. (2011), a formação de calos envolve desdiferenciação celular, divisão e crescimento, que são regulados por fitorreguladores como as auxinas e citocininas. De acordo com nossos experimentos, o processo de calogênese teve início aos 12 dias de decorrência do experimento e o meio 1 foi melhor para a indução em folhas de *A. brasiliana*, constatando a afirmação de Gao et al. (2011). Em entrenós os diferentes meios apresentaram grande formação de calos e não obtiveram diferenças estatísticas que pudessem os diferir. Gnanaraj et al. (2011) trabalhando com folhas e entrenós de *A. sessilis* encontraram grande indução em meios utilizando somente auxina (2,4-D).

Partes vegetativas das plantas, especialmente explantes internodais, são desejáveis por preservarem a identidade genética da planta mãe. A cultura de calos é extremamente importante em biotecnologia, pois proporciona muitas vantagens como sistema experimental para investigações biológicas. Avanços nessa área podem fornecer novos meios para a produção comercial de metabólitos secundários com valores inferiores aos encontrados atualmente. Dessa forma, um protocolo de indução de calos *in vitro* em plantas de *Alternanthera* foi desenvolvido e será utilizado como ferramenta para estudos visando o aumento da biossíntese de compostos fitoquímicos *in vitro*.

Referência Bibliográfica:

ANANDKUMAR, B.H.; SACHIDANAND, Y.N. Treatment of acne vulgaris with new polyherbal formulation clarina cream. **Indian Journal Dermatology**, v.46, p.1-3, 2001.

BORAH, A.; YADAV, R.N.S.; UNNI, B.G. *In vitro* antioxidant and free radical scavenging activity of *Alternanthera sessilis*. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v.2, p.1502-1506, 2011.

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

CARVALHO, A.C.P.P. de, TORRES, A.C.; BRAGA, E.J.B.; LEMOS, E.E.P. de; SOUZA; F.V.D.;PETERS, J.A.; WILLADINO, L.; CÂMARA, T.R. Glossário de cultura de tecidos de plantas. **Plant Cell Culture Micropropagation**, Lavras, v.7, n.1, p. 30-60, 2011.

GAMBORG, O. L.; PHILLIPS, G. C. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture – Fundamental Methods**. 1st ed. New York: Springer Publishers, 1995. 360p.

GAO, J.; LI, J.; LUO, C.; YIN, L.; LI, S.; YANG, G.; HE, G. Callus induction and plant regeneration in *Alternanthera philoxeroides*. **Molecular Biology Reports**, v. 38, p.1413–1417, 2011.

GEORGIEV, V.; ILIEVA, M.; BLEY, T.; PAVLOV, A. Betalain production in plant *in vitro* systems. **Acta Physiologia Plantarum**, v.30, p.581- 593, 2008.

GNANARAJ, W.E.; ANTONISAMY, J.M.A.; SUBRAMANIAN, K.M.; NALLYAN, S. Micropropagation of *Alternanthera sessilis* (L.) using shoot tip and nodal segments. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 3, p. 206-212, 2011.

HAMIDEH, J.; KHOSRO, P.; JAVAD, N.D.M. Callus induction and plant regeneration from leaf explants of *Falcaria vulgaris* an important medicinal plant. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n.18, p. 3407-3414, 2012.

IRVANI, N.; SOLOUKI, M.; OMIDI, M.; ZARE, A.R.; SHAHNAZI, S. Callus induction and plant regeneration in *Dorema ammoniacum* D., an endangered medicinal plant. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v.100, p.293–299, 2010.

JALALPURE, S.S.; AGRAWAL, 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.141-144, 2008.

JIMÉNEZ, V. M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. **Plant Growth Regulation**, v.47, p.91–110, 2005.

KARUPPUSAMY, S. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 3, n.13, p. 1222-1239, 2009.

KERMANSHAHI, L.S.; OMIDI, M.; MAJIDI, E.; NAGHAVI, M.; REZAZADEH, S. Callus induction and shoot regeneration in *Ducrosia anethifolia* an important threatened medicinal plant. **Advances in Environmental Biology**. v.6, ed.8, p.2372-2377, 2012.

LIN, S.C.; LIN, Y.H.; SHYUU, S.J.; LIN, C.C. Hepatoprotective effects of Taiwan folk medicine – *Alternanthera sessilis* on liver damage induced by various hepatotoxins. **Phytotherapy Research**, v.8, p.391-398, 1994.

MACEDO, A.F.; LAGE, C.L.; ESQUIBEL, M.A.; de SOUZA, M.M.; da SILVA, K.L.; NIERO, R.; CECHINEL-FILHO, V. Preliminary phytochemical and pharmacological studies on plantlets of *Alternanthera brasiliana* cultured under different spectral quality of lights. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v.23, p.515-519, 2004.

MACHADO, A.; CONCEIÇÃO, A. R. **Programa estatístico WinStat – Sistema de Análise Estatístico para Windows**, versão 2.0. Pelotas, RS, 2002.

MORAIS, T.P.; LUZ, J.M.Q.; SILVA, S.M.; RESENDE, R.F.; SILVA, A.S. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Revista Brasileira Plantas Medicinais**, v.14, n.1, p.110-121, 2012.

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

NOORMI, R.; MURUGAIYAH, V.; SUBRAMANIAM, S. Optimization of callus induction medium for *Hymenocallis littoralis* (Melong kecil) using root and bulb explants. **Journal of Medicinal Plants Research**. v. 6, n.12, p. 2309 -2316, 2012.

PEREIRA, D. F. **Morfoanatomia e histoquímica comparativa entre *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze e *Alternanthera dentata* (Moench) Stuchlik**: estudo fitoquímico e biológico de *Alternanthera brasiliana*. 2007. 111p. Dissertação (Mestrado – Área de Concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brasil.

PEROTTI, J.C.; RODRIGUES, I.C.S.; KLEINOWSKI, A.M.; RIBEIRO, M.V.; EINHARDT, A.M.; PETERS, J.A.; BACARIN, M.A.; BRAGA, E.J.B. Produção de

betacianina em erva-de-jacaré cultivada *in vitro* com diferentes concentrações de sulfato de cobre. **Ciência Rural**, v.40, n.9, p.1874-1880, 2010.

RODRÍGUEZ-SAHAGÚN, A.; TORO-SÁNCHEZ, C.L. del; GUTIERREZ-LOMELÍ, M.; CASTELLANOS-HERNÁNDEZ, O.A. Plant cell and tissue culture as a source of secondary metabolites. In: ORHAN, I.E. **Biotechnological Production of Plant Secondary Metabolites**. (1st ed.). Turkey: Bentham Books, 2012, p.3-20.

SALVADOR, M. J.; PEREIRA, P. S.; FRANÇA, S. C.; CANDIDO, R. C.; ITO, I. Y.; DIAS, D. A. Bioactive chemical constituents and comparative antimicrobial activity of callus culture and adult plant extracts from *Alternanthera tenella*. **Verlag der Zeitschrift für Naturforschung**, v.64, p. 373- 381, 2009.

SALVADOR, M.J.; PEREIRA, P.S.; FRANÇA, S.C.; CANDIDO, R.C.; ITO, I.Y.; DIAS, D.A. Comparative study of antibacterial and antifungal activity of callus culture and adult plants extracts from *Alternanthera maritima* (Amaranthaceae). **Brazilian Journal of Microbiology**, v.34, p.131-136, 2003.

SINGH, A.; KANDASAMY, T.; ODHAV, B. *In vitro* propagation of *Alternanthera sessilis* (sessile joyweed), a famine food plant. **African Journal of Biotechnology**. v. 8, ed. 21, p.5691-5695, 2009.

SINGH, R.; KHARB, P.; RANI, K. Rapid micropropagation and callus induction of *Catharanthus roseus in vitro* using different explants. **World Journal of Agricultural Sciences**, v.7, ed.6, p. 699-704, 2011.

SKOOG, F.; MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, v.11, p.118-231, 1957.

SOUZA, M.M. de, KERN, P., FLORIANI, A.E.O.; CECHINEL-FILHO, V. Analgesic Properties of a hydroalcoholic extract obtained from *Alternanthera brasiliana*. **Phytotherapy Research**, v.12, p.279–281, 1998.

SRIDHAR, T.M.; NAIDU, C.V. An efficient callus induction and plant regeneration of *Solanum nigrum* (L.) - An important antiulcer medicinal plant. **Journal of Phytology**, v.3 ed.5, p.23-28, 2011.

SUBBARAYAN, K.; VARADHARAJAN, N.; KALYANARAMAN, R. Indole-3-acetic acid from contaminant fungus and potential application for cell cultures of *Alternanthera sessilis*. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v.1, ed.4, p.257-262, 2010.

TRIPATHI, F.L.; TRIPATHI, J.N. Role of biotechnology in medicinal plants. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v.2, n.2, p.243-253, 2003.

ARTIGO 3 – Journal of Integrative Plant Biology
METABÓLITOS SECUNDÁRIOS REGULADOS PELA LUZ EM CALOS DE
Alternanthera brasiliana

Resumo:

As betalaínas são pigmentos vacuolares nitrogenados hidrossolúveis, composto por betacianinas vermelho-rosáceas e betaxantinas amarelas presentes nas plantas da ordem Caryophyllales. Este artigo buscou definir, para a espécie *Alternanthera brasiliana*, um protocolo indutor de calos e da biossíntese de betalaínas em luz branca, assim como, investigar a influência do espectro luminoso (azul, branco e vermelho) na produção de metabólitos secundários em calos formados em diferentes meios. Entrenós e folhas de *A. brasiliana* foram inoculados em meio MS, acrescido de cinco diferentes combinações de fitorreguladores, onde cresceram durante 30 dias, após esse período foram cultivados em luz branca em um meio de cultura contendo TDZ e ANA (MIB), onde ficaram 45 dias e na sequência foram realizadas as análises. Entrenós de *A. brasiliana* forma inoculados em três diferentes meios de cultivo e posteriormente foram transferidos para o MIB e para a luz azul, branca e vermelha, nas quais permaneceram por 40 dias. Por meio das análises realizadas, pode-se observar que o melhor órgão para indução de calogênese na planta em estudo são os entrenós e que o meio que produz calos com maior concentração de betacianina é suplementada com AIA e 2,4-D.

Palavras-chave: Plantas medicinais, calogênese, luminosidade, betalaínas.

Introdução

As pesquisas na área de corantes naturais têm aumentado nos últimos anos, uma vez que os corantes sintéticos estão apresentando avaliações negativas dos consumidores. Dessa maneira, há um aumento no uso de pigmentos naturais como os carotenoides, as antocianinas (flavonoides) e as betalaínas. Estas últimas, possuem diversas atividades biológicas como antioxidante, anti-inflamatória, hepatoprotetora e antitumoral (Georgiev et al. 2008, 2010) com aplicabilidade crescente na indústria alimentar, cosmética e farmacêutica (Biswas et al. 2013).

As betalaínas são pigmentos vacuolares nitrogenados hidrossolúveis, que substituem as antocianinas em um pequeno número de famílias de plantas

taxonomicamente relacionadas. Estruturalmente, são imônio derivados do ácido betalâmico e o cromóforo é resultado do sistema de ressonância do 1,7-diazaheptametino, que exhibe três duplas ligações conjugadas (Herbach et al. 2006). As betalaínas não pertencem ao grupo dos alcalóides, pois na natureza se apresentam na forma ácida devido à presença de vários grupos carboxilas (Delgado-Vargas et al. 2000).

