



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS
VEGETAIS



KATIANE OLIVEIRA PORTO

SELEÇÃO E ESTIMULAÇÃO EM CULTURAS DE CALOS DE
***Byrsonima gardneriana* A. Juss. PARA PRODUÇÃO DE**
ANTOCIANINAS

Feira de Santana- BA

2018

KATIANE OLIVEIRA PORTO

**SELEÇÃO E ESTIMULAÇÃO EM CULTURAS DE CALOS DE
Byrsonima gardneriana A. Juss. PARA PRODUÇÃO DE
ANTOCIANINAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais - RGV, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof. Dr. Lenaldo Muniz de Oliveira
Coorientadora: Profa. Dra. Angélica Maria Lucchese

Feira de Santana- BA

2018

Ficha Catalográfica - Biblioteca Central Julieta Carteado - UEFS

P881s Porto, Katiane Oliveira

Seleção e estimulação em culturas de calos de *Byrsonima gardneriana*
A. Juss. para produção de antocianinas / Katiane Oliveira Porto . - 2018.
56 f.: il.

Orientador: Lenaldo Muniz Oliveira.

Coorientadora: Angélica Maria Lucchese.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Feira de Santana,
Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, 2018.

1. *Byrsonima gardneriana* A. Juss. – Cultivo *in vitro*. 2. Antocianinas.
I. Oliveira, Lenaldo Muniz, orient. II. Lucchese, Angélica Maria, coorient.
III. Universidade Estadual de Feira de Santana. IV. Título.

CDU: 582.754

Lívia Sandes Mota Rabelo – Bibliotecária CRB5/1647

BANCA EXAMINADORA

Cristina Ferreira Nepomuceno
Profa. Dra. Cristina Ferreira Nepomuceno
(Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB)

Hugo Neves Brandão
Prof. Dr. Hugo Neves Brandão
(Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS)

Lenaldo M. de Oliveira
Prof. Dr. Lenaldo Muniz Oliveira
(Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS)
Orientador e Presidente da Banca

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e pelos desafios concedidos que me fazem aprender um pouco mais com cada nova experiência.

A meu filho Benício por tornar a caminhada mais agradável e por me proporcionar aprendizagens que levarei por toda minha vida.

Ao meu esposo João pelo incentivo, apoio e motivação.

A minha família em especial minha mãe Sueli, minha irmã Karine e minha avó Edmunda pelo amor, cuidado e compreensão.

À Mariana Mattos por me ajudar a superar meus medos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Lenaldo pela apoio, paciência e atenção.

Ao pessoal do LCTV Prof.^a Dr.^a Alone, Prof. Dr. Raniere, Dinah, Amanda, Junior, Andressa, Jaqueline, Suzi, Fernanda, Tailane, Lilian (companheira de turma), Akemi (aluna de iniciação científica), Tecla e Flávia, pelo carinho, pela companhia, por muitas ajudas no desenvolvimento das atividades e pela troca de experiências. Aprendi muito com vocês!

À Hortência e Jéssica, minhas colegas de turma, por compartilhar as expectativas, alegrias e até mesmo as angústias quando as coisas pareciam não dar certo.

À professora Angélica, por ceder o espaço no LAPRON para o treinamento das análises.

À professora Adriana e Marilza por conceder o espaço dos laboratórios para a execução dos experimentos.

Aos funcionários da Unidade Experimental do Horto Florestal por estarem sempre disponíveis para ajudar.

À Universidade Estadual de Feira de Santana e ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais pela oportunidade de realização do curso.

Ao Prof. Dr. Maurício Lordêlo pela ajuda na análise estatística.

À todos os professores do programa pela dedicação e por contribuir com zelo para a formação de novos mestres em RGV.

Ao CNPq e à FAPESB pelo apoio financeiro aos projetos coordenados pelo orientador, e à CAPES pela concessão da bolsa.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

RESUMO

A espécie *Byrsonima gardneriana* A. Juss. pertence à família Malpighiaceae, apresenta antocianinas em seus calos e um relevante potencial fitoquímico. O objetivo desse trabalho foi selecionar linhagens celulares e estabelecer um protocolo para estimular a produção de antocianinas em calos de *Byrsonima gardneriana* A. Juss.. Os calos foram induzidos a partir de explantes foliares obtidos de plantas estabelecidas *in vitro*, utilizando-se meio de cultura MS/2, acrescido de 7g L⁻¹ de ágar, 87,64mM de sacarose, 16µM de 6-benzilaminopurina (BAP) e 2µM de ácido naftalenoacético (ANA). Foi determinada a curva de crescimento dos calos e o teor de antocianinas em intervalos de 7 dias. Calos com 30 dias de cultivo foram categorizados em três linhagens celulares a partir da coloração, mantidas ao longo de cinco subcultivos. A estimulação foi realizada pela adição de manitol ao meio de cultura, pela exposição dos calos à radiação UV-C em diferentes intervalos de tempo e pela interação de reguladores vegetais BAP e 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacético) adicionados ao meio de cultura. A quantificação de antocianinas totais foi realizada pelo método pH único. Os resultados obtidos demonstram o período recomendado para o subcultivo de calos desta espécie é entre 21º e 56º dia de cultivo; aos 21 dias de cultivo verifica-se a melhor relação entre o teor de antocianinas e a massa dos calos; o subcultivo de linhagens celulares foi eficiente no segundo ciclo em apenas uma das linhagens; a adição de 5g L⁻¹ de manitol ao meio de cultura mostrou-se eficiente na estimulação da produção de antocianinas em calos desta espécie; a radiação UV-C e o tempo de exposição adotado não foram eficientes para estimular a biossíntese do metabólito em estudo; apesar da tendência de maior produção de antocianinas em calos cultivados na presença de BAP e 2,4-D, novos estudos devem ser conduzidos buscando-se um melhor entendimento do efeito dos reguladores vegetais na produção deste pigmento em calos desta espécie.

Palavras-chave: Plantas medicinais. Murici. Metabólito secundário. Flavonoides. Cultivo *in vitro*.

ABSTRACT

The species *Byrsonima gardneriana* A. Juss. belongs to the family Malpighiaceae and presents an important economic importance due to phytochemical potential and to present anthocyanins in its callus. The objective of this work was to select cell lines and to establish a protocol to stimulate the production of anthocyanins in callus of *Byrsonima gardneriana* A. Juss.. The callus were induced from leaf explants obtained from plants established *in vitro*, using half-saline MS culture medium, solidified with 7% agar, supplemented with 30% sucrose, 16 μ M 6-benzylaminopurine (BAP) + 2 μ M naphthaleneacetic acid (ANA). The growth curve of the callus and anthocyanin content was determined at each 7 day interval. After the callus induction, three cell lines were obtained from the staining, maintained throughout five subcultures. Stimulation was performed by the addition of mannitol to the culture medium inducing osmotic stress, by exposure of callus to UV-C radiation at different time intervals and by the interaction of plant regulators added to the culture medium. The extractions and quantifications were performed by the single pH method and the extracts readings were done in a spectrophotometer. The results obtained show that it is possible to induce *B. gardneriana* callus from the adopted conditions; the linear growth phase, observed between 21 and 56 days of cultivation, is the recommended period for the subculture of callus of the species; at 21 days of cultivation the best relationship between anthocyanin content and callus mass is verified; selection of strains and subcultures was efficient in the second cycle in only one of the strains; the addition of 5g L⁻¹ of mannitol to the culture medium is efficient in stimulating the production of anthocyanins in callus of the species; UV-C radiation as well as exposure time were not efficient to induce increased biosynthesis of the metabolite under study; despite the trend of higher production of anthocyanins in callus cultivated in the presence of BAP, new studies should be conducted, seeking a better understanding of the effect of plant regulators on the stimulation of the production of this pigment.

Keywords: Medicinal plants. Murici. Secondary metabolite. Flavonoids. Culture *in vitro*.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	REVISÃO DE LITERATURA	10
	2.1 Importância das plantas medicinais	10
	2.2 Família Malpighiaceae e o gênero <i>Byrsonima</i>	12
	2.3 Metabólitos secundários	14
	2.3.1 Antocianinas	14
	2.4 Biossíntese e regulação da produção de antocianinas	15
	2.5 Cultivo <i>in vitro</i> e produção de metabólitos secundários	17
3	MATERIAL E MÉTODOS	19
	3.1 Local de realização dos experimentos	19
	3.2 Material vegetal e estabelecimento <i>in vitro</i>	20
	3.3 Indução de calos e obtenção da curva de crescimento	20
	3.4 Seleção de linhagens celulares produtoras de antocianinas	22
	3.5 Efeito do estresse osmótico sobre a produção de antocianinas	23
	3.6 Efeito da radiação UV-C sobre a produção de antocianinas	23
	3.7 Efeito de reguladores vegetais na produção de antocianinas	24
	3.8 Extração e quantificação de antocianinas	24
	3.9 Delineamento experimental e análise estatística	26
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
	4.1 Estabelecimento <i>in vitro</i> de <i>Byrsonima gardneriana</i>	26
	4.2 Indução de calos e obtenção da curva de crescimento	27
	4.3 Seleção de linhagens celulares produtoras de antocianinas	31
	4.4 Efeito do estresse osmótico sobre a produção de antocianinas	34
	4.5 Efeito da radiação UV-C sobre a produção de antocianinas	36
	4.6 Efeito da interação de reguladores vegetais na produção de antocianinas	38
	CONCLUSÃO	42
	REFERÊNCIAS	43
	APÊNDICE	50

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma grande extensão territorial e condições climáticas que favorecem a ocorrência de seis biomas - Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal. Com isso, o país apresenta uma diversificada fonte de produtos naturais com potencial alimentar, medicinal, forrageiro, madeireiro e artesanal. A Caatinga é um bioma singular no planeta e de extrema importância biológica, possuidor de uma riquíssima diversidade de espécies vegetais e animais (MARQUES, 2007). Esse bioma destaca-se por apresentar baixa pluviosidade e temperaturas elevadas, e apresenta uma grande riqueza de espécies vegetais produtoras de metabólitos secundários (GIULIETTI, 2002).