As betaxantinas, de coloração amarela, emitem autofluorescência verde e são produtos da condensação espontânea do ácido betalâmico e aminoácidos ou aminas. Já as betacianinas, são vermelho-violáceas e originam-se da condensação, também espontânea, do ácido betalâmico com a *cyclo*-Dopa (*cyclo*-3-(3,4-dihidroxifenilalanina), conforme pode ser visualizado na figura 1. As betacianinas são geralmente O-glicosiladas (no C-5 ou C-6) e frequentemente sofrem acilação posterior. A aglicona de ácido betalâmico, formada pela condensação da *ciclo*-DOPA é denominada betanidina e forma a 5-O-glicosilado betanina (Gandia-Herrero et al. 2010; Harris et al. 2012).

A forte demanda para o mercado de produtos naturais renováveis despertou a atenção para a viabilidade técnico-comercial de uma variedade de sistemas, explorando as plantas *in vitro* e cultivos celulares como potenciais biofábricas de produtos fitoquímicos, nos quais a produção pode ser mais confiável, simples e previsível (Karuppusamy 2009). Além disso, a capacidade de células vegetais, calos e tecidos cultivados *in vitro* de produzir e acumular compostos químicos é, em muitos casos, maior do que o das plantas cultivadas *ex vitro* (Rao e Ravishankar 2002). A manutenção de microambientes cuidadosamente controlados e assépticos oferece uma excelente fonte para a investigação em profundidade acerca de vias metabólicas e bioquímicas (Namdeo 2007), além de permitir a utilização de elicitores (agentes químicos e estressantes), para alterar as vias metabólicas, afetando qualitativamente e quantitativamente os compostos do metabolismo secundário (Zhao et al. 2005).

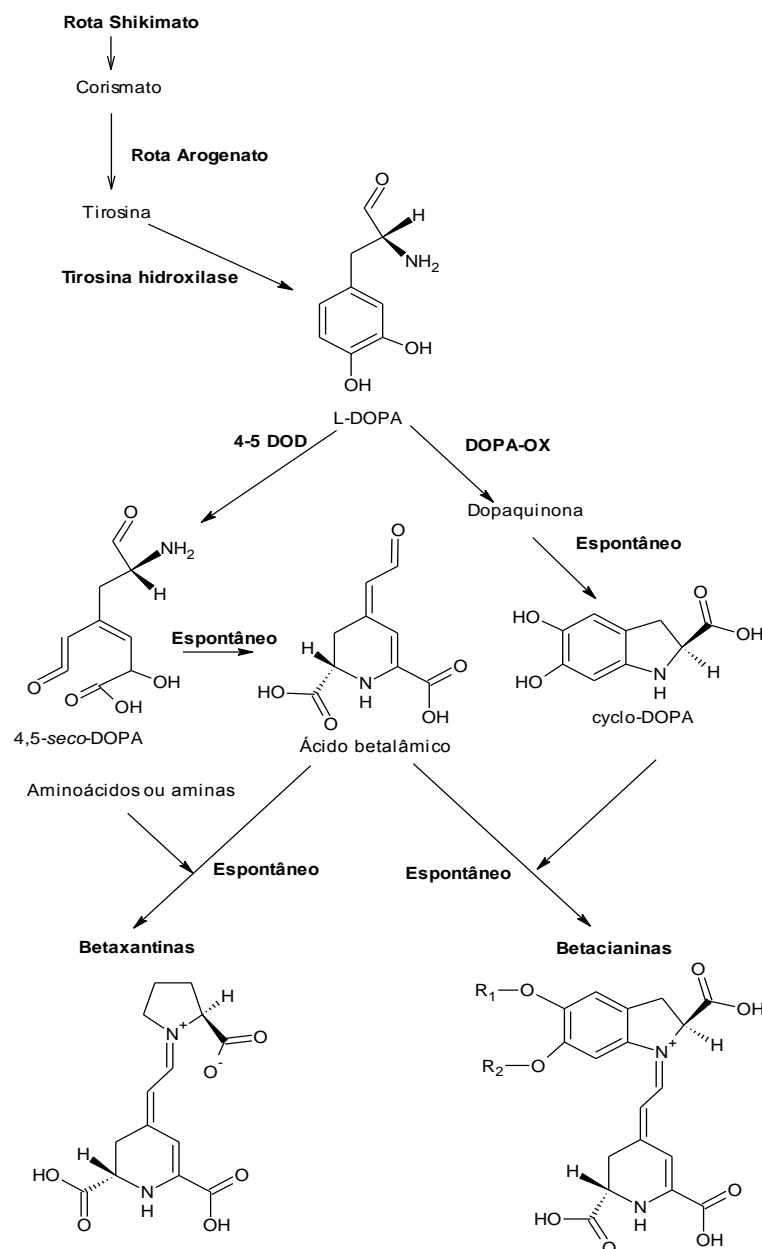


Figura 1 – Esquema da rota de biossíntese das betalainas proposto por Harris et al. (2012). Abreviações: 4,5DOD, DOPA-4,5-dioxygenase; DOPA-OX, DOPA oxidase.

A capacidade de culturas celulares, teciduais e de órgãos vegetais produzirem e acumularem muitos dos compostos químicos encontrados nas plantas *in natura* tem sido reconhecida desde o início da biotecnologia (Karuppusamy 2009). As plantas e as culturas de células são fontes alternativas de substâncias bioativas de plantas, incluindo os pigmentos betalainas. Claramente, um número de sistemas *in vitro* pode produzir betaxantinas e betacianinas e existem várias estratégias para aumento da produção destes (Georgiev et al. 2008).

Estímulos físicos, utilizando a luz como agente elicitor, são amplamente utilizados em cultura de tecidos vegetais, com o intuito de maximizar a produção de

compostos secundários de interesse (Zhao et al. 2005). Sabe-se que a luz vermelha e a luz azul têm sido empregadas para suscitar diferentes expressões fenotípicas via percepção de sinais e rotas de transdução (Kishima et al. 1995). Além disso, a luz é especialmente importante, pois pode induzir a síntese de betalaínas como ocorreu em beterraba vermelha (*Beta vulgaris vulgaris*), plântulas de *Amaranthus caudatus*, calos de *Portulaca*, culturas celulares de *Chenopodium album* e calos de *Alternanthera brasiliana* (Zhao et al. 2010).

A *Amaranthaceae Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze apresenta ampla distribuição de exemplares na América do Sul (Delaporte et al. 2005) e possui a capacidade de armazenar pigmentos das classes das betalaínas (betacianinas e betaxantinas), assim como flavonoides (Andreazza et al. 2013). É empregada na medicina tradicional para o tratamento de diversas patologias, incluindo tosse, diarreia, infecções e atividade analgésica (Facundo et al. 2012). Apresenta comprovadas ações, antiproliferativa dos linfócitos, anti-inflamatória, antiedematosa, antioxidante e para tratamento do vírus da herpes simples (Macedo et al. 2011).

Com base no exposto, acredita-se que a espécie *A. brasiliana* é potencial fonte para estudos que envolvam diferentes qualidades de luz no incremento de metabólitos secundários incluindo as betalaínas. Dessa maneira, o objetivo do presente trabalho foi definir, para a espécie *Alternanthera brasiliana*, um protocolo indutor de calos e de biossíntese de betalaínas em luz branca, assim como, investigar a influência de distintos espectros na produção de metabólitos secundários em calos formados nos diferentes meios.

Resultados

Experimento I - Indução de calos e crescimento em luz branca

Processo de calogênese

Foram visualizados calos iniciais nos entrenós de todos os meios de cultura aos 12 dias em tratamento, porém, em explantes foliares, somente foram visualizados em todos os meios, aos 37 dias em cultivo, demonstrando que o entrenó é o órgão com indução de calos mais rápida na espécie em estudo. Aos 30 dias observou-se que o percentual de indução em entrenós manteve-se elevado nos

cinco meios testados, porém, em folhas somente o meio 1 apresentou explantes com 100% de calos formados (tabela 1).

Quanto às avaliações correspondentes ao melhor meio para obtenção de calos em cada órgão, observou-se que a cinetina acompanhada do 2,4-D apresentaram uma interação positiva no processo de calogênese inicial em explantes foliares de *A. brasiliiana*, chegando a 100% aos 30 dias após a inoculação. Para entrenós, não houve diferenças estatísticas nos cinco meios testados, independente do período de avaliação, sendo todos considerados ótimos indutores para esse órgão aos 12 dias de tratamento.

Tabela 1. Percentual de indução de calos em explantes de *Alternanthera brasiliiana* em distintos dias de cultivo em meio MS, acrescido de diferentes reguladores de crescimento

| Meios (mg L ⁻¹) | 12 dias | | 30 dias | | 37 dias | |
|------------------------------|----------|--------|----------|--------|----------|---------|
| | Entrenós | Folhas | Entrenós | Folhas | Entrenós | Folhas |
| Meio1 (1,0 Cin + 1,0 2,4-D) | 100Aa | 20Ba | 100Aa | 100Aa | 100Aa | 100Aa |
| Meio 2 (2,5 ANA + 1,0 BAP) | 85Aa | 0Bb | 100Aa | 70Bb | 100Aa | 80Aa |
| Meio 3 (0,75 AIA+ 1,0 2,4-D) | 95Aa | 0Bb | 95Aa | 0Bc | 100Aa | 95Aa |
| Meio 4 (0,5 BAP + 1,0 2,4-D) | 100Aa | 5Bab | 100Aa | 5Bc | 95Aa | 77,5Aa |
| Meio 5 (1,0 BAP + 0,5 2,4-D) | 100Aa | 0Bb | 100Aa | 0Bc | 100Aa | 75,25Aa |

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

Aspecto e Intensidade dos pigmentos

Após 60 dias de tratamento os calos foram avaliados qualitativamente quanto às suas pigmentações, e conforme pode ser visualizado na figura 2, aos 37 dias de cultivo, já apresentavam diferenças dependendo do meio de cultivo a que estavam expostos. Pode-se verificar que no meio 2 não havia coloração magenta dos calos, no meio 1 alguns dos explantes estavam com pigmentos róseos e nos meios 3, 4 e 5 havia uma maior heterogeneidade de cores, com maior formação de pigmentos rosáceos.

Os valores referentes ao aspecto e intensidade da coloração nos explantes, entrenós e folhas, estão representados na tabela 2. Pode-se observar que para a variável aspecto da coloração, ambos os órgãos apresentaram boa pigmentação,

com as médias variando de 0,75 a 2 para entrenós e de 0,5 a 2 para folhas. Os meios que mais contribuíram para a produção de pigmentos foi o meio 5 e o meio 3 para entrenós e folhas, respectivamente, sendo que para ambos os explantes o meio 4 não diferiu estatisticamente quanto à coloração apresentada. Os explantes foliares colocados em meio contendo somente auxinas (meio 3) obtiveram uma maior pigmentação em relação aos demais meios, ao final dos 60 dias em cultivo. Nos explantes internodais, percebeu-se que uma concentração duas vezes maior de citocinina, em relação à de auxina com maior produção aparente dos pigmentos.

Na avaliação da intensidade de coloração, os cinco meios foram capazes de produzir coloração de intensidade moderada a alta tanto em calos de explantes foliares quanto internodais, não demonstrando diferenças estatísticas entre eles.

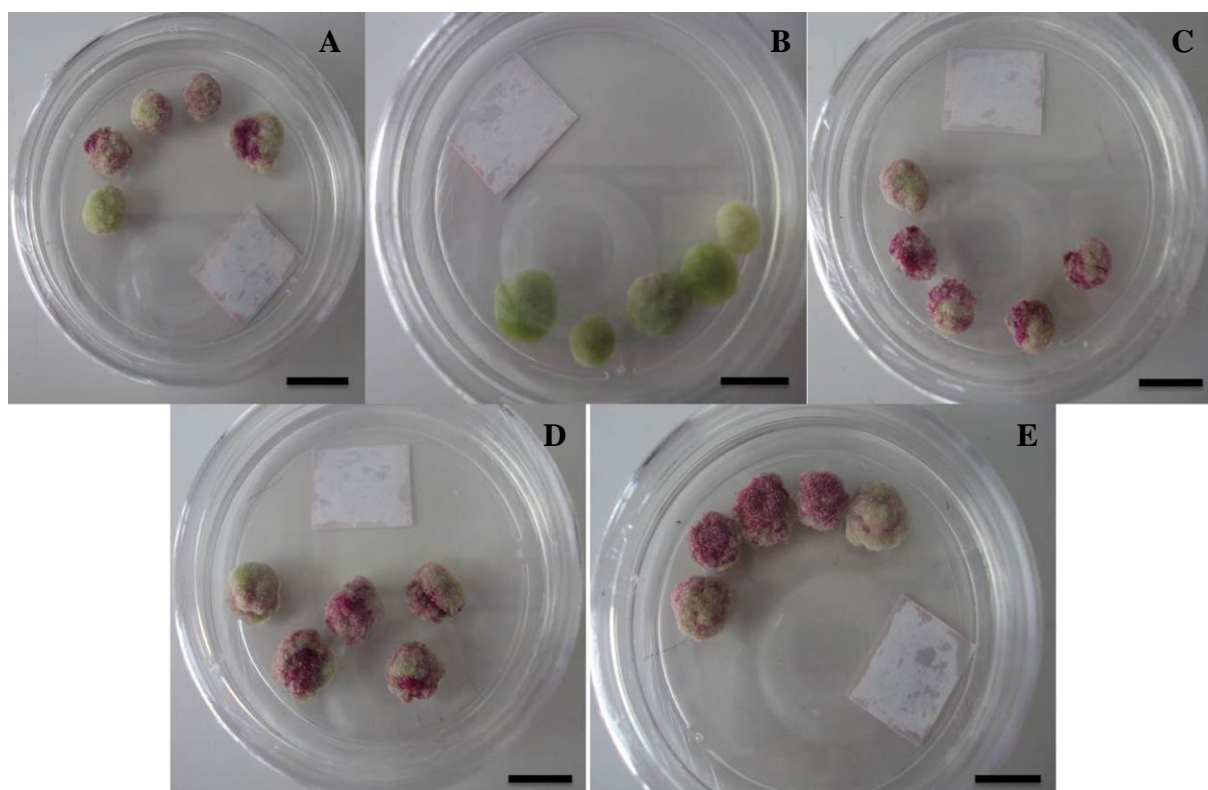


Figura 2 – Pigmentação em calos de plantas de *Alternanthera brasiliana* utilizando entrenós como explantes em diferentes meios de cultura, após 35 dias de cultivo. (A) Meio 1: 1mg L⁻¹ de CIN e 1mg L⁻¹ de 2,4-D; (B) Meio 2: 2,5 mg L⁻¹ de ANA e 1mg L⁻¹ de BAP; (C) Meio 3: 0,75 mg L⁻¹ de AIA e 1mg L⁻¹ de 2,4-D; (D) Meio 4: 0,5 mg L⁻¹ de BAP e 1mg L⁻¹ de 2,4-D e (E) Meio 5: 1 mg L⁻¹ de BAP e 0,5 mg L⁻¹ de 2,4-D. A barra indica 1cm.

Tabela 2 - Efeito dos reguladores de crescimento no aspecto e intensidade da coloração de calos de entrenós e folhas (respectivamente) de *Alternanthera brasiliana* com 60 dias

| Meio (mg L ⁻¹) | Aspecto da coloração* | | Intensidade da coloração** | |
|------------------------------|-----------------------|--------|----------------------------|-----------|
| | Entrenós | Folhas | Entrenós | Folhas |
| Meio1 (1,0 Cin + 1,0 2,4-D) | 0,75Aab | 0,75Aa | 1,25Aa | 1,25Aa*** |
| Meio 2 (2,5 ANA + 1,0 BAP) | 0,5Ab | 0,75Aa | 1Aa | 1,25Aa |
| Meio 3 (0,75 AIA+ 1,0 2,4-D) | 1Bab | 2Aa | 1Aa | 1,75Aa |
| Meio 4 (0,5 BAP + 1,0 2,4-D) | 1,25Aab | 1,75Aa | 1,5Aa | 2,5Aa |
| Meio 5 (1,0 BAP + 0,5 2,4-D) | 2Aa | 1Ba | 3Aa | 2Aa |

*Os valores referentes ao aspecto da coloração representam a média de quatro avaliadores que quantificavam da seguinte maneira: 0 (ausência de coloração magenta), 1 (calos com pontos vermelhos ao acaso), 2 (50% magenta), 3 (100% magenta).

**Os valores referentes à intensidade dos pigmentos dos calos representam a média de quatro avaliadores que quantificavam da seguinte maneira: 0 (inexistente), 1 (baixa), 2 (moderada), 3 (alta).

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

Betacianinas totais - Análise em cromatografia líquida de alta eficiência

Após a obtenção do extrato aquoso de calos provenientes de entrenós, procedeu-se a análise de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cujos resultados são apresentados na figura 3. Visualizou-se maior incremento de betalaínas nos extratos de calos oriundos do meio 3, com 262 µmol de amarantina/g de massa seca (MS), seguido do meio 1 com 174 µmol de amarantina/g MS.

Na figura 4 está representado o perfil cromatográfico em CLAE do extrato aquoso de calos cultivados no meio 3, monitorados a 536nm. Uma confirmação mais direta e confiável da composição molecular de betalaínas resultou da espectrometria de massa que gerou, conforme esperado, íons moleculares protonados e vários íons de fragmento. Por meio da análise do espectro de massa, foi confirmada a presença de amarantina nos extratos aquosos dos calos de *A. brasiliana* presentes no meio 3, devido ao padrão de fragmentação para esta espécie molecular.

A presença da amarantina (maior pico no cromatograma, figura 3-B) foi confirmada por apresentar propriedades espectrais idênticas às do padrão, pela presença dos seu íons protonados moleculares com m/z 727 e m/z 389, devido à presença das agliconas protonadas [betanidina + H]⁺ ou [isobetanidina + H]⁺, diferindo molecularmente pela configuração do carbono quiral C-15.

A presença de betalaínas individuais foi inicialmente analisada por CLAE com detector de arranjo de fotodiodos e por meio destes perfis cromatográficos, pode-se calcular a concentração de amarantina presente nos calos cultivados nos diferentes meios de cultura, ao final dos 60 dias de tratamento. No meio que apresentou maior concentração de amarantina, foram encontrados quatro picos principais quando o cromatograma foi monitorado aos 536nm, com o auxílio do padrão (amarantina), pode-se dizer que se tratam das moléculas de amarantina (betanidina-5-O- β -glicuronosilglicosídeo) com tempo de retenção (tr) de 15,77min, isoamarantina (isobetanidina-5-O- β -glicuronosilglicosídeo) com tr de 16,87min, betanidina com tr de 18,28min e isobetanidina com tr de 19,65min.

Experimento II - Indução de calos e crescimento em diferentes condições de luz

Aspecto e Intensidade dos pigmentos

Buscando determinar os efeitos das diferentes qualidades de luz na produção de pigmentos nos calos de *A. brasiliiana*, estes foram cultivados sob um período no escuro e, posteriormente passaram para a luz. A partir deste período, iniciaram as primeiras modificações nas suas colorações, que foram intensificadas quando ocorreu a transferência dos meios para as diferentes qualidades de luz, passando da cor branca, característica de calos cultivados no escuro, para as cores: verde, rosa ou magenta, conforme pode ser visualizado na figura 5. Algumas modificações da pigmentação não foram evidenciadas em toda a superfície epidérmica, mas somente em setores específicos, formando um mosaico de cores.

Os calos que foram crescendo, no decorrer dos 40 dias no Meio de Indução de Betacianinas (MIB) eram compostos de massas bastante compactas de células esféricas brancas, verdes e magenta, e com coloração de superfície opaca (figura 5). Ao serem cultivadas em luz vermelha, observou-se que todas as combinações de reguladores testadas geraram algum tipo de oxidação nos calos.

As diferenças fenotípicas relacionadas às cores, possivelmente, foram devido à composição dos meios utilizados para a iniciação do processo de calogênese e às radiações luminosas nas quais estiveram expostas por 40 dias. Dessa maneira, buscando avaliar adequadamente estas diferenças procederam-se as análises relacionadas ao aspecto da coloração para determinar as diferentes composições de pigmentos presentes nestes grupos celulares e a intensidade da coloração que

procura determinar as nuances de cores presentes e acumuladas que compõe estas massas celulares.