Os metabólitos secundários são substâncias utilizadas pelos próprios vegetais como estratégias de sobrevivência, proteção contra herbívoros e patógenos, atrativos para polinizadores e dispersores de sementes. Para o homem, são fontes de alimento, tratamento e cura de doenças, sendo utilizados desde os primórdios da humanidade, construindo um conhecimento empírico muitas vezes utilizado como ponto de partida para posteriores comprovações científicas. As plantas que apresentam essas substâncias bioativas são conhecidas como plantas medicinais e são de grande importância para ciência moderna, através das quais novas substâncias bioativas continuam a ser identificadas e utilizadas principalmente na indústria alimentícia e farmacêutica.

Entre essas substâncias bioativas já conhecidas destacam-se as antocianinas, um corante natural pertencente ao grupo dos flavonoides. Além das diversas funções que desempenham nas plantas, como proteção contra radiação UV e atração de polinizadores e dispersores de sementes, as antocianinas tem despertado interesse por apresentar benefícios à saúde humana. Estes pigmentos têm um alto potencial para substituir os corantes alimentícios sintéticos, pois são abundantes na natureza, apresentam um amplo espectro de cores e apresentam intensa atividade antioxidante (PEREIRA & CARDOSO, 2012). As substâncias antioxidantes promovem a proteção contra danos oxidativos e prevenção dos danos causados pelas EROs (espécies reativas de oxigênio) (ROLIM, 2013). Relatos da literatura reportam atividade antioxidante e antimicrobiana ao extrato etanólico bruto de *Byrsonima gardneriana* (DAVID et al., 2007).

Representantes do gênero *Byrsonima* apresentam grande potencial para a produção de antocianinas, capaz de atender à demanda comercial por corantes naturais, visto que seus frutos apresentam esse pigmento. Porém, a sustentabilidade da cultura tem sido ameaçada pelo crescimento das cidades e do turismo nas regiões costeiras. Além disso, pesquisas têm focado

nos aspectos botânicos e na biologia reprodutiva, dando pouca atenção às técnicas de cultivo que apontem para produção sustentável e em larga escala. Contudo, a propagação da espécie ocorre através de sementes, o que permite iniciar a produção e colheita de frutos somente dois anos após o plantio. Dessa forma, as condições de cultivo em campo e o ciclo reprodutivo longo têm incentivado estudos para desenvolver sistemas que possibilitem a produção desses pigmentos em larga escala.

Nesse contexto, o cultivo *in vitro* de células e tecidos vegetais constitui uma alternativa com grande potencial para exploração biotecnológica de compostos bioativos, visto que os cultivos celulares possuem taxas metabólicas mais altas que muitas células diferenciadas em uma planta intacta. O cultivo *in vitro* também oferece vantagens, especialmente para espécies com longo ciclo reprodutivo, a fim de permitir uma produção em grande escala, utilizando espaço físico menor e sem influência de fatores ambientais, como solo e clima (FRANÇA, 2001). Vale ressaltar que o uso de técnicas de cultivo *in vitro* é bastante promissor, visto que se faz necessário estudar estratégias de produção desse pigmento em escala comercial e sustentável, além de dar embasamento para projetos biotecnológicos futuros com esta espécie.

Diante do exposto, este trabalho objetivou estabelecer um protocolo de produção de antocianinas a partir de calos da espécie *Byrsonima gardneriana* A. Juss.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Importância das plantas medicinais

As plantas se tornaram essenciais para a sobrevivência da maioria dos seres vivos do planeta, devido não somente à sua importância ecológica, mas também por apresentarem uma complexa estrutura química gerando produtos utilizados para diversos fins (MEDEIROS, 2010). Registros históricos mostram que desde os primórdios da existência humana as plantas são utilizadas pelo homem, com destaque ao uso terapêutico (DE AMORIM et al., 2003), de modo que as propriedades terapêuticas derivadas de plantas foram evidenciadas desde as mais antigas civilizações humanas (MEDEIROS, 2010). Segundo De Amorim et al. (2003), no Brasil, as utilidades das plantas medicinais são resultantes de uma série de influências culturais, como a dos colonizadores europeus, os povos indígenas e os africanos.

A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) define como planta medicinal a espécie vegetal, cultivada ou não, utilizada com propósitos terapêuticos, utilizada na prevenção, tratamento ou cura de doenças, possui princípio ativo conhecido e fornece eventualmente matéria-prima para a indústria farmacêutica. Define também, os medicamentos fitoterápicos como sendo produtos obtidos a partir de matéria-prima ativa vegetal, exceto substâncias isoladas, com finalidade profilática, curativa ou paliativa (BRASIL, 2014).

O Brasil apresenta um grande potencial para a produção de fitoterápicos, por possuir em seu território cerca de um terço da flora mundial (CALIXTO, 2003). Porém, o crescimento no setor de fitoterápicos necessita de investimentos em pesquisa e desenvolvimento, o que ainda é restrito a um reduzido número de empresas cujos dados de capital investido são inconsistentes (KLEIN et al., 2010). Esses autores afirmam que países desenvolvidos como Japão e Estados Unidos são os que mais investem na produção de fitoterápicos. Em 2011, o Brasil movimentou R\$ 1,1 bilhão no mercado de fitoterápicos, enquanto o mercado mundial movimentou US\$ 26 bilhões, o que correspondeu a 3,2% de todo o comércio de medicamentos. A Europa detém 30% desse mercado, contrapondo com a América Latina que conta com sete países de elevada biodiversidade, entretanto, tem apenas 5% de participação (CASTRO, 2016).

A biodiversidade brasileira constitui uma rica e diversificada fonte de produtos terapêuticos, com destaque à região semiárida do nordeste brasileiro (SOUZA et al., 2008). Essa região representa uma potencial fonte de substância de interesse industrial, por apresentar condições estressantes para as plantas, como altas temperaturas e déficit de água, o que favorece a produção de metabólitos secundários (LARCHER, 1993). Entretanto, esses recursos naturais

são frequentemente negligenciados pela expansão de atividades econômicas exploratórias (PIMENTEL et al., 2015).

O uso desses recursos naturais pode ser incentivado pelo desenvolvimento de pesquisas com plantas medicinais e fitoterápicos em escala mais expressiva. Pode-se destacar que ainda são restritas as parcerias público-privadas e entre indústrias e universidades, a ausência de uma política de conservação que implemente o cultivo e manejo racional de espécies medicinais, o reduzido número de grupos de pesquisa para a vasta biodiversidade brasileira, o baixo número de arranjos produtivos que envolvam toda a cadeia produtiva, e ainda o baixo número de pesquisas para a determinação de doses e ensaios clínicos (TOLEDO et al., 2003).

Contudo, nessa última década, o fortalecimento da indústria de medicamentos fitoterápicos tem sido apontado como uma alternativa promissora para o crescimento econômico dos países em desenvolvimento e como estratégia para facilitar e aumentar o acesso da população a medicamentos, no caso brasileiro, especialmente através do sistema público de atenção à saúde. A justificativa para a eleição dessa indústria como potencial alavanca para o desenvolvimento do setor farmacêutico no Brasil, estaria na possibilidade de articulação de diversos fatores, entre eles: a chamada megabiodiversidade brasileira, a existência de conhecimentos tradicionais ainda pouco reconhecidos e valorizados, a atual “crise de inventividade” da indústria mundial de medicamentos sintéticos e os crescentes gastos com a importação destes últimos para o atendimento das necessidades do Sistema Único de Saúde (SUS) (FIGUEREDO et al., 2014).

Com o intuito de conhecer, proteger e garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, em 2006, foi criada a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF). Este documento busca promover o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional, além de usar de forma racional e sustentável a biodiversidade da flora brasileira. Busca ainda, o uso de plantas medicinais e fitoterápicos nos serviços do SUS; reconhece as práticas populares e tradicionais de uso de plantas medicinais e remédios caseiros; inclui a agricultura familiar nas cadeias produtivas; promove a adoção das boas práticas de cultivo, manipulação e produção de plantas medicinais e fitoterápicos; desenvolve instrumentos de fomento à pesquisa, desenvolvimento de tecnologias e inovações em plantas medicinais e fitoterápicos nas diversas fases da cadeia produtiva; e incentiva a formação técnico-científica e capacitação no setor de plantas medicinais e fitoterápicos (FIGUEREDO et al., 2014).

Embora essa janela de oportunidades pareça ter sido reconhecida, a intrincada regulamentação envolvendo as atividades de pesquisa, o pouco acesso aos recursos genéticos e

ao conhecimento das comunidades tradicionais (TÁVORA et al., 2015), aliado à pequena integração entre universidades e as indústrias do setor, se apresentam ainda como importantes obstáculos ao desenvolvimento da pesquisa com fitoterápicos no Brasil (HASENCLEVER, 2013).

2.2 Família Malpighiaceae e o gênero *Byrsonima*

A família Malpighiaceae é constituída por ervas, arbustos, árvores ou lianas, e apresentam aproximadamente 1.300 espécies, das quais 97 estão amplamente distribuídas no Brasil, sendo registradas 12 espécies para bioma Caatinga (ANDERSON 2013; MAMEDE, 2015). Plantas pertencentes à família Malpighiaceae são ricas em substâncias antioxidantes, tais como taninos e flavonoides (GOTTLIEB et al., 2001)

Nesta família, o gênero mais extensivamente estudado tem sido o *Byrsonima*, possuidor de 150 espécies, com distribuição marcadamente neotropical (TEIXEIRA & MACHADO, 2000). O gênero *Byrsonima* é o maior da família Malpighiaceae e agrupa espécies de grande importância medicinal, ornamental e produtoras de frutos comestíveis (RIBEIRO et al., 1999). As espécies de *Byrsonima* possuem baixa taxa de germinação e crescimento lento das plântulas (LORENZI, 2002), o que tem dificultado seu cultivo de forma sistematizada, com exploração basicamente extrativista, o que tem incentivado pesquisas para a propagação através do cultivo *in vitro* e conservação dessas espécies.