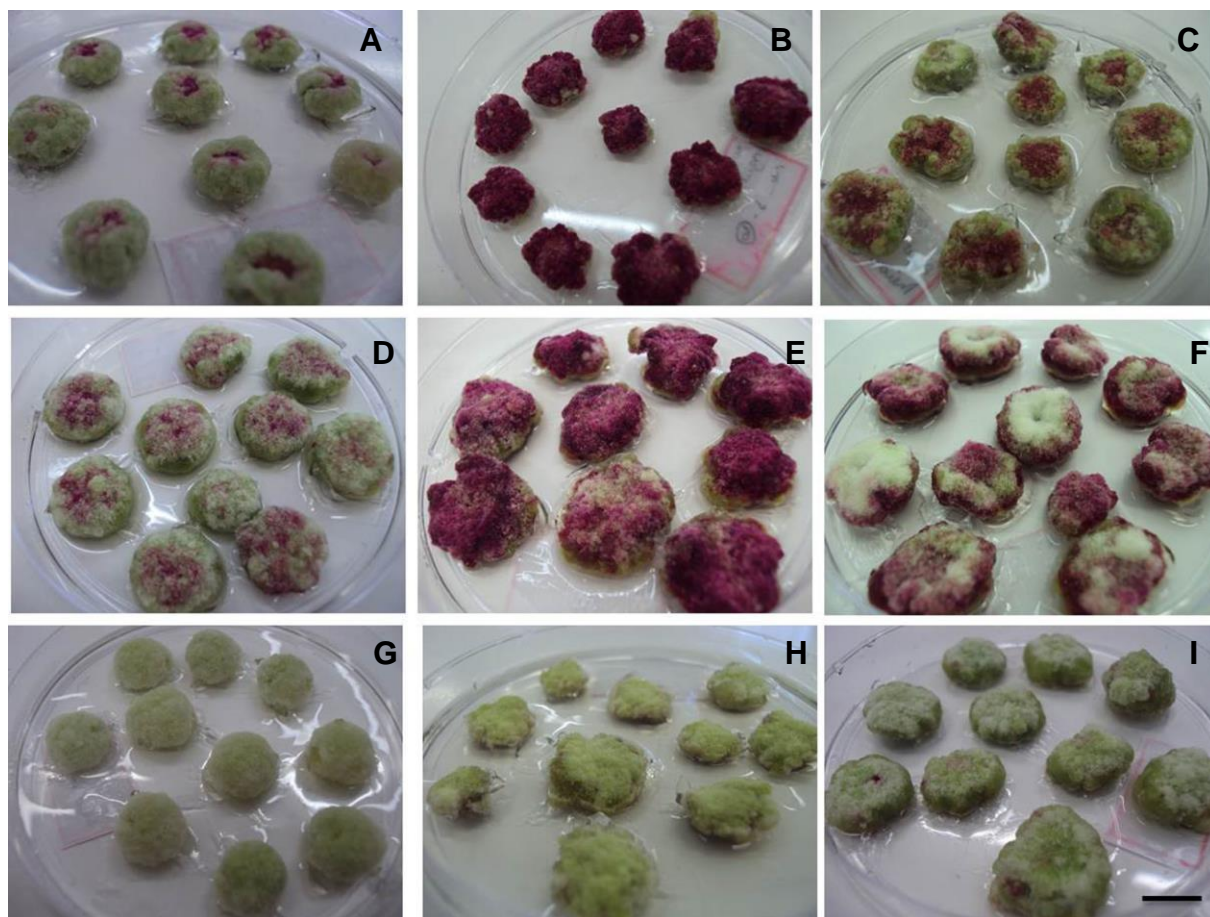


Figura 5 – Pigmentação em calos de *Alternanthera brasiliana* utilizando entrenós como explantes em diferentes meios de cultura e cultivados em diferentes qualidades de luz durante 40 dias, em Meio de Indução de Betacianinas (MIB). (A) Meio 1: 1 mg L^{-1} de CIN e 1 mg L^{-1} de 2,4-D + MIB ($0,5\text{ mg L}^{-1}$ de TDZ e 1 mg L^{-1} de ANA), cultivado na luz azul; (B) Meio 2: $0,75\text{ mg L}^{-1}$ de AIA e 1 mg L^{-1} de 2,4-D + MIB, cultivado na luz azul; (C) Meio 3: 1 mg L^{-1} de BAP e $0,5\text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D + MIB, cultivado na luz azul; (D) Meio 1 + MIB, cultivado na luz branca; (E) Meio 2 + MIB, cultivado na luz branca; (F) Meio 3 + MIB, cultivado na luz branca; (G) Meio 1 + MIB, cultivado na luz vermelha; (H) Meio 2 + MIB, cultivado na luz vermelha e (I) Meio 3 + MIB, cultivado na luz vermelha. A barra indica 1cm.

O aspecto da coloração dos calos presentes nos três meios estudados diferiu dependendo da luz ao qual foram expostos. As luzes azul e branca proporcionaram maior formação dos calos com pontos pigmentados, parcialmente magenta e totalmente magenta, coloração característica das betalainas, que puderam ser avaliados visualmente, nos três meios estudados. As luzes azul e branca foram ideais para a indução de calos mais pigmentados, com coloração predominantemente rosácea, no meio 2. Já na luz vermelha, não houve diferenças estatísticas entre os três meios, não havendo desenvolvimento de pigmentação em nenhum deles (Figura 6-A).

A avaliação da intensidade de coloração nas massas celulares apresentou resultados semelhantes aos do aspecto da coloração, onde as melhores luzes para intensificar as nuances presentes nos calos foram azul e branco, formando pigmentos de intensidades mediana e alta. O meio 2 obteve melhores resultados, com maior intensidade de cor magenta nas três luzes testadas, adquirindo desde a coloração moderada até a mais intensa e sobressaindo frente aos demais (figura 6-B).

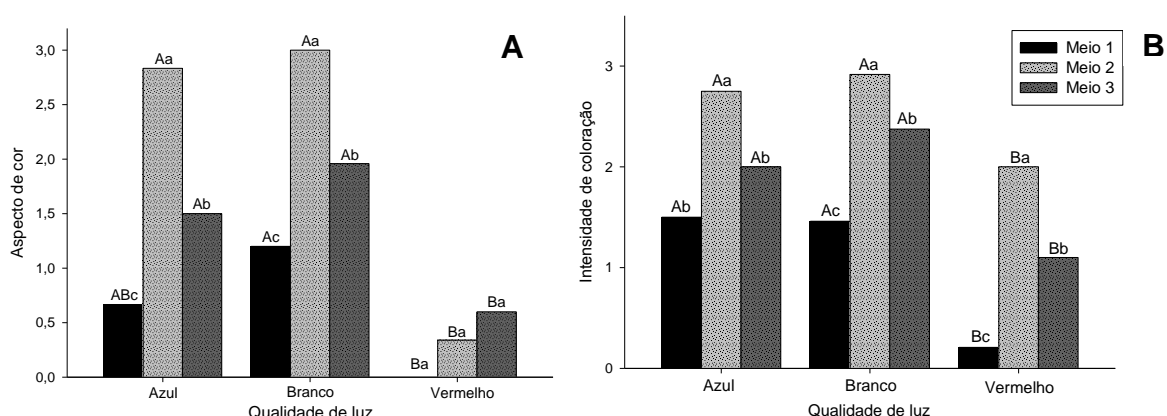


Figura 6 - Aspecto e intensidade de coloração em calos de *Alternanthera brasiliana*, após 40 dias em Meio de Indução de Betacianinas (MIB), sob diferentes qualidades de luz. Os valores referentes ao aspecto da coloração representam a média de quatro avaliadores que quantificaram da seguinte maneira: 0 (ausência de coloração magenta), 1 (calos com pontos vermelhos ao acaso), 2 (50% magenta), 3 (100% magenta). Os valores referentes à intensidade dos pigmentos dos calos representam a média de quatro avaliadores que quantificaram da seguinte maneira: 0 (inexistente), 1 (baixa), 2 (moderada), 3 (alta). * Médias seguidas de letras maiúsculas distintas diferem entre si para qualidade de luz e médias seguidas de letras minúsculas distintas diferem entre si para espécie, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0.05$).

Taxa de crescimento relativo e massa dos calos

Os efeitos da luz são sentidos em todo processo de morfogênese das plantas, dessa maneira, através da análise de crescimento relativo e massa final dos calos visualizou-se claramente as diferenças no padrão de crescimento frente às diferentes qualidades de luz testadas.

A taxa de crescimento relativo (TCR) dos calos apresentou bons resultados em luz azul e branca, conforme pode ser visto na figura 7A, porém para calos cultivados no meio 1, a TCR não diferiu nas três qualidades luminosas e no meio 3, a luz branca foi acompanhada da luz azul, com resultados semelhantes de incremento diário de massa celular. Avaliando as diferentes qualidades de luz

separadamente, a luz azul e branca foram mais efetivas quando os calos foram cultivados nos meios 2 e 3 apresentando a maior taxa diária de crescimento. Já os três meios cultivados em luz vermelha não apresentaram diferenças estatísticas entre si.

A maior massa foi visualizada na luz branca, em todas as combinações de reguladores de crescimento (figura 7-B), porém, nos calos que foram cultivados nos meio 1 e 3, a luz azul também apresentou bons resultados no incremento de massa. Do ponto de vista da formação das massas celulares pela ótica das qualidades de luz, nas lâmpadas azuis e vermelhas a massa final não diferiu entre os diferentes meios, mas nas lâmpadas brancas, o meio 2 e 3 produziram calos com maior acúmulo final de massa.

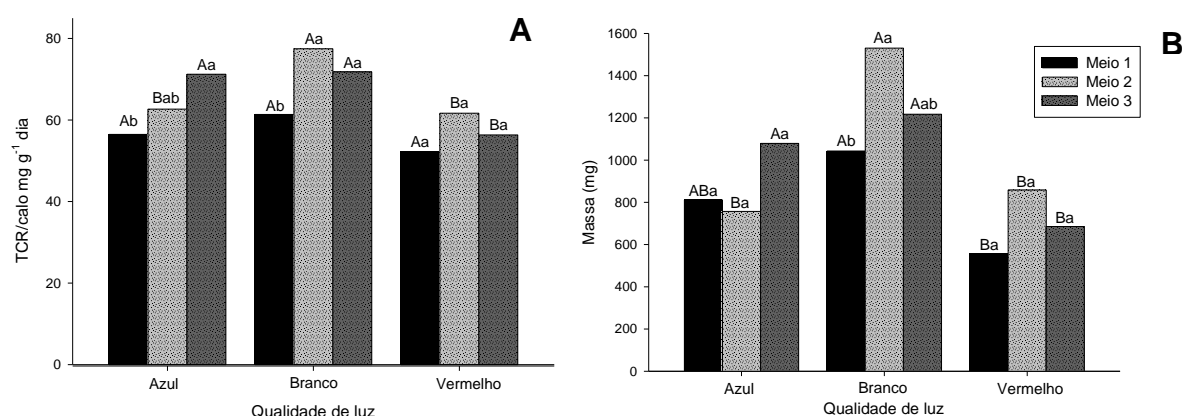


Figura 7 – Taxa de crescimento relativo e massa de calos *Alternanthera brasiliana*, após 40 dias em Meio de Indução de Betacianinas, cultivados sob diferentes qualidades de luz. * Médias seguidas de letras maiúsculas distintas diferem entre si para qualidade de luz e médias seguidas de letras minúsculas distintas diferem entre si para espécie, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0.05$).

Quantificação de betaxantinas, betacianinas e flavonoides totais

Com o intuito de investigar os efeitos adicionais das qualidades de luz branca, azul e vermelha, no acúmulo de metabólitos secundários, presentes em calos de *A. brasiliana* crescidos em diferentes combinações de fitorreguladores nos meios de cultivo, estes foram submetidos às análises de quantificação dos pigmentos betalâmicos e flavonoídicos, após 40 dias em MIB.

Foi observado que as lâmpadas de cor azul foram mais efetivas na biossíntese de betaxantinas (figura 8A) para todos os meios testados. Os resultados mostraram também que os calos do meio 2 produziram maior quantidade deste

pigmento na luz azul, comparado com os demais. Na irradiação por luz vermelha, os meios 3 e 2 foram os que induziram maior acúmulo de betaxantinas e na luz branca, a concentração desse pigmento foi bastante baixa e não apresentou diferenças nos meios estudados.

Na avaliação relativa ao conteúdo de betacianinas dos calos, a extração foi realizada com dois solventes, buscando extrair diferentes betalaínas, glicosiladas e não glicosiladas. Dessa maneira, por meio da extração com tampão fosfato (figura 8B), percebeu-se que a luz azul foi mais efetiva, porém, no meio 1, os calos cultivados nas diferentes qualidades de luz não apresentaram diferenças significativas entre si. Nas luzes vermelho e branco, não houve diferenças estatísticas no acúmulo das betacianinas quando cultivados nos distintos meios de cultura, porém, na luz azul, os calos do meio 2 produziram maior quantidade deste pigmento.