No gênero *Byrsonima* destaca-se a espécie *B. gardneriana* (Figura 1), nativa e endêmica do Brasil, encontrada nos domínios fitogeográficos da Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica (MAMEDE, 2015), conhecida em algumas regiões do nordeste como murici e murici-pitanga. A espécie apresenta porte arbustivo, folhas simples, opostas e obovadas, flores dispostas em racemos terminais, androceu formado por 10 estames cujas anteras são amarelas e o gineceu composto por ovário súpero, unicarpelar e uniovular (BEZERRA et al., 2009). A frutificação de espécies de *Byrsonima* pode ocorrer ao longo de todo o ano sendo os frutos são bastante apreciados, podendo ser consumidos *in natura* ou processados artesanalmente na forma de doces, geleias, sorvetes, suco e licores (LUIS, 2008). Os frutos são drupas de coloração amarela quando maduros, com exocarpo fino, mesocarpo carnoso, endocarpo pétreo, contendo um único pirênio com três lóculos e uma semente em cada lóculo (BEZERRA et al., 2009).

Um extenso uso etnofarmacológico motivou vários trabalhos acerca da constituição química e do potencial farmacológico do gênero, devido aos resultados promissores apresentados (GUILHON-SIMPLICIO & PEREIRA, 2011).

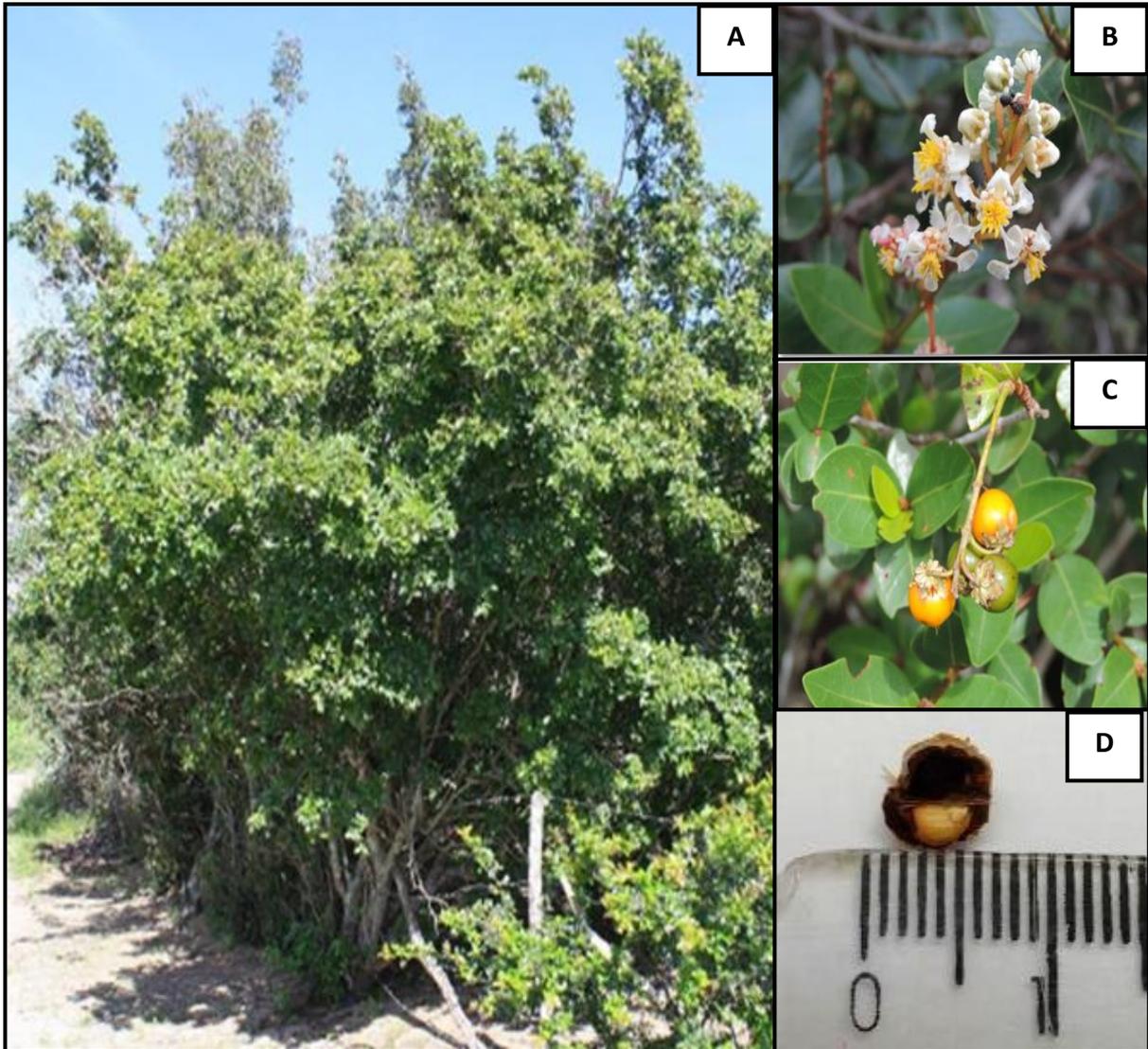


Figura 1: Arbusto (A), flores (B), fruto (C) e semente (D) de *Byrsonima gardneriana* A. Juss. Fonte: A – C Sá (2015).

David et al. (2007) relatou a atividade antioxidante e antimicrobiana ao extrato etanólico bruto de *B. gardneriana* e, posteriormente, Rolim (2013) identificou constituintes químicos em fase clorofórmica extraídos da parte aérea desta espécie, sendo o 3-oxo-5-ene-glutinona e friedoolean-14-em-3-ona descritos pela primeira vez no gênero e friedelan-3-ona, 3 β -hidroxilean-12-eno e lup-20-em-3-ol relatados pela primeira vez na espécie.

Antocianinas foram relatadas em frutos de *Byrsonima ligustrifolia* A. Juss. (murici vermelho) além de cianidina-3-glicosídeo, pelargonidina-3-glicosídeo, peonidina-3-glicosídeo e delphinidina-3-glicosídeo (SAMPAIO, 2015). O estudo da casca do fruto de *Byrsonima crassifolia* (L.) Rich também revelou a presença de alto teor de antocianinas ($1,81 \pm 0,03$ mg de cianidina-3-glicosido/100g da amostra), que junto com outros metabólitos, como

flavonoides, taninos e fenóis totais, conferiu ao extrato investigado altos níveis de atividade antioxidante (OLÓRTEGUI, 2016).

Apesar da importância econômica e do potencial fitoquímico do gênero poucos trabalhos foram dedicados ao estudo da propagação de suas espécies, principalmente para o uso racional e sustentável (LUIS, 2008).

2.3 Metabólitos secundários

As plantas produzem uma diversificada variedade de compostos orgânicos, a grande maioria dos quais não participa diretamente dos processos de crescimento e desenvolvimento vegetal (AMEIRA et al., 2009). Essas substâncias, tradicionalmente referidas como metabólitos secundários, são produzidas pela planta sob a influência de fatores ambientais e muitas vezes são diferencialmente distribuídos entre grupos taxonômicos (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

Atualmente sabe-se que muitas dessas substâncias estão envolvidas nos mecanismos que permitem a adequação da planta produtora ao seu meio (SIMIONE et al., 2013), e apresentam um significado adaptativo na proteção contra herbivoria e infecção microbiana. Além disso, estas substâncias são atraentes para polinizadores e animais dispersantes de sementes, assim como agentes alelopáticos (GOBBO-NETTO, 2007). Assim, os metabólitos secundários representam uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante, sendo, por isso, a sua biossíntese frequentemente afetada por condições ambientais (SIMIONE et al., 2013), tais como sazonalidade, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, disponibilidade de nutrientes, altitude, poluição atmosférica, bem como por estímulos mecânicos ou ataque de patógenos, entre outros (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

Os metabólitos secundários funcionam também como agentes de competição entre plantas e de simbiose entre plantas e microrganismos, além de disponibilizar para o homem uma riquíssima fonte de produtos naturais. Estes compostos são divididos em três grandes grupos: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados (TAIZ & ZEIGER, 2007),

2.3.1 Antocianinas

Entre os metabólitos secundários de plantas, grande importância ecológica e econômica é dada às antocianinas (HAMERSKI et al., 2013). Pertencente à classe dos flavonoides, as antocianinas são pigmentos solúveis em água que se encontram dispersos nos vacúolos celulares de muitas frutas, hortaliças, folhas e flores, responsável pelos tons que compreendem desde a coloração vermelha até a púrpura e azul (SAMPAIO, 2015). As antocianinas desempenham diversas funções nas plantas, como atividade antioxidante, proteção à ação da

radiação UV e mecanismo de defesa; além disso, as cores vivas e intensas que elas produzem têm um papel importante em vários mecanismos reprodutivos das plantas, tais como a polinização e a dispersão de sementes (LOPES et al., 2007).

Para a indústria alimentícia, as antocianinas representam um importante substituinte aos corantes artificiais, atendendo à crescente demanda mundial por produtos naturais e saudáveis (TEIXEIRA & MACHADO, 2000). A produção comercial de antocianinas tem crescido consideravelmente e a demanda por corantes naturais continua a aumentar em 5-15% a cada ano. Atualmente, extratos vegetais de uva, cenoura preta, repolho roxo e batata doce são as principais fontes industriais deste pigmento, e os mais utilizados são extratos de cascas de uvas residuais da indústria do vinho (ANANGA et al., 2013). Contudo, o uso de vegetais inteiros não tem atendido à demanda, devido ao ciclo e espaço necessário para o cultivo e a baixa concentração nos tecidos. Nesse contexto, o cultivo *in vitro* de células, tecidos e órgãos de plantas tem sido considerado alternativa promissora para a produção em escala comercial de metabólitos secundários, de modo a viabilizar explorações econômicas (NEPOMUCENO, 2012).

2.4 Biossíntese e regulação da produção de antocianinas

Segundo Lopes et al. (2007), o termo antocianina é de origem grega (*anthos* flor, e *kyanos*, azul escuro) e representam o mais importante grupo de pigmentos de origem vegetal após a clorofila. São glicosídeos pertencentes à família dos flavonoides e sua estrutura química básica (Figura 2) é formada por quinze carbonos distribuídos em dois anéis aromáticos (A e B), unidos por uma cadeia de três carbonos (LOPES et al., 2007). O número e orientação dos grupos hidroxila e metoxila ligados à estrutura do anel B determina a cor e a natureza das seis principais antocianinas identificadas (GARZÓN, 2008).

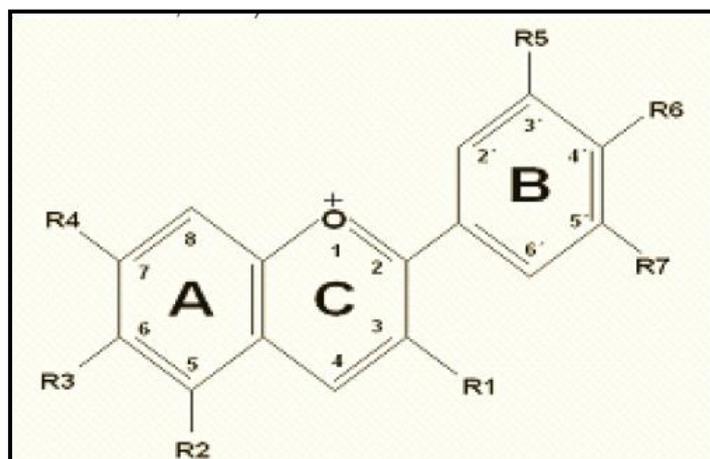


Figura 2: Estrutura química geral das antocianinas. Fonte: López et al. (2000).

Esses pigmentos são produzidos através da via dos fenilpropanoides que também gera outros metabólitos secundários, incluindo lignanos, ligninas, estilbenos e ácidos hidroxiciânicos (MORO, 2013). Na rota biossintética das antocianinas (Figura 3), o primeiro passo é a condensação da fenilalanina e acetato por ação da enzima fenilalanina amônio-liase (PAL). Essa reação produz o 4-cumaroil CoA através da desaminação não oxidativa da L-fenilalanina a ácido cinâmico, uma reação que regula o fluxo de carbono para essa via. Posteriormente, a chalcona sintase (CHS) condensa os precursores melanoil CoA e 4-cumaroil CoA para formar chalcona. Neste caso ocorre a formação de um composto intermediário com 15 carbonos, transformado posteriormente em uma flavona pela chalcona isomerase (CHI) para produzir a naringenina. Por fim, a flavona sofre uma reação de hidroxilação no carbono C3, seguida de uma desidratação, formando uma molécula de antocianina estabilizada pela glicosilação, por ação de uma glicosil transferase (MORO, 2013).

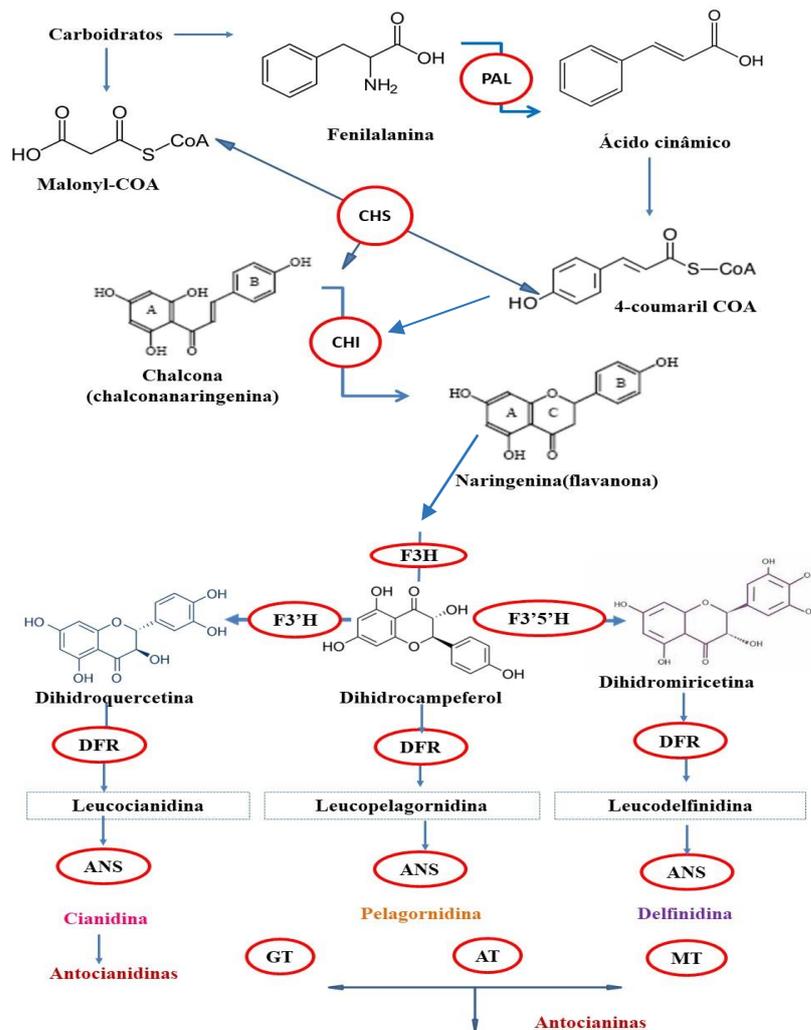


Figura 3: Via Biossintética dos flavonoides com destaque para a formação de antocianinas. PAL- fenilalanina amônio-liase; CHS- chalcona sintase; CHI- chalcona isomerase; F3H- flavanona 3-hidroxilase; F3',5'H- flavonoide 3',5' hidroxilase; DFR- dihidroflavonol 4-redutase; ANS- antocianidina sintase; GT- Glicosiltransferases; AT- Aciltransferases; MT- Metiltransferases. Figura da autora.

Duas classes de genes são necessárias para regular a biossíntese de antocianinas: os genes estruturais, que codificam as enzimas a nível transcricional e que participam diretamente na formação de antocianinas e outros flavonoides, e os genes regulatórios que controlam a transcrição dos genes estruturais (GUO et al., 2008). Ananga et al. (2013) descreve como os primeiros genes biossintéticos (EBGs) os fatores de transcrição Myb, os fatores de transcrição Myc, e famílias de proteínas semelhantes a WD40.

Diversos genes que regulam a síntese de antocianinas já foram identificados. Como reguladores de transcrição de genes estruturais foram identificados em *Hibiscus sabdariffa* L os genes ANS e F3'H (DIOS-LÓPEZ et al., 2011), o MYB10 em framboesas (MORO, 2013) e o PAP1 e PAP2 (família Myb), GL3 e EGL3 (família Myc) e TTG1 (família WD40) em *Arabidopsis thaliana* (ANANGA et al., 2013), entre outros.

Os genes que regulam a formação das antocianinas através da glicosilação estão sob o controle de vários fatores regulatórios, tais como exposição à fitorreguladores, estresse osmótico e deficiência de fósforo e nitrogênio, sendo a luz um dos fatores ambientais mais importantes na regulação, desenvolvimento das plantas e a expressão de genes (ANANGA et al., 2013).

A exposição à luz regula a expressão dos genes promotores e estimula a expressão de genes estruturais, codificando as enzimas através da via do chiquimato, mas não tem efeito sobre a expressão de genes repressores (ANANGA et al., 2013). Muitos componentes de sinalização ativados por UV também foram identificados, no entanto, as vias de transdução de sinal ativadas pela radiação UV-B ainda não estão bem definidas (STRATMANN et al., 2000). Entretanto, está bem estabelecido que plantas submetidas artificialmente a radiação UV-B respondem por mudanças na síntese de flavonoides (CASATI & WALBOT, 2003). Os flavonoides geralmente absorvem a região de 280-315nm e, portanto, são capazes de atuar como filtros, protegendo assim a base de tecidos fotossintéticos de possíveis danos (GUO et al., 2008). Respostas positivas para a produção de antocianinas com a exposição a UV-B foram observadas em *Zea mays* L. (CASATI & WALBOT, 2003) e em *Arabidopsis thaliana* (ULM et al., 2004). É possível que a exposição à UV-A tenha contribuído para a produção de antocianinas e proteção do tecido vegetal, porém não teve um forte impacto nos perfis de expressão gênica como observado para a baixa exposição à UV-B (GUO et al., 2008).

2.5 Cultivo *in vitro* e produção de metabólitos secundários

Entende-se como cultivo *in vitro* o conjunto de metodologias que permitem o crescimento e a multiplicação de células, tecidos, órgãos ou partes de órgãos de uma planta

(explante) em meio nutritivo e em condições assépticas (AMMIRATO, 1984). Em geral, o explante é cultivado em recipientes semi-herméticos e sob condições ambientais de iluminação e temperatura controladas. Esta técnica baseia-se principalmente na totipotência das células vegetais, ou seja, na capacidade de produzir órgãos, como brotos e ou raízes (organogênese) ou embriões somáticos que regeneram uma planta completa (embriogênese somática) (QUISEN & ANGELO, 2008).