Quando as betacianinas foram extraídas com tampão acetato, acrescido de metanol (figura 8C), tampão de pH 5,0, que facilita a extração de moléculas agliconas, o resultado foi diferente. As qualidades de luz que auxiliaram no incremento destes pigmentos foram azul e branca, para os meios 2 e 3, porém, para o meio 1 apresentou resultados semelhantes nas três condições luminosas. Na luz azul, houve maior síntese dos pigmentos nos calos cultivados no meio 2, composto por duas auxinas, na luz branca, os calos dos meios 2 e 3 e na luz vermelha, não houve diferença significativa quanto ao conteúdo de betacianinas nos calos produzidos nos três tipos de meios.

Na análise da quantificação dos flavonoides totais (figura 9), observou-se que os meios tiveram efeito significativo independente da luz a que foram submetidos. Os meios que continham somente auxinas, meio 2 (AIA e 2,4-D) e citocinina combinada com auxina, meio 3 (BAP e 2,4-D), apresentaram os melhores resultados de indução da biossíntese destes compostos fenólicos nos calos formados.

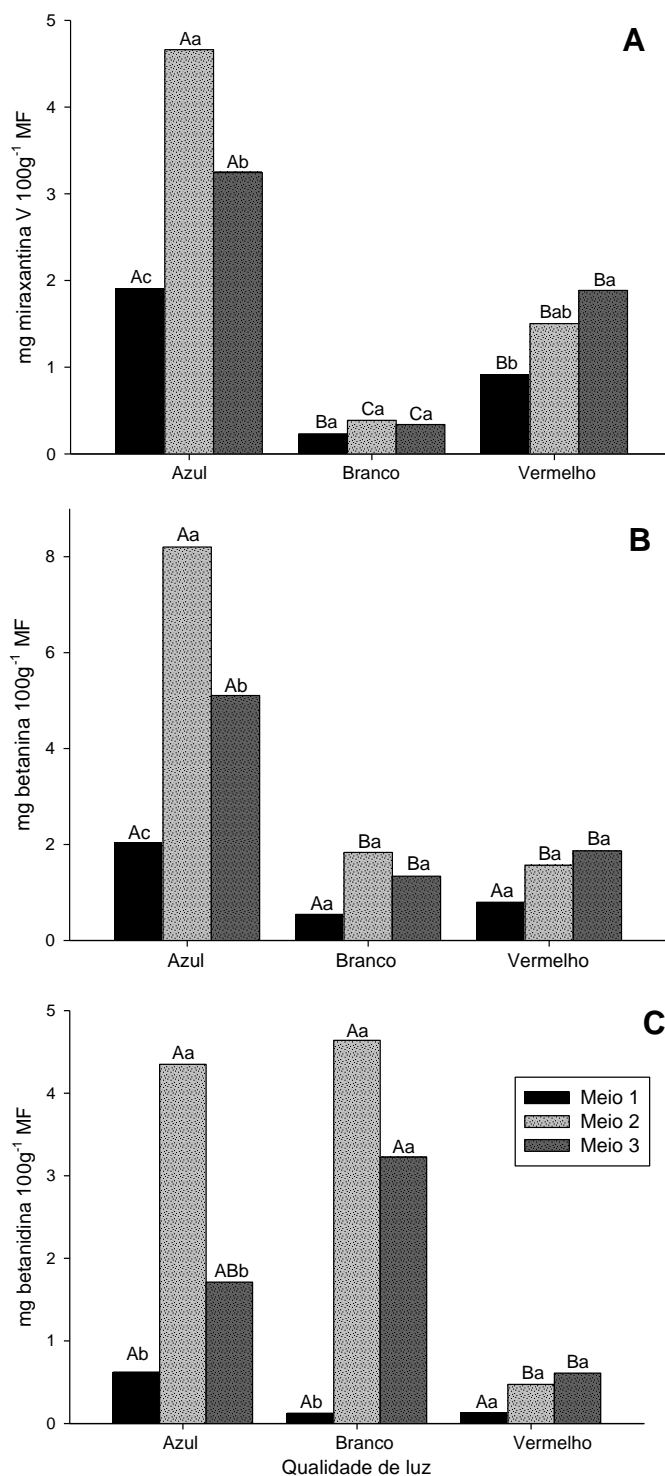


Figura 8 - Teor de betaxantinas totais (A), betacianinas totais extraídas com tampão fosfato, pH 6,0 (B) e extraídas com tampão acetato, pH 5,0, (C) em calos de *Alternanthera brasiliana*, cultivados sob diferentes qualidades de luz, durante 40 dias em Meio de Indução de Betacianinas. * Médias seguidas de letras maiúsculas distintas diferem entre si para qualidade de luz e médias seguidas de letras minúsculas distintas diferem entre si para espécie, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0.05$).

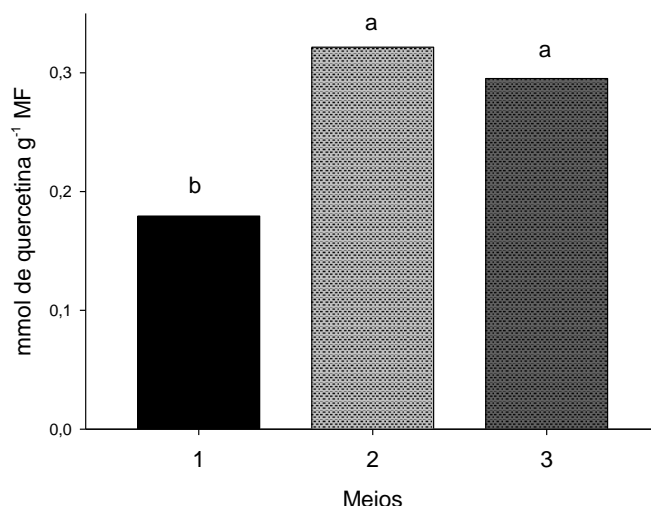


Figura 9 - Teor de flavonoides totais em calos de *Alternanthera brasiliana*, mantidos por 30 dias em diferentes Meios de Indução de Calos e durante 40 dias em Meio de Indução de Betacianinas. Meio 1: 1mg L⁻¹ de CIN e 1mg L⁻¹ de 2,4-D + MIB (0,5 mg L⁻¹ de TDZ e 1 mg L⁻¹ de ANA), Meio 2: 0,75 mg L⁻¹ de AIA e 1mg L⁻¹ de 2,4-D + MIB; Meio 3: 1 mg L⁻¹ de BAP e 0,5 mg L⁻¹ de 2,4-D + MIB. *Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o teste de Tukey (p<0.05).

Discussão

Experimento I - Indução de calos e crescimento em luz branca

A formação de calos envolve diferenciação, divisão e crescimento celulares que são regulados por fitorreguladores, como as citocininas e auxinas (Gao et al. 2011). Em alguns casos, somente a utilização de 2,4-D, auxina considerada mais efetiva para a indução de calos, é suficiente, porém com *A. brasiliana*, observou-se que a combinação com uma citocinina sintética, ou com outra auxina pode produzir alto percentual de calos tanto em explantes internodais quanto foliares.

Em estudos com *Solanum melongena*, Ray et al. (2011) observaram que 10 dias foi o número mínimo de dias requeridos para a indução de calos utilizando entrenós como explante, este tempo está próximo aos 12 dias que foram necessários à indução de calos em *A. brasiliana*. Por outro lado, observou-se que neste período já havia meios com 100% de calos formados o que diferiu dos autores acima que encontraram valores máximos de 48,7%, na espécie estudada. Estes resultados permitem que se considere os explantes internodais como tecido com potencial biossinteticamente ativo para indução de betacianinas, uma vez que os pigmentos são produzidos na parte aérea das plantas de *A. brasiliana*. Resultados semelhantes foram relatados por Biswas et al. (2013) com *Amaranthus tricolor*.

A cultura de tecidos tem sido considerada como uma alternativa para a produção de uma ampla gama de metabólitos secundários que são difíceis de serem obtidos quimicamente, incluindo corantes naturais. Tem sido reportada a possibilidade de estabelecimento de culturas de calos, com um objetivo em particular da síntese de calos magenta, que apresentam como principal corante as betacianinas (Trejo-Tapia et al. 2008). A partir das várias combinações de fitormônios testadas para o aspecto da coloração, a maior pigmentação dos calos foi visualizada no meio 3 para explantes foliares e no meio 5 para explantes internodais, a partir do qual, pode-se dizer que auxinas como 2,4-D, quando associadas a outra auxina, como o AIA, estimulam a biossíntese de betacianinas em folhas, porém, quando uma auxina, como o 2,4-D está associada à uma citocinina, como o BAP, a síntese de pigmentos é induzida em entrenós de *A. brasiliana*. Em pesquisa realizada com *Amaranthus tricolor*, os calos que eram maiores produtores de betacianina foram cultivados em meio contendo ANA ($0,25\text{mg L}^{-1}$) e BAP (2mg L^{-1}), já em estudo realizado com calos de *Beta vulgaris*, o crescimento em meio MS acrescido de Cin (1mg L^{-1}) e 2,4-D (1mg L^{-1}) para explantes de hipocótilos produziu calos com pigmentação heterogênea e em calos de explantes foliares produziu calos com coloração vermelha (Trejo-Tapia et al. 2008).

Com relação à intensidade de coloração, os meios que obtiveram destaque foram BAP ($0,5\text{mg L}^{-1}$) + 2,4-D (1mg L^{-1}) para calos de explantes foliares e 2,4-D ($0,5\text{mg L}^{-1}$) + BAP (1mg L^{-1}) para calos de explantes internodais, o que comprova a teoria de que auxinas e citocininas combinadas são benéficas e necessárias para o aumento da intensidade visual dos pigmentos, conforme comprovado por Macedo et al. (1999). Já em *Chenopodium rubrum* e *B. vulgaris* as betacianinas são produzidas em baixas concentrações de 2,4-D (Biswas et al. 2013). Além disso, foi estudado também que a aparência visual colorida dos calos é dada pela proporção betacianinas/ betaxantinas e pela mudança batocrômica característica das betacianinas aciladas e não aciladas (Kugler et al. 2007).

Um grande obstáculo encontrado no desenvolvimento de sistemas para produção em larga-escala, baseado em células de plantas, tem sido a instabilidade no acúmulo dos metabólitos. Vários relatos mostram perda gradual da capacidade e padrão de produção ou alta variação nos níveis de metabólitos secundários (Trejo-Tapia et al. 2008).

Tecidos, órgãos ou células com intensidades variadas de determinação podem adquirir novas competências através da ação de sinais químicos (reguladores de crescimento) que ativam seletivamente determinados genes (epigênese) e a resposta final é a expressão morfogenética que pode, às vezes, levar à organogênese do tecido. As análises de quantificação das betacianinas em CLAE-MS com calos de *A. brasiliana* confirmaram que estes apresentam conteúdo considerável de amarantina, dessa forma, acredita-se que a interação hormonal dos diferentes reguladores de crescimento presentes nos meios de indução de calos (MIC), na primeira fase do desenvolvimento, e os reguladores presentes no meio de indução de betacianinas (MIB) possa ter induzido a expressão deste potencial inerente das células.