Em geral, o meio de cultura fornece ao material vegetal (semente, plântula ou explante), as substâncias necessárias ao seu desenvolvimento, contendo sais inorgânicos que proveem os macronutrientes (como cálcio, magnésio, enxofre, potássio, fósforo e nitrogênio) e os micronutrientes (zinco, ferro, cobre, manganês, cloro, molibdênio e boro), além de uma fonte de carbono e vitaminas hidrossolúveis, podendo ter ou não um agente gelificante (CID, 2010). Além disso, a composição e a concentração dos reguladores vegetais no meio de cultura são os fatores determinantes no processo de morfogênese *in vitro*, sendo as citocininas e as auxinas as classes de reguladores vegetais mais utilizadas, cujas concentrações devem ser determinadas experimentalmente (REZENDE et al., 2008). Estes reguladores vegetais atuam em conjunto de forma que as auxinas atuam na duplicação do material genético, participando da indução de calos e no enraizamento, enquanto as citocininas promovem a divisão celular e estão relacionadas com a indução de brotos a partir de calos e multibrotações a partir de gemas (CID, 2010).

O cultivo *in vitro* de células e tecidos vegetais tem sido utilizado para a propagação em larga escala de plantas, conservação *in vitro*, obtenção e seleção de plantas resistentes a condições adversas (fungos, bactérias, herbicidas, entre outros), transgenia e produção de metabólitos secundários (FRANÇA, 2001).

A produção *in vitro* de metabólitos secundários em tecidos vegetais tem sido estudada devido ao grande potencial econômico que tem (GÓMEZ-ZELEDÓN & JIMÉNEZ, 2011). No entanto, são encontradas muitas limitações no processo de obtenção da biomassa, bem como a identificação das vias metabólicas e os estímulos necessários para ativar essas vias. Para Gómez-Zeledón & Jiménez (2011), em muitas ocasiões, certos compostos são produzidos apenas em um tipo de célula. Desse modo, o desenvolvimento de culturas celulares tem sido importante para a identificação dos fatores limitantes e superação destas limitações.

A identificação de linhagens celulares cultivadas *in vitro* que apresentem alta produtividade de metabólitos tem sido feita através da seleção de pequenos agregados celulares (VERPOORTE & MARASCHIN, 2001). Este processo pode ocorrer em algumas etapas e utilizando diferentes técnicas, partindo da identificação de indivíduos mais promissores na

produção do metabólito em estudo. Após a obtenção das culturas, subculturas periódicas ou seleção de linhagens são recomendadas para se buscar a estabilidade e/ou uniformidade dos tecidos de calos, já que podem ocorrer variações somaclonais, gerando uma variabilidade na produção dos metabólitos entre um ciclo e outro. Quando a estabilidade genética é alcançada, recomenda-se o uso da técnica de suspensão celular em meio líquido que permite a recuperação de um grande número de células das quais os metabólitos de interesse podem ser facilmente isolados (FUMAGALI et al., 2008).

A produção de metabólitos secundários *in vitro* pode ser afetada pela composição do meio de cultura, principalmente quando se modifica a concentração e natureza de compostos, como nitrogênio, fósforo, reguladores de crescimento e fontes de carbono, ou ainda quando adicionados ao meio substâncias que interferem na rota metabólica do composto de interesse (FUMAGALI et al., 2008). Apesar das dificuldades, existem muitos trabalhos bem sucedidos de obtenção de metabólitos secundários *in vitro* (SILVA, 2016). Gómez-Zeledón & Jiménez (2011) realizaram uma descrição geral dos recentes trabalhos científicos sobre a produção *in vitro* de antocianinas. Segundo estes autores, diversas pesquisas têm demonstrado o efeito de mudanças nas condições da cultura, da adição de precursores, do uso de reguladores de crescimento, bem como o uso de indutores e estressores na produção deste metabólito.

Tarrahi & Rezanejad (2013) observaram o acúmulo de antocianina em calos de *Rosa gallica* e *Rosa hybrida* (Rosaceae). Em ambas as espécies, o aumento na produção de antocianina foi obtido em calos a partir de explantes de folha (*R. gallica* 140 μmoLg^{-1} e *R. hybrida* 58 μmoLg^{-1}) e haste (*R. gallica* 120 μmoLg^{-1} e *R. hybrida* 42 μmoLg^{-1}) aos 60 dias de cultivo, em comparação com calos de flores. Adicionalmente, em *R. gallica*, um aumento de mais de 1,5 vezes o teor de antocianinas foi observado em explantes de pétala e antera em comparação com esses valores em *R. hybrida*, demonstrando que as antocianinas não são produzidas na mesma intensidade em calos originados de diferentes espécies de plantas e de diferentes explantes.

Para Gómez-Zeledón & Jiménez (2011), embora as culturas celulares de origem vegetal possam produzir uma grande quantidade de metabólitos secundários, a produção comercial deles ainda é um desafio, o que requer novos estudos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local de realização dos experimentos

As etapas do cultivo *in vitro* foram desenvolvidas no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV), localizado na Unidade Experimental Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana – UEFS. As etapas de extração e quantificação de antocianinas foram realizadas no Laboratório de Genética Molecular (LAGEM) e Laboratório de Germinação (LAGER), também situados no Horto Florestal da UEFS.

3.2. Material vegetal e estabelecimento *in vitro*

As sementes utilizadas foram obtidas de populações naturais localizadas na área de proteção ambiental (APA) Serra Branca/Raso da Catarina, Jeremoabo, Bahia, Brasil, (Latitude 10° 00' 49,1" e Longitude 38° 22' 52,4"). A identificação botânica foi realizada no Herbário da Universidade do Estado da Bahia (HUNEB), onde as exsicatas encontram-se depositadas sob o registro número 28450. As sementes foram armazenadas em embalagens de papel e mantidas sob refrigeração no LCTV.

Os frutos de *B. gardneriana* tiveram seus endocarpos abertos manualmente com o auxílio de uma morsa de mesa para a retirada da semente. Em seguida, todas as manipulações foram realizadas em condições assépticas em câmara de fluxo laminar previamente desinfestada com álcool 70%. Em câmara de fluxo laminar as sementes foram desinfestadas em álcool 70% por 30 segundos, seguido da solução de hipoclorito de sódio comercial (2,5%) e uma gota de detergente neutro por 10 minutos e, posteriormente, lavadas quatro vezes em água destilada autoclavada. As mesmas foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 10mL de meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) com metade das concentrações salinas (MS/2), suplementado com 87,64mM de sacarose e solidificado com 7g L⁻¹ de ágar. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,7 ± 0,1 [utilizando-se hidróxido de sódio (NaOH) e/ou ácido clorídrico (HCl) 0,1N] antes da autoclavagem a 121°C por 15 minutos. Após as inoculações os tubos foram fechados com filme de policloreto de vinila (PVC) e as culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 3°C, fotoperíodo de 16 horas e radiação fotossintética ativa de 40µmol m⁻² s⁻¹.

3.3 Indução de calos e obtenção da curva de crescimento

Após sessenta dias da semeadura foram utilizados explantes foliares obtidos entre o primeiro e o terceiro par de folhas expandidas, contados a partir do ápice da planta, com aproximadamente 0,5 cm², preservando-se a nervura central e com a região adaxial em contato com o meio de cultura (Figura 4). As manipulações foram realizadas em condições assépticas em câmara de fluxo laminar previamente desinfestada com álcool 70% e os explantes

inoculados em tubos de ensaio contendo 10mL de meio de cultura MS com metade da concentração dos sais (MS/2), suplementado com 87,64mM de sacarose e solidificado com 7g L⁻¹ de ágar.

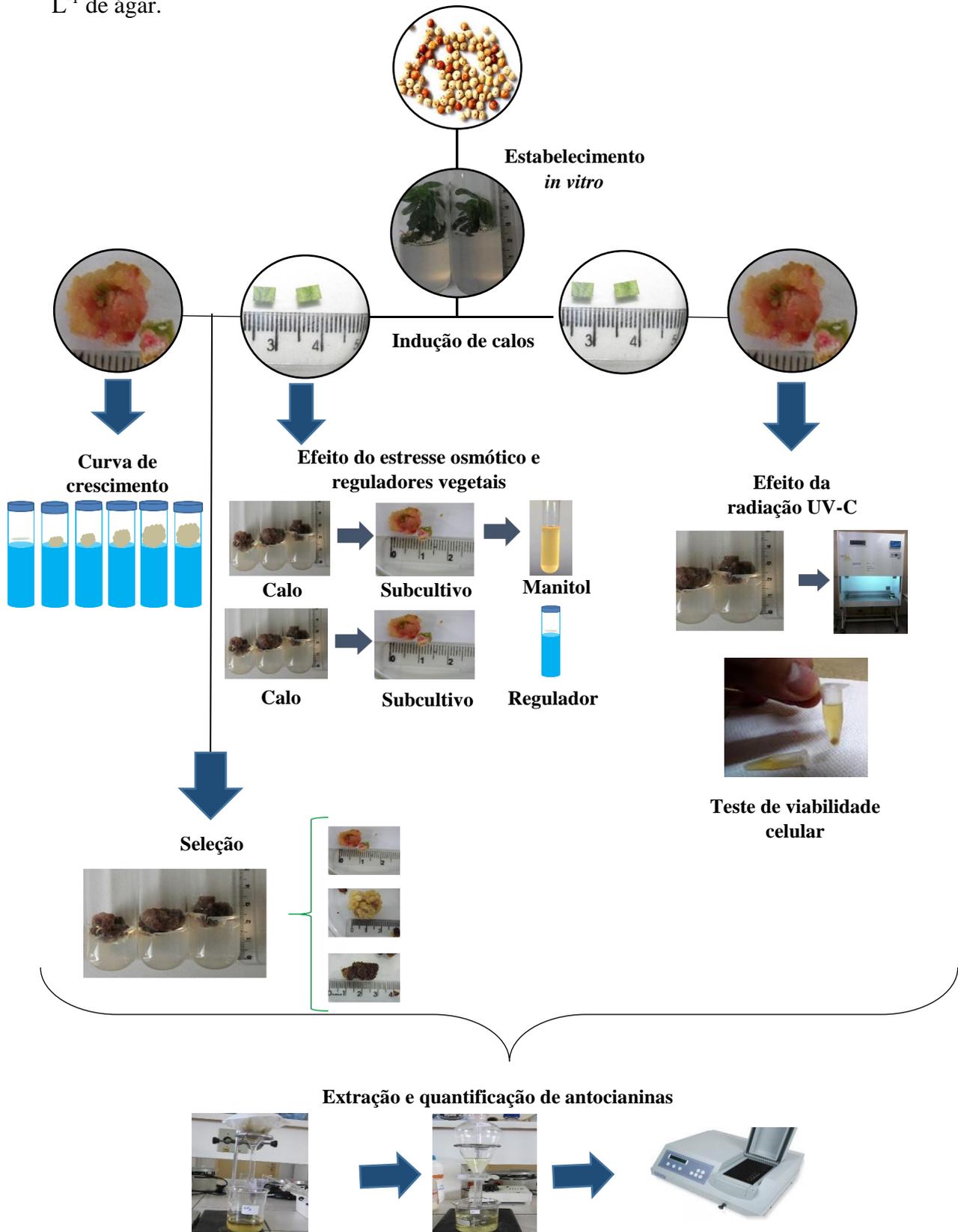


Figura 4: Esquema da metodologia utilizada na realização dos experimentos. Figura da autora.

Para induzir a formação de calos o meio de cultura foi suplementado com 16 μ M de 6-benzilaminopurina (BAP) + 2 μ M de ácido naftalenoacético (ANA), conforme concentrações descritas por Sá (2015). O pH do meio de cultura foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$ (utilizando-se NaOH e/ou HCl 0,1N), antes da autoclavagem à temperatura de 121°C por 15 minutos. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$ e ausência de luz à $25 \pm 3^\circ\text{C}$.

Para obtenção da curva de crescimento foi quantificada a matéria fresca (em mg) dos calos formados, a partir do dia “zero” (explantes antes da inoculação) até 91 dias de cultivo, em intervalos de 7 dias, totalizando 13 períodos. O percentual de crescimento dos calos foi determinado por meio da equação: $\frac{Pf - Pi}{Pi} \times 100$, onde Pi = Peso inicial e Pf = Peso final de calos (LAMEIRA, 1997).

Foram utilizadas três repetições, sendo cada repetição constituída por três unidades experimentais (três calos). Após a quantificação da massa fresca dos calos, em cada período, foram obtidos extratos (metodologia descrita em 3.8) para quantificação de antocianinas, utilizando-se três repetições, sendo cada repetição constituída por três unidades experimentais (três calos).

3.4 Seleção de linhagens celulares produtoras de antocianinas

Para a seleção de linhagens produtoras de antocianinas foram utilizados calos induzidos a partir de explantes foliares obtidos de plantas cultivadas *in vitro* por 60 dias. Os explantes foliares foram obtidos entre o primeiro e o terceiro par de folhas expandidas, contados a partir do ápice da planta, com aproximadamente 0,5 cm², preservando-se a nervura central e com a região adaxial em contato com o meio de cultura. As manipulações foram realizadas em condições assépticas em câmara de fluxo laminar, utilizando-se tubos de ensaio contendo 10mL de meio de cultura MS/2, suplementado com 87,64mM de sacarose e solidificado com 7g L⁻¹ de ágar. Para induzir a formação de calos o meio de cultura foi suplementado com 16 μ M de BAP + 2 μ M de ANA. O pH do meio de cultura foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$ (utilizando-se NaOH e/ou HCl 0,1N), antes da autoclavagem à temperatura de 121°C por 15 minutos. Após a inoculação, as culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$, radiação fotossintética ativa de 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, e fotoperíodo de 16 horas durante 30 dias. Findado esse período, os calos foram isolados em câmara de fluxo laminar em condições assépticas e seccionados de acordo com a gradação da coloração, separando-se em três categorias: A – coloração rosa, B – coloração amarela, e C – coloração marrom. Cinco ciclos de subcultivos foram realizados, e a cada ciclo os calos foram seccionados e categorizados

pela cor, sendo transferidos para um novo meio de cultura, idêntico ao inicial, mantendo-se nas mesmas condições de sala de cultivo. Trinta dias após cada subcultivo, amostras de calos foram coletadas para a obtenção da massa fresca e quantificação do teor de antocianinas, utilizando-se três repetições com três amostras (três calos) em cada repetição.

3.5 Efeito do estresse osmótico sobre a produção de antocianinas

Para este experimento, os calos foram obtidos a partir de explantes foliares retirados de plantas cultivadas *in vitro* por 60 dias. Os explantes foram obtidos entre o primeiro e o terceiro par de folhas expandidas, contados a partir do ápice da planta, com aproximadamente 0,5 cm², preservando-se a nervura central e com a região adaxial em contato com o meio de cultura. As inoculações foram realizadas em condições assépticas em câmara de fluxo laminar, utilizando-se tubos de ensaio contendo 10mL de meio de cultura MS/2, suplementado com 87,64mM de sacarose e solidificado com 7g L⁻¹ de ágar. Para induzir a formação dos calos o meio de cultura foi suplementado com 16µM de BAP + 2µM de ANA. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,7 ± 0,1 (utilizando-se NaOH e/ou HCl 0,1N), antes da autoclavagem à temperatura de 121°C por 15 minutos. Após a inoculação, as culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 3°C, fotoperíodo de 16 horas e radiação fotossintética ativa de 40µmol m⁻² s⁻¹ por 30 dias. Findado esse período, os calos foram isolados em câmara de fluxo laminar em condições assépticas e transferidos para um novo meio de cultura idêntico ao inicial e suplementado com diferentes concentrações de manitol: 0g L⁻¹ (controle), 2,5g L⁻¹, 5,0g L⁻¹, 7,5g L⁻¹, 10,0g L⁻¹. O pH do meio foi ajustado para 5,7 ± 0,1, antes da autoclavagem à 127°C por 15 minutos. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 3°C, fotoperíodo de 16 horas e radiação fotossintética ativa de 40µmol m⁻² s⁻¹. Transcorridos 30 dias sob estas condições, amostras de calos foram coletadas para a obtenção da massa fresca e quantificação do teor de antocianinas, utilizando-se três repetições com três amostras (3 calos) em cada repetição.

3.6 Efeito da radiação UV-C sobre a produção de antocianinas

Amostras de calos obtidos a partir de explantes foliares com aproximadamente 0,5 cm², retirados de plantas cultivadas *in vitro* por 60 dias, foram cultivados em placa de Petri (5 explantes por placa) contendo 40mL meio de cultura MS/2 suplementado com 87,64mM de sacarose e solidificado com 7g L⁻¹ de ágar, além dos reguladores vegetais 16µM de BAP + 2µM de ANA. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 3°C, fotoperíodo de 16 horas e radiação fotossintética ativa de 40µmol m⁻² s⁻¹. Após 30 dias de

cultivo, estes calos foram expostos à radiação ultravioleta (UV). Para tanto, foram utilizadas lâmpadas UV-C 8W - T5 em câmara de fluxo laminar, por diferentes intervalos de tempo (2, 4, 8, 16, 32 e 64min). Após a exposição, os calos foram mantidos em sala de crescimento por mais 30 dias, mantendo-se as condições de cultivo já descritas. Transcorrido esse tempo, amostras de calos foram coletadas para a obtenção da massa fresca e quantificação do teor de antocianinas, utilizando-se três repetições com três amostras (3 calos) em cada repetição.

Para avaliar a viabilidade celular, 24 horas após a exposição em luz UV-C, amostras de calos foram obtidas e submetidas ao teste de viabilidade por imersão em solução tetrazólio (2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio) à 0,5% e mantidas em ausência de luz por 60min. Findado esse período, a coloração foi observada em lupa OPTON[®] considerando vivos os calos que, ao reagir com a solução, apresentaram a coloração rosa.

3.7 Efeito de reguladores vegetais na produção de antocianinas

Foram induzidos calos a partir de explantes foliares obtidos de plantas cultivadas *in vitro* por 60 dias. Os explantes foliares foram obtidos entre o primeiro e o terceiro par de folhas expandidas, contados a partir do ápice da planta, com aproximadamente 0,5 cm², preservando-se a nervura central e com a região adaxial em contato com o meio de cultura. As manipulações foram realizadas em condições assépticas em câmara de fluxo laminar, utilizando-se tubos de ensaio contendo 10mL de meio de cultura MS/2, suplementado com 87,64mM de sacarose e solidificado com 7g L⁻¹ de ágar. Para induzir a formação de calos o meio de cultura foi suplementado com 16µM de 6-benzilaminopurina (BAP) + 2µM de ácido naftalenoacético (ANA). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,7 ± 0,1 (utilizando-se NaOH e/ou HCl 0,1N), antes da autoclavagem à temperatura de 121°C por 15 minutos. Após 30 dias de cultivo, foi realizado o subcultivo em câmara de fluxo laminar em condições assépticas onde os calos foram transferidos para um novo meio de cultura suplementados com diferentes concentrações de BAP (0,0; 4,0; 8,0; 16,0 e 32µM) e 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacético) (0,0; 2,5; 5,0, 10,0 e 20,0µM), em esquema fatorial, totalizando 25 tratamentos. Após 30 dias submetidos ao novo tratamento os calos tiveram a massa fresca e o teor de antocianinas avaliado, utilizando-se três repetições com três amostras (3 tubos) em cada repetição.