A presença de concentrações variáveis de amarantina e isoamarantina pode ser explicada pelo fato de as auxinas aumentarem a polissomia e os níveis de ploidia nos diferentes órgãos, conforme estudos com *B. vulgaris* comprovaram, o que pode afetar o tipo de betalaínas expressas e sua produção na presença de múltiplas cópias de genes envolvidos na biossíntese destes pigmentos (Weber et al. 2010). Estudos com *Phytolacca americana* demonstraram que a incorporação de citocininas aos meios diminuiu o acúmulo de betalaínas, revelando que o BAP reduz a incorporação de tirosina nas betacianinas em mais de 50% dos casos (Hirano et al. 1992). O MIB foi composto por outra citocinina, o tidiazuron (TDZ) e conforme estudos (Bhuiyan e Adachi 2003) o TDZ tem sido utilizado para induzir respostas fisiológicas como a regulação da divisão celular, o crescimento e diferenciação de tecidos e órgãos e, mais recentemente, o TDZ emergiu como um biorregulador altamente eficaz em culturas de tecidos de uma diversificada gama de espécies que vão desde a árvore até plantas herbáceas.

Segundo Wang et al. (2006), todas as betalaínas, por serem derivadas da piridina, apresentam como cromóforo base, o ácido betalâmico, assim, quando estas moléculas estão em condições alcalinas, a maioria das betacianinas se tornam betaxantinas e nas plantas, as betacianinas normalmente estão na forma de betanidina, a forma aglicona da maioria das betacianinas. A presença de amarantina e betanidina em extratos de *Gomphrena globosa*, foi relatada por Kugler et al. (2007) onde as características de absorção e de relação massa/carga dos diastereoisômeros encontrados condizem com os resultados encontrados no presente trabalho.

Experimento II - Indução de calos e crescimento em diferentes condições de luz

A qualidade do espectro de luz e o meio de cultivo influenciam no processo de morfogênese em todo o nível de plantas e na cultura de tecidos. Conforme previamente relatado, o tempo de permanência dos calos no escuro durante 22 dias foram necessários para a formação destas massas celulares e redução da secreção de compostos fenólicos, que geralmente afetam os explantes, conforme já relatado em trabalho de Tan et al. (2010). Os calos iniciaram as modificações nas suas colorações e nas suas intensidades após a transferência dos mesmos para as diferentes qualidades de luz. Relatos de Radfar et al. (2012) demonstraram que a biossíntese das betalaínas ocorre entre o 6º e o 15º dias, sendo mais intensa a partir do 9º dia, esta iniciação do processo de biossíntese é realizada com o fim da hidrólise da sacarose, contida no meio, e correlacionada com o consumo de glicose e frutose, resultadas dessa lise. No presente trabalho observou-se formação de pigmentos já uma semana após estarem submetidas à luz.

O desenvolvimento de diferentes linhagens com células coloridas com tecidos de planta é dependente da indução de sequências específicas de calos, mas, uma vez estabelecidos estes fenótipos individuais, eles podem ser perpetuados e mantidos no meio (Girod e Zrýd 1991b). Um fator determinante, para o estabelecimento e estabilização destas linhagens é a composição do meio, assim, no decorrer deste trabalho, verificou-se que as luzes azul e branca induziram maior formação e intensificação dos pigmentos em calos de *A. brasiliiana* e o meio de cultivo que mais favoreceu esta produção foi o meio composto por AIA ($0,75 \text{ mg L}^{-1}$) e 2,4-D (1 mg L^{-1}). Em calos de *Zaleya decandra* (Radfar et al. 2012), cultivados em luz branca, a maior intensidade foi visualizada quando estes foram cultivados em MS, acrescido de TDZ (2 mg L^{-1}) e 2,4-D (1 mg L^{-1}). No entanto, não está totalmente claro se a intensa pigmentação é devida a um aumento da atividade metabólica de células individuais ou a um aumento no número de células capazes de produzir betalaínas (Kishima et al. 1991).

As modificações na composição dos fitorreguladores do meio de cultura podem ser utilizadas para modular a direção e frequência dos eventos de interconversão, resultando em fenótipos quiméricos, que são calos de uma coloração e que ao serem transferidos para um meio com baixa concentração de 2,4-D, surgem setores de outra coloração (Leathers et al. 1992). A rapidez desta

resposta, que pode ser de 1-2 gerações de células, indica que a transformação do fenótipo, induzida por hormônios, está associada à replicação do DNA celular e, portanto, susceptível de ser uma função do processo de proliferação celular (Girod e Zryd 1991a), ou seja, dependendo do efeito induzido pelos fitormônios, um fenótipo pode modificar a sua coloração e o formato das células que o compõem.

A TCR e a massa final dos calos apresentaram os melhores resultados em luz branca e luz azul, confirmando em parte o que foi relatado por Zhao et al. (2010) em *Sueda salsa*, onde a TCR foi acentuadamente maior em calos que cresceram em luz branca. Os calos cultivados nos meios contendo AIA e 2,4-D (meio 2) e meio com BAP e 2,4-D (meio 3) apresentaram maior taxa de crescimento diário e de maior acúmulo final de massa. Estudos com calos de *Portulacca* sp (Noda e Adachi 2000) demonstraram que a maior taxa de crescimento foi visualizada em calos cultivados em meio MS acrescido de 5 a 10 μ M de 2,4-D, com taxas de crescimento idênticas nas diferentes concentrações da auxina. Abu-Romman et al. (2013) relataram que o crescimento dos calos foi maior quando auxinas foram incorporadas ao meio, em comparação às citocininas, a eficiência destes dois tipos de reguladores nos calos depende da idade da planta mãe, do tipo de órgão utilizado, da localização do tecido no órgão, pois diferentes tecidos tem diferentes sensibilidades aos fitormônios, mesmo sendo na mesma espécie (Lee et al. 2011).

O acúmulo de betacianinas em cultivo no escuro indica que a luz não é um pré-requisito para a formação de betacianinas em algumas espécies, mas sim, um poderoso estimulante dessa biossíntese (Leathers et al. 1992). Conforme estudo proposto por Zhao et al. (2010) o mecanismo de síntese das betacianinas induzido pela luz inicia quando o sinal luminoso, vindo do fitocromo ou criptocromo passa através de múltiplos intermediários de sinalização, e então, regula um fator de transcrição, que pode controlar a expressão de genes que codificam para enzimas como a tirosinase, DOPA oxidase e glucosiltransferases e, dessa forma, desencadeia a modificação pós-translacional destas três enzimas, importantíssimas no processo de formação destes pigmentos.

A exposição de plântulas de *Amaranthus tricolor* e *Celosia plumosa* (Nicola et al. 1974) às lâmpadas branca e vermelha, resultou em um aumento da produção de betacianinas e betaxantinas, ao passo que em *A. brasiliensis* os resultados promoveram o incremento destes compostos, quando os calos foram expostos à lâmpadas de cor azul, sendo que o meio de cultivo onde se obteve maior

produtividade de betaxantinas e betacianinas glicosiladas foi o meio 2, com um aumento da produtividade de cerca de 12x e 4,5x com relação à cor branca, usualmente empregada na cultura de tecidos. Resultados semelhantes foram relatados com suspensões celulares de *Chenopodium rubrum* que apresentaram um aumento de 30% no cultivo em luz azul.

O efeito sinérgico entre a luz e a cinetina em plântulas de *Amaranthus tricolor* (Bianco-Colomas e Hugues 1990) foi extremamente benéfico, resultando em alto acúmulo de betacianinas, o que não ocorreu na espécie em estudo, que obteve melhores resultados em meio composto somente por auxinas. Para betacianinas agliconas, as luzes azul e branca produziram maior quantidade destes compostos, com produção de cerca de 10x a da luz vermelha. Parece, portanto, que a resposta de pigmentação gerada pelo ambiente luminoso é um carácter intrínseco das células, porém é improvável que uma expressão epigenética tenha sido adquirida durante os ciclos de cultivo (Kishima et al. 1991).

Os flavonoides, compostos fenólicos comumente encontrados em plantas, são produtos derivados das rotas do ácido chiquímico (ou chiquimato) e também do acetato (acetil coenzima A) e são produzidos durante a fase exponencial do crescimento dos calos, enquanto a maioria dos metabólitos é produzida na fase estacionária ou de morte destes (Tan et al. 2010). Para a quantificação dos flavonoides totais, os meio 2 e 3 apresentaram os melhores resultados, confirmando resultados de Lee et al. (2011), nos quais as auxinas produziram maior incremento destes compostos fenólicos, e na presença de AIA houve maior produção destes metabólitos em calos de raízes adventícias, quando cultivados em MS acrescido de 5mg L⁻¹ de AIA. Conforme estudo de Tan et al. (2010) 2,4-D e cinetina foram mais eficazes na produção de flavonoides como quercetina, kaempferol, luteolina e rutina em culturas celulares de *Centella asiatica*.

Como se pode observar, de um modo geral, o meio que promoveu maior incremento de metabólitos, independente da qualidade de luz foi o meio 2, composto por uma auxina natural e uma sintética, o AIA (0,75 mg L⁻¹) e o 2,4-D (1mg L⁻¹). As auxinas apresentam um papel importante na indução de calos e diferentes auxinas apresentam efeitos diferenciados. As auxinas sintéticas, em muitos casos podem ser mais eficazes do que as naturais (Baskaran et al. 2006).

Material e métodos

Experimento I - Indução de calos e produção de betacianina sob luz branca

Para o experimento I, foram utilizadas plantas de *A. brasiliana*, pertencentes ao Banco de Plantas *in vitro* do Laboratório de Cultura de Tecidos, da Universidade Federal de Pelotas, as quais permaneciam em câmara de crescimento com densidade de fluxo de fótons de $22 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 16h de fotoperíodo e temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2$.

Indução de calos

Plantas mantidas, por 30 dias, em meio MS (Murashige; Skoog, 1962), com 30 g L^{-1} de sacarose, 8 g L^{-1} de ágar e 100 mg L^{-1} de inositol, tiveram seus entrenós e folhas seccionados em segmentos de 0,1-0,2cm e 0,5x1cm, respectivamente, sendo as folhas laceradas diagonalmente, 3 vezes. Os órgãos foram colocados em meio MS (Murashige; Skoog, 1962) contendo 30 g L^{-1} de sacarose e 2 g L^{-1} de phytigel, suplementado com 100 mg L^{-1} de inositol, $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de adenina e 3 mg L^{-1} de ácido ascórbico (AA), em placas de Petri (90 x 15mm) com diferentes combinações de reguladores de crescimento (figura 10). As combinações formaram cinco diferentes meios de indução de calos (MIC), sendo Meio 1: 1 mg L^{-1} de cinetina (CIN) e 1 mg L^{-1} de ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D); Meio 2: $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ de ácido α -naftalenoacético (ANA) e 1 mg L^{-1} de 5-benzilaminopurina (BAP); Meio 3: $0,75 \text{ mg L}^{-1}$ de ácido indolacético (AIA) e 1 mg L^{-1} de 2,4-D; Meio 4: $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP e 1 mg L^{-1} de 2,4-D e Meio 5: 1 mg L^{-1} de BAP e $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D. Foram inoculados 5 explantes em cada meio de indução de calos e mantidos em câmara de crescimento, no escuro, por 22 dias à temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Após a permanência no escuro, as placas foram transferidas para a luz, sob densidade de fluxo de fótons de $22 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, durante oito dias para promoção do crescimento sob luminosidade.