3.8 Extração e quantificação de antocianinas

A extração e quantificação de antocianinas totais foi realizada de acordo com Silva (1996), descrito por Teixeira et al. (2008). As amostras de calos foram previamente pesadas e trituradas com auxílio de almofariz e pistilo, ao qual foram adicionados 80mL de solvente

extrator [etanol-água destilada (70:30)] e HCl suficiente para ajustar o pH do meio para $2,0 \pm 0,1$. O material permaneceu em repouso por 24 horas a 5°C em ausência de luz para a extração. Findado esse período, o material foi filtrado em papel filtro, com o fim de reter o resíduo, e o extrato teve seu volume completado com solvente extrator para 100mL, formando o Extrato Concentrado (EC). O conteúdo do balão foi centrifugado a 2000 rpm, por 10 minutos. O sobrenadante foi purificado, extraíndo-se o conteúdo de clorofila com auxílio de 10mL de solvente extrator (Éter Etílico: Éter de petróleo na proporção 1/1 por três extrações sucessivas). Do extrato purificado foi retirada uma alíquota de 5mL à qual foi adicionada a solução de Etanol + HCl 1,5N (85:15) completando 10mL de extrato diluído [adotou-se aqui uma alíquota de 5ml do extrato purificado + 5mL de Etanol + HCl 1,5N (85:15) para todas as análises] (Figura 5).

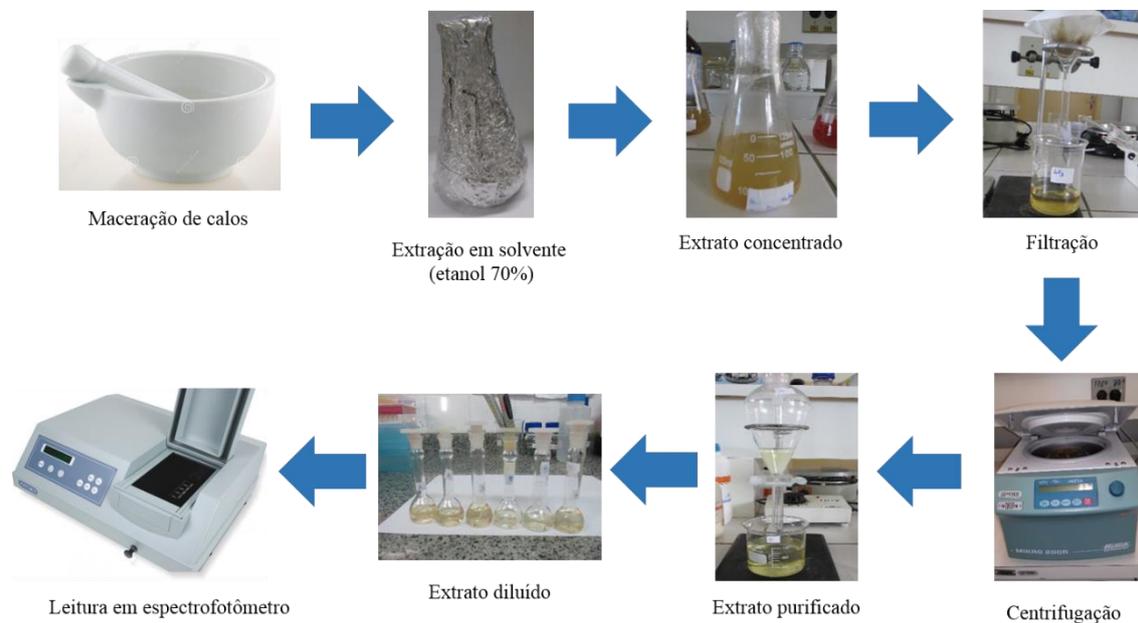


Figura 5: Etapas da metodologia utilizada na extração e quantificação de antocianinas em calos de *Byrsonima gardneriana* A. Juss.. (EC: extrato concentrado, EP: extrato purificado, ED: extrato diluído). Figura da autora.

O teor de antocianinas foi avaliado em espectrofotômetro UV/VIS (FemScan 800XI[®]), efetuando-se leituras em comprimento de onda de 535nm. O conteúdo total de antocianinas foi expresso em mg de antocianinas/100g da amostra de calo analisada. Foi utilizado o Coeficiente de Extinção médio (E1% 1cm), adotando-se o padrão para o método de pH Único (pH 2,0) valor de 982. Os valores de absorvância (DO) foram contrastados com os valores dos brancos [Solução Etanol + HCl 1,5N (85:15)]. Segue a fórmula utilizada para calcular o teor de antocianinas em função da massa dos calos:

$$\text{AntT} \frac{\text{mg Ant}}{100\text{g calos}} = \frac{\frac{\text{DO}_{535\text{nm}} * V_{\text{Ec}} * V_{\text{Ed}} * 100}{V_{\text{Alq}} * m}}{\frac{E_{1\text{cm}}^{1\%}}{10}} = \frac{\text{DO}_{535\text{nm}} * V_{\text{Ec}} * V_{\text{Ed}} * 1000}{V_{\text{Alq}} * m * E_{1\text{cm}}^{1\%}} \quad (1)$$

Onde:

DO_{535} : Densidade ótica do extrato diluído

$V_{\text{e}1}$: Volume do extrato primário

$V_{\text{e}2}$: Volume do extrato secundário

V_{alq} : Volume da Alíquota do extrato primário a ser diluída para fazer o Extrato Secundário

m : Massa de amostra

$E_{1\text{cm}}^{1\%}$: Coeficiente de extinção

3. 9 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, avaliando-se para todos os tratamentos três repetições, sendo cada repetição constituída de três unidades experimentais (3 calos), totalizando nove calos por tratamento. Cada amostra foi analisada em triplicata.

Os dados obtidos através da relação entre massa fresca e teor de antocianinas foram avaliados utilizando-se recursos da estatística descritiva com o auxílio do programa Ri386 3.3.1 (Apêndice). Para avaliar a curva de crescimento, os dados foram ajustados ao modelo de transformação quadrática e submetidos à análise de variância. Os demais dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey. O nível de significância de 5% foi adotado para todas as comparações. Para o experimento de reguladores vegetais, os pressupostos de homogeneidade e de normalidade não foram atendidos, mesmo realizando transformações e testes não paramétricos, não sendo realizado o teste de médias.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estabelecimento *in vitro* de *Byrsonima gardneriana*

O estabelecimento *in vitro* de *B. gardneriana* apresentou baixa taxa de contaminação (1%), demonstrando a eficiência do protocolo de desinfestação. A desinfestação deve permitir a eliminação de agentes contaminantes na superfície do explante causando menor dano possível ao material vegetal. Em relação à germinação, foi obtido uma baixa taxa (em torno de 23%) o que pode estar relacionada com a exposição do embrião ao hipoclorito após a retirada do endocarpo, além da dormência das sementes, comum em espécies do gênero (LORENZI, 2002).

De Moraes Júnior et al. (2015) avaliaram diferentes tratamentos pré-germinativos para a quebra de dormência de *Byrsonima crassifolia* utilizando como substrato areia de textura fina, e concluiu que as sementes desta espécie apresentaram comportamento característico de sementes que possuem dormência fisiológica. Para *B. crassifolia*, o tratamento em que foi realizada a fragmentação dos pirênios com auxílio de morsa de mesa não apresentou diferenças significativas em relação aos demais tratamentos (testemunha, escarificação mecânica, fragmentação com imersão em ácido giberélico e a pré-imersão em ácido giberélico). Além da baixa taxa de germinação, o crescimento lento de plântulas também foi observado.

Para *Byrsonima basiloba* Juss., Luis (2008) descreveu o desenvolvimento lento de plântulas com as primeiras folhas (eofilos) surgindo com cerca de 60 dias após a inoculação e a formação de raízes somente após a expansão dos cotilédones. Ainda segundo o autor, houve a formação de calos na face adaxial dos cotilédones, o que também foi observado em *B. gardneriana* no presente estudo. Lorenzi (2002), descreveu a ocorrência de baixa taxa de germinação e emergência lenta em outras espécies de *Byrsonima*, como *Byrsonima coccolobifolia* (Kunth), *Byrsonima lancifolia* Rich., *Byrsonima sericea* DC, *Byrsonima spicata* (Cav.), *Byrsonima stipulacea* A. Juss. e *Byrsonima verbascifolia* Rich. ex. A. JUS.. Nogueira et al. (2004) estudou aspectos da germinação *in vitro* de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.) mediante avaliação do efeito dos meios de cultura MS e WPM (Lloyde McCown Woody) e diferentes concentrações de BAP e, neste caso, ambos os meios de cultura (MS e WPM) foram eficientes para a germinação *in vitro* na ausência de sacarose.

4.2 Indução de calos e obtenção da curva de crescimento

A utilização de segmento foliar de *B. gardneriana* em meio MS/2 suplementado com 16 μ M de BAP + 2 μ M ANA possibilitou 100% de indução de calos, observando-se cobertura total dos explantes após 30 dias de cultivo. Na cultura de tecidos as auxinas são frequentemente usadas na indução de calos (CID, 2010), pois são capazes de iniciar a divisão celular e controlar os processos de crescimento e alongação celular (NOGUEIRA et al., 2007), enquanto que as citocininas promovem a divisão celular (CID, 2010).

Na obtenção de calos de *B. verbascifolia* Vasconcelos Filho (2008) observou que a formação de calos a partir de explante foliar foi eficiente em baixos níveis da citocinina BAP (0,5mg L⁻¹). Resultados diferentes foram obtidos por Nogueira et al. (2007) ao avaliar o desenvolvimento de calos a partir de explantes foliares de murici-pequeno (*B. intermedia*), onde os explantes foliares responderam bem à presença da auxina 2,4-D na concentração 1,0mg L⁻¹ em ausência de luz, mas foram necessárias concentrações quatro vezes maiores para obterem

respostas positivas em presença de luz, enquanto que as citocininas TDZ e BAP não apresentaram efeitos significativos até mesmo na interação com a auxina 2,4-D. Segundo esses autores, a presença de luz pode favorecer a produção de compostos fenólicos e interferir no crescimento dos tecidos vegetais *in vitro*.