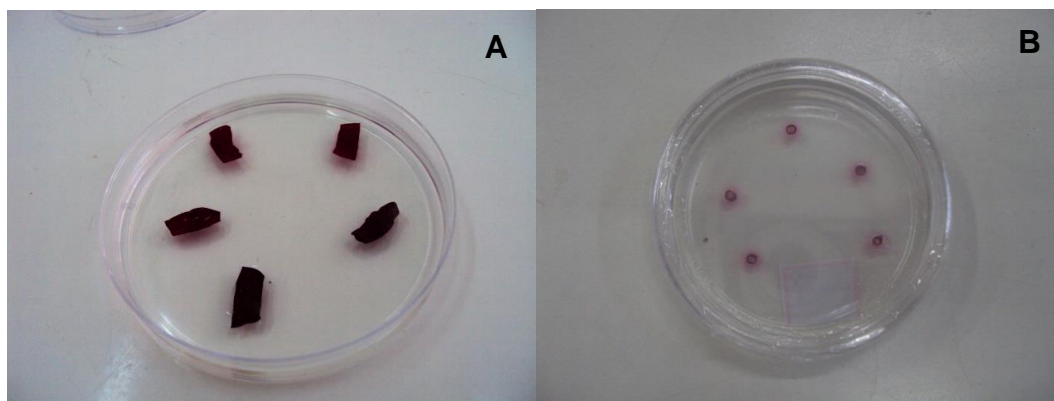


Figura 10 – Explantes de folhas (A) e entrenós (B) de *Alternanthera brasiliana* ao serem inoculados no meio de indução de calos.

Indução de betacianinas

Após esse período os explantes provenientes de todos os meios de indução de calos foram transferidos para Meio de Indução de Betacianinas (MIB) (Zhao et al. 2010), formado por meio MS, contendo 0,3% phytigel, 30g L⁻¹ sacarose, 100mg L⁻¹ inositol, 0,5 mg L⁻¹ adenina e 3 mg L⁻¹ ácido ascórbico e ainda suplementado com 0,5 mg L⁻¹ de tidiazuron (TDZ) e 1 mg L⁻¹ de ácido naftalenoacético (ANA), no qual permaneceram durante 45 dias. Os meios foram renovados em intervalo máximo de 20 dias. Neste período, os calos foram cultivados em luz branca (fornecida por lâmpadas fluorescentes tubulares Sylvania®, 40W), com densidade do fluxo de fótons de 22μmol m⁻² s⁻¹, medida com luxímetro (Hansatech® Quantum Sensor QSRED), com 16h de fotoperíodo, a 25°C ±1 durante o dia e 23°C ±1 durante a noite.

Avaliações

Processo de calogênese

A calogênese foi avaliada nos explantes foliares e internodais após 12, 30 e 37 dias nos tratamentos. Nas duas primeiras avaliações (12 e 30 dias) os explantes estavam nos meios de indução de calos e na terceira (aos 37 dias) estavam há sete dias em meio de indução de betacianina. A variável verificada foi o percentual de indução de calos nos diferentes órgãos e meios.

Aspecto de calos pigmentados e Intensidade dos pigmentos

Para a realização desta avaliação qualitativa, foram observados dois parâmetros: a aparência (%) da pigmentação magenta em calos e a intensidade deste pigmento. Para o aspecto da coloração dos calos, em cada tratamento, foram dadas as seguintes notas: 0 (ausência de coloração magenta nos calos), 1 (calos com pontos magentas ao acaso), 2 (50% do calo está com cor magenta), 3 (100% do calo está pigmentado na cor magenta) e para a intensidade da cor magenta dos calos: 0 (calo sem pigmentação), 1 (intensidade baixa), 2 (intensidade moderada), 3 (intensidade alta). O teste foi composto de quatro avaliadores, para ambos os parâmetros e foi realizado em calos após 60 dias em cultivo.

Betacianinas totais

Os pigmentos foram extraídos em 10mM de tampão acetato de sódio pH 5,0, acrescido de 10mM de AA foram homogeneizados em Polytron (Kinematica AG, Suíça), em dois pulsos de 5 segundos, em velocidade média. O extrato foi filtrado em gaze e centrifugado a 120000g, por 40min. O sobrenadante foi filtrado em membrana Centriplus YM-10 (Milipore), para remover as proteínas e o filtrado foi usado para a análise dos pigmentos. O processo ocorreu em temperatura de 4°C (Gandia-Herrero et al. 2007).

Análise em Cromatografia líquida de alta eficiência (High Performance Liquid Chromatography – HPLC)

HPLC- Detector de arranjo de fotodiodos

A cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa foi realizada de acordo com o método de Gandia-Herrero et al. (2007), em um aparelho Shimadzu LC-10A, acoplado com um detector de arranjo de fotodiodos (DAF) SPD-M10A (Shimadzu, Quioto, Japão). Foi utilizado 25µL de extrato, em uma coluna empacotada Kromasil 100 C-18 (250x 4,6mm), com partículas de 5µm (Tecnokroma, Barcelona, Espanha). Os gradientes foram formados por solventes, tendo fase móvel composta por água milliQ, acidificada com 0,05% de ácido trifluoroacético (solvente A) e o, acetonitrila acidificada com 0,05% de ácido trifluoroacético (solvente B), com fluxo de 1mL min⁻¹.

HPLC- Espectrometria de massas (Mass Spectrometry – MS/MS)

Para esta análise, o aparelho utilizado foi Agilent VL 1100 acoplado à CL/MSD (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). As condições de eluição empregadas foram as mesmas da análise anterior. A interface entre o HPLC e o espectrômetro de massas consistiu de uma fonte de ionização por eletrospray, a 3,5 kV, com uma taxa de fluxo gás nebulizador (N₂) de 0,8 mL min⁻¹, pressão do gás de secagem (N₂) a 35 psi, e temperatura de vaporização de 350°C. Os espectros de massa foram adquiridos no modo positivo de ionização, com varredura completa na faixa de 60-1000 m/z. Para a detecção, a tensão multiplicadora de elétrons foi de 1350 V (Gandia-Herrero et al. 2007).

Análise estatística

O delineamento experimental utilizado para avaliação da calogênese foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5x2 (cinco meios e dois tipos de explantes), contendo quatro repetições por tratamento, representadas por uma placa de Petri contendo cinco explantes. As avaliações foram realizadas aos 12, 30 e 37 dias após a inoculação dos explantes nos meios e analisadas separadamente. Para a avaliação de betacianinas foi utilizada apenas a comparação dos meios de indução de calos no explante entrenós. Os dados foram submetidos à análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro, com auxílio do software estatístico WinStat (Machado e Conceição 2002).

Experimento II - Indução de calos e crescimento em diferentes condições de luz

Plantas de *A. brasiliiana*, cultivadas nas mesmas condições do ensaio anterior, tiveram seus entrenós seccionados em segmentos de 0,1-0,2cm e colocados em meio MS, contendo 30 g L⁻¹ de sacarose, 2g L⁻¹ de phytagel, 100mg L⁻¹ de inositol, 0,5 mg L⁻¹ de adenina, 3 mg L⁻¹ de ácido ascórbico e diferentes combinações de reguladores de crescimento. As combinações formaram três diferentes meios de indução de calos (MIC), sendo, Meio 1: 1mg L⁻¹ de cinetina (CIN) e 1mg L⁻¹ de ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D); Meio 2: 0,75 mg L⁻¹ de ácido indolacético (AIA) e 1mg L⁻¹ de 2,4-D; Meio 3: 1 mg L⁻¹ de BAP e 0,5 mg L⁻¹ de 2,4-D. Foram inoculados 10 explantes em cada meio de indução de calos e mantidos em câmara de

crescimento, no escuro, por 22 dias. Após a permanência no escuro, as placas foram transferidas para a luz branca, durante sete dias.

Indução de betacianinas e fontes de luz

Após esse período os explantes provenientes de todos os MIC foram transferidos para Meio de Indução de Betacianinas (MIB), conforme descrito no ensaio anterior, onde permaneceram por 40 dias. Nesta etapa, as placas foram distribuídas em três diferentes qualidades de luz sendo luz branca (fornecida por lâmpadas fluorescentes tubulares (Sylvania®, 40W), luz azul (fluorescente azul compacta (Taschibra®, 14W) com pico de emissão de 470nm) e luz vermelha (fluorescente compacta vermelha (G-light®, 15W) com pico de emissão de 660nm). As densidades de fluxo de fótons para as luzes branca, azul e vermelha, medidas com luxímetro (Hansatech® Quantum Sensor QSRED) foram 25, 12 e 22 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente.

Avaliações

Aspecto e Intensidade dos pigmentos

Para a realização desta avaliação qualitativa, foram observados os mesmos parâmetros descritos no Experimento I.

Taxa de crescimento relativo dos calos

A taxa de crescimento relativo (TCR) foi calculada com a massa fresca (MF) de calos, conforme descrito previamente por Galiba et al. (1993), de acordo com seguinte equação:

$$\text{TCR} = [(\ln \text{MF}_f - \ln \text{MF}_i) / (t_f - t_i) \times 10^3]$$

Onde MF_f = massa fresca, no t_f (no final do experimento), MF_i = massa fresca no t_i (no início dos tratamentos), t_f (dia final de tratamento), t_i (primeiro dia de tratamento), tempo em dias.

Massa total de calos

A massa total dos calos (M_c) foi calculada com base na massa fresca (MF) de calos, contidos em uma placa de Petri (10 calos), ao final do experimento.

Quantificação de betaxantinas

Para a extração de betaxantinas foram utilizados 250mg de calos e tampão fosfato 10mM, pH 6,0, com 10mM de ascorbato de sódio. As plantas foram maceradas em almofariz de porcelana e o homogeneizado filtrado em gaze e centrifugado a 10000g, por 20min, a 4°C, seguindo a metodologia proposta por Gandia-Herrero et al. (2005). Para as leituras foi utilizado espectrofotômetro T80 UV/VIS Spectrometer (PG Instruments Ltd) acoplado a sistema de aquecimento PTC-2 Peltier Temperature Controller, com o software UVWin80 v5.0.5, a 25°C. A concentração de betaxantina foi calculada através da leitura da absorbância em um comprimento de onda de 480nm, tendo como coeficiente de extinção molar de $\epsilon=48,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Schliemann et al. 1999).

Quantificação de betacianinas totais

A extração das betacianinas, betanidina e betanina, foi realizada com dois tipos de tampão extrator, tampão acetato/metanol e tampão fosfato, respectivamente. A primeira análise foi realizada com 70% de tampão acetato na concentração de 10 mM e 30% de metanol (v/v), pH 5,0, acrescido de ascorbato de sódio 10mM. A segunda análise foi realizada utilizando tampão fosfato 10mM, pH 6,0, acrescido de ascorbato de sódio 10mM, sem adição de solvente orgânico. Para ambas as análises foram utilizadas 250mg de calos que foram maceradas em almofariz de porcelana e o homogeneizado filtrado em gaze e centrifugado a 10000g, por 20min, a 4°C., conforme Gandia-Herrero et al. (2007). O coeficiente de extinção molar utilizado para o cálculo de betanidina foi de $\epsilon= 54000\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ e para betanina foi de $\epsilon= 65000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, conforme relatado por Schwartz e von Elbe (1980), em um comprimento de onda de 536nm. As leituras foram realizadas nas mesmas condições da análise anterior.

Quantificação de flavonoides totais

A extração foi feita nas mesmas condições do experimento anterior utilizando tampão acetato/metanol como extrator. Foi realizada espectrofotometria de

varredura para determinar o melhor comprimento de onda, através do qual plotou-se a curva de calibração padrão e conforme a equação: $y = 0,1526x - 0,0039$ foi realizado o cálculo das concentrações de flavonoides nas amostras que foram computadas e expressas em μmol de quercetina por grama de calos. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro, em um comprimento de onda de 330nm, conforme descrito anteriormente.

Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, em esquema fatorial 3x3, composto por três tipos de meios e três fontes de luz. Foram realizadas seis repetições, sendo considerada a unidade experimental uma placa de Petri contendo 10 explantes. Os dados foram submetidos à análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro, com auxílio do software estatístico WinStat (Machado e Conceição 2002).

Agradecimentos

Deixo expressos meus sinceros agradecimentos às seguintes instituições e pessoas, por meio dos quais este trabalho se tornou possível: à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo apoio financeiro com a concessão de bolsas de estudo; à Universidad de Murcia, na pessoa do pesq. Dr. Fernando Gandia-Herrero pela receptividade e por crer no nosso trabalho;

Referências bibliográficas

Abu-Romman S, Suwwan M, Al-Ramamneh EA (2013) The influence of plant growth regulators on callus induction from hypocotyls of cucumber (*Cucumis sativus* L.). Adv. Environ. Biol. **7**, 339-343.

Andreazza NL, de Lourenco CC, Siqueira CA, Sawaya AC, Lapinski TF, Gasparetto A, Khouri S, Zamuner SR, Munin E, Salvador MJ. (2013) Photodynamic inactivation of yeast and bacteria by extracts of *Alternanthera brasiliana*. Curr Drug Targets. **14**, 1015-1022.

- Baskaran, P, Rajeswari BR, Jayabalan N** (2006) Development of an *in vitro* regeneration system in sorghum [*Sorghum bicolor* (L). Moench] using root transverse thin cell layers (tTCLs). *Turk. J. Bot.* **30**, 1-9.
- Bhuiyan NH, Adachi T** (2003) Stimulation of betacyanin synthesis through exogenous methyl jasmonate and other elicitors in suspension-cultured cells of *Portulaca*. *Journal Plant Physiology* **160**, 1117-1124.
- Bianco-Colomas J, Hugues M** (1990) Establishment and characterization of a betacyanin producing cell line of *Amaranthus tricolor*: inductive effects of light and cytokinin. *J. Plant. Physiol.* **136**,734-739.
- Biswas M, Das SS, Dey S** (2013). Establishment of a stable *Amaranthus tricolor* callus line for production of food colorant. *Food Sci. Biotechnol.* **22**, 1-8.
- Delaporte RH, Guzen KP, Takemura OS, Mello JCP** (2005) Estudo mineral das espécies vegetais *Alternanthera brasiliensis* (L.) Kuntze e *Bouchea fluminensis* (Vell) Mold. *Rev. Bras. Farmacogn.* **15**, 133-136.
- Delgado-Vargas F, Jiménez AR, Paredes-López O** (2000) Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains - characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* **40**, 173-289.
- Facundo VA, Azevedo MS, Rodrigues RV, do Nascimento LF, Militão JSLT, da Silva GVJ, Braz-Filho R** (2012) Chemical constituents from three medicinal plants: *Piper renitens*, *Siparuna guianensis* and *Alternanthera brasiliensis*. *Rev. Bras. Farmacogn.* **22**, 1134-1139.
- Galiba G, Kocsy G, Kaur-Sawhney R, Sutka J, Galston AW** (1993) Chromosomal localization of osmotic and salt stress -induced differential alterations in polyamine content in wheat. *Plant Sci.* **92**, 203-211.
- Gandia-Herrero F, Escribano J, Garcia-Carmona F** (2005) Betaxanthins as substrates for tyrosinase. an approach to the role of tyrosinase in the biosynthetic pathway of betalains. *Plant Physiol.* **138**, 421-432.
- Gandia-Herrero F, Escribano J, Garcia-Carmona F** (2007) Characterization of the activity of tyrosinase on betanidin. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 1546-1551.

Gandia-Herrero F, Escribano J, Garcia-Carmona F (2010) Structural implications on color, fluorescence, and antiradical activity in betalains. *Planta* **232**: 449–460.

Gao J, Li J, Luo C, Yin L, Li S, Yang G, He G (2011) Callus induction and plant regeneration in *Alternanthera philoxeroides*. *Mol. Biol. Rep.* **38**, 1413–1417

Georgiev V, Ilieva M, Bley T, Pavlov A (2008) Betalain production in plant *in vitro* systems. *Acta Physiol. Plant.* **30**, 581-593.

Georgiev VG, Weber J, Kneschke E, Denev PN, Bley T, Pavlov AI (2010). Antioxidant activity and phenolic content of betalain extracts from intact plants and hairy root cultures of the beetroot *Beta vulgaris* cv. Detroit Dark Red. *Plant Foods Hum. Nutr.* **65**, 105–111.

Girod PA, Zryd JP (1991a) Biogenesis of betalains: purification and partial characterisation of DOPA-4,5-dioxygenase from *Amanita muscaria*. *Phytochemistry* **30**, 169-174.

Girod PA, Zryd JP (1991b) Secondary metabolism in cultured red beet (*Beta vulgaris* L.) cells: differential regulation of betaxanthin and betacyanin biosynthesis. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **25**, 1-12.

Harris NN, Javellana J, Davies KM, Lewis DH, Jameson PE, Deroles SC, Calcott KE, Gould KS, Schwinn KE (2012) Betalain production is possible in anthocyanin producing plant species given the presence of DOPA-dioxygenase and L-DOPA. *BMC Plant Biol.* **12**, 1-12.

Herbach KM, Stintzing FC, Carle R (2006) Betalain stability and degradation—structural and chromatic aspects. *J. Food Sci.* **71**, 41-50.

Hirano H, Sakuta M, Komamine A (1992) Inhibition by cytokinin of the accumulation of betacyanin in suspension-cultures of *Phytolacca Americana*. *Z. Naturforsch. C.* **47**, 705–710.

Karuppusamy S (2009) A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. *J. Med. Plants Res.* **3**, 1222-1239.

Kishima Y, Nozaki K, Akashi R, Adachi, T (1991) Light-inducible pigmentation in *Portulaca* callus; selection of a high betalain producing cell line. *Plant Cell Rep.* **10**, 304-307.

Kishima Y, Shimaya A, Adachi T. (1995) Evidence that blue light induces betalain pigmentation in *Portulaca* callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.*, **43**, 67-70.

Kugler K, Stintzing FC, Carle R (2007) Characterization of betalain patterns of differently coloured inflorescences from *Gomphrena globosa* L. and *Bougainvillea* sp. by HPLC–DAD–ESI–MS. *Anal. Bioanal. Chem.* **387**, 637–648.

Leathers RR, Davin C, Zrýd JP (1992) Betalain producing cell cultures of *Beta vulgaris* L. Var. Bikores monogerm (red beet). *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **28**, 39-45.

Lee Y, Lee D, Lee H, Kim S, Lee WS, Kim S, Kim M (2011) Influence of auxins, cytokinins, and nitrogen on production of rutin from callus and adventitious roots of the white mulberry tree (*Morus alba* L.). *Plant Cell Tiss Organ Cult.* **105**, 9–19.

Macedo AF, Barbosa NC, Esquibel, MA, Souza MM de, Cechinel-Filho V (1999) Pharmacological and phytochemical studies of callus culture extracts from *Alternanthera brasiliana*. *Pharmazie*, **54**, 776-777.

Macedo AF, Lage CL, Esquibel MA, Souza MM de, Silva KL da, Niero R, Cechinel-Filho V (2004) Preliminary phytochemical and pharmacological studies on plantlets of *Alternanthera brasiliana* cultured under different spectral quality of lights. *Acta Farm. Bonaerense* **23**, 515-519.

Macedo Af, Leal-Costa MV, Tavares ES, Lage CLS, Esquibel MA (2011) The effect of light quality on leaf production and development of *in vitro*-cultured plants of *Alternanthera brasiliana* Kuntze. *Environ. Exp. Bot.* **70**, 43–50.

Machado A, Conceição AR (2002) Programa estatístico WinStat Sistema de Análise Estatístico para Windows. Versão 1.0. Pelotas: UFPel.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**, 473-497.

Namdeo AG (2007) Plant Cell Elicitation for Production of Secondary Metabolites: A Review. *Pharmacogn Rev.*: **1**, 69-79.

Nicola MG, Amico V, Piattelli M (1974) Effect of white and far-red light on betalain formation. *Phytochemistry* **13**, 439-442.

Noda N, Adachi T (2000). Isolation of stable, variously colored callus lines in *Portulacca* sp. 'Jewel' and analysis of betalain composition. *Plant Biol.* **17**, 55-60.

Radfar M, Sudarshana MS, Niranjan MH (2012) Betalains from stem callus cultures of *Zaleya decandra* L. N. Burm. f. - A medicinal herb. *J. Med. Plants Res.* **6**, 2443-2447.

Rao SR, Ravishankar GA (2002) Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnol Adv.* **20**, 101–153.

Ray BP, Hassan L, Sarker SK (2011). *In vitro* cultivation and regeneration of *Solanum Melongena* (L.) using stem, root and leaf explants. *Nepal J. Biotech.* **1**, 49-54.

Schliemann W, Kobayashi N, Strack D (1999) The decisive step in betaxanthin biosynthesis is a spontaneous reaction. *Plant Phys.* **119**, 1217–1232.

Schwartz SJ, von Elbe JH (1980) Quantitative determination of individual betacyanin pigments by high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, **28**, 540-543.

Tan S, Musa R, Ariff A, Maziah M (2010) Effect of plant growth regulators on callus, cell suspension and cell line selection for flavonoid production from pegaga (*Centella asiatica* L. urban). *Am. J. Biochem. Biotech.* **6**, 284-299.

Trejo-Tapia G, Balcazar-Aguilar JB, Martínez-Bonfil B, Salcedo-Morales G, Jaramillo-Flores M, Arenas-Ocampo ML, Jiménez-Aparicio A (2008) Effect of *screening* and subculture on the production of betaxanthins in *Beta vulgaris* L. var. 'Dark Detroit' callus culture. *Innovative Food Sci. Emerg. Techn.* **9**, 32–36.

Wang CQ, Zhao JQ, Chen M, Wang BS (2006) Identification of betacyanin and effects of environmental factors on its accumulation in halophyte *Suaeda salsa*. J. Plant Phys. Mol. Biol. **32**, 195-201.

Weber J, Georgiev V, Haas C, Bley T, Pavlov A (2010) Ploidy levels in *Beta vulgaris* (red beet) plant organs and *in vitro* systems, Eng. Life. Sci. **10**, 139–147.

Zhao SZ, Sun HZ, Chen M, Wang BS (2010) Light-regulated betacyanin accumulation in euhalophyte *Suaeda salsa* calli. Plant Cell Tiss. Organ. Cult. **102**, 99-107.

Zhao, JT, Davis LC, Verpoorte R (2005) Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. **Biotechnology Advances** **23**, 283-333.