A curva de crescimento de *B. gardneriana* apresentou padrão sigmoidal, evidenciando cinco fases distintas: lag, exponencial, linear, desaceleração e declínio (Figura 6). A fase lag, também conhecida como fase produtora de energia, é caracterizada pelo período de adaptação ao meio de cultura no qual praticamente não há ganho no número de células, ocorre o início da mobilização de metabólitos e a síntese de proteínas sem qualquer divisão celular (GUERRA & NODARI, 2006). Para *B. gardneriana* essa fase ocorreu ao longo de 14 dias de incubação, enquanto que a fase de crescimento exponencial ocorreu entre o 14º e o 21º dia. A fase de crescimento exponencial é caracterizada por intensa divisão celular e rápido aumento no número de células, seguida da fase de crescimento linear onde o ciclo celular é ativo, porém ocorre a redução no ganho de massa celular (GUERRA & NODARI, 2006), corroborando o comportamento apresentado para a espécie objeto dessa pesquisa. Essa fase foi observada entre o 21º e o 56º dia de cultivo, sendo esta a fase mais longa. Após a fase linear, as culturas de calos entraram em desaceleração, com posterior declínio. Na fase de declínio os calos apresentaram coloração marrom com regiões oxidadas, além da redução da massa fresca e dos níveis de antocianinas (Figura 6).

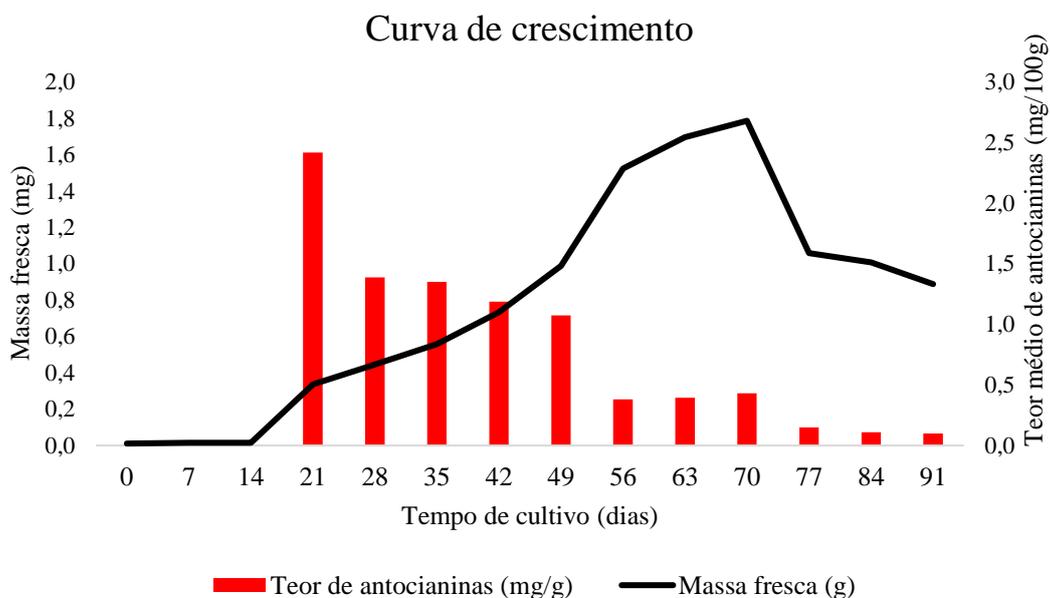


Figura 6: Curva de crescimento e produção de antocianinas em calos formados a partir de explantes foliares de *B. gardneriana* A. Juss. cultivados em meio de cultura MS/2 suplementado com 16µM de 6-benzilaminopurina (BAP) + 2µM de ácido naftalenoacético (ANA). Feira de Santana, 2018.

Para *Byrsonima verbascifolia* (L.) DC., descrito por Chiavegatto (2014), a curva de crescimento foi obtida a partir da pesagem de material fresco e seco, decrescendo após 100 dias de cultivo. Segundo o autor, a fase lag ocorreu até o 30º dia de inoculação, seguida da fase exponencial que se estendeu até o 70º dia. Houve um declínio no crescimento entre 50º e 60º dia de cultivo, seguido de intensa divisão celular entre 60º e 70º dias de cultivo. A fase linear foi observada entre o 71º e o 100º dia de cultivo. As fases estacionárias e de desaceleração não foram observadas, e os calos entraram em declínio a partir do 101º dia de cultivo. Os calos apresentaram coloração verde na fase lag até o 20º dia de cultivo e coloração amarela aos 30 dias. Na fase exponencial, de crescimento linear e de declínio, os calos apresentaram coloração amarela e consistência friável, porém a partir do 60º dia, ainda na fase exponencial, apresentaram sinais de oxidação, o que se intensificou na fase de declínio.

Os resultados encontrados para *B. gardneriana* demonstram que, embora a cobertura total dos explantes por calo tenha sido atingida aos 35 dias de cultivo, aos 21 dias já foi possível a quantificação de antocianinas, mesmo com a formação parcial dos calos (50% de cobertura dos explantes), quando obteve-se os mais elevados teores do pigmento.

Os calos mais jovens de *B. gardneriana*, considerando desde o início do cultivo até a fase linear, apresentaram coloração amarela com regiões rosa e textura compacta. Na fase de crescimento linear os calos de *B. gardneriana* apresentaram coloração amarela com regiões rosadas além de alcançar maiores teores de antocianinas (2,4163 mg/100g aos 21 dias e 1,0737mg/100g aos 49 dias) (Tabela 1). A partir do final da fase linear os calos apresentaram coloração marrom e textura friável. Nogueira et al. (2008) estudando a produção de taninos em explantes foliares de *B. intermedia* verificaram diferenças consideráveis no teor desse composto entre as fases linear e a fase estacionária, quando o teor reduziu de 0,142% para 0,133%, demonstrando que os níveis de metabólitos podem variar de acordo com o estágio de desenvolvimento do calo. Dessa forma, para a espécie em estudo e considerando a produção de antocianinas, é recomendável a seleção de regiões do calo mais pigmentadas no início da fase linear, visando a obtenção de linhagens uniformemente coradas.

A importância de se estabelecer a curva de crescimento de calos está na determinação do momento ideal de repicagem para um novo meio de cultura e a possibilidade da sua utilização em suspensões celulares, visando a produção de metabólitos secundários (NOGUEIRA et al., 2007). A repicagem dos calos para novo meio de cultura deve ser realizada antes do final da fase linear de crescimento, quando as células ainda estão em divisão, e tem por finalidade manter as culturas, podendo ser realizados sucessivos subcultivos, porém podem ocorrer mudanças genéticas ocasionando a variação somaclonal (GEORGE, 1993). Os calos

devem ser transferidos para um novo meio de cultura devido à redução de nutrientes, secagem do meio e acúmulo de substâncias tóxicas (SMITH, 1992).

Tabela 1: Percentual dos explantes recobertos por calo, coloração, textura, massa fresca e teor de antocianinas em calos obtidos a partir de segmentos de folhas *Byrsonima gardneriana* A. Juss. cultivados em meio de cultura MS/2 suplementado com 16 μ M de 6-benzilaminopurina (BAP) + 2 μ M de ácido naftalenoacético (ANA) para determinação da curva de crescimento. Feira de Santana, 2018.

Tempo de cultivo	% de explante recoberto por calo	Coloração	Textura	Massa fresca (mg)	Teor de antocianinas (mg/100g)
Dia da indução	0	-----	-----	0,0109 d	0,0000 f
7 dias	25	-----	-----	0,0146 d	0,0000 f
14 dias	25	-----	-----	0,0158 d	0,0000 f
21 dias	50	Amarelo/ rosa	Compacta	0,3363 c	2,4163 a
28 dias	75	Amarelo/ rosa	Compacta	0,4451 c	1,3868 b
35 dias	100	Amarelo/ rosa	Compacta	0,5574 c	1,3507 bc
42 dias	100	Amarelo/ rosa	Compacta	0,7334 b	1,1876 bcd
49 dias	100	Amarelo	Compacta	0,9880 b	1,0737 e
56 dias	100	Marrom	Friável	1,5242 a	0,3803 f
63 dias	100	Marrom	Friável	1,6961 a	0,3936 f
70 dias	100	Marrom	Friável	1,7861 a	0,4314 f
77 dias	100	Marrom	Friável	1,0579 b	0,1489 f
84 dias	100	Marrom	Friável	1,0079 b	0,1102 f
91 dias	100	Marrom	Friável	0,8881 b	0,1001 f

Médias submetidas ao teste de Tukey à 5% de significância. As letras minúsculas diferentes correspondem às diferenças significativas entre os intervalos de tempo de cultivo.

Durante as diferentes fases de desenvolvimento dos calos de *B. gardneriana* não foram observados processos de organogênese ou embriogênese somática. Porém, o tempo de cultivo favoreceu a formação de calos friáveis, observados a partir de 51 dias de cultivo. As sucessivas divisões celulares que ocorrem ao longo do tempo de cultivo contribuem para a perda da capacidade de agregação devido à redução do teor de lignina na parede celular. Além disso, os calos friáveis apresentam maiores variações, pois possuem alta taxa de divisão celular, são mais

instáveis geneticamente que os calos compactos e são tipicamente compostos por células de variados tamanhos, tipos e formas (RIBEIRO, 2004). Calos friáveis permitem a obtenção de cultura de protoplastos e células em suspensão, sendo então um material mais adequado para seleção de linhagens produtoras de metabólitos *in vitro*. A friabilidade é importante para o cultivo de células em suspensão, pois os agregados celulares desagregam-se quando manipulados e difundem-se facilmente no meio de cultura, acelerando a multiplicação celular e a absorção de nutrientes pelo material vegetal (FLORES, 2006).

4.3 Seleção de linhagens celulares produtoras de antocianinas

A seleção de calos possibilitou a obtenção de três linhagens celulares, distinguíveis inicialmente pela coloração: rosa, amarela e marrom (Figura 7). Os calos obtidos durante os cinco ciclos de seleção foram friáveis, com crescimento celular e produção de antocianinas variando em função da linhagem celular e do ciclo de seleção.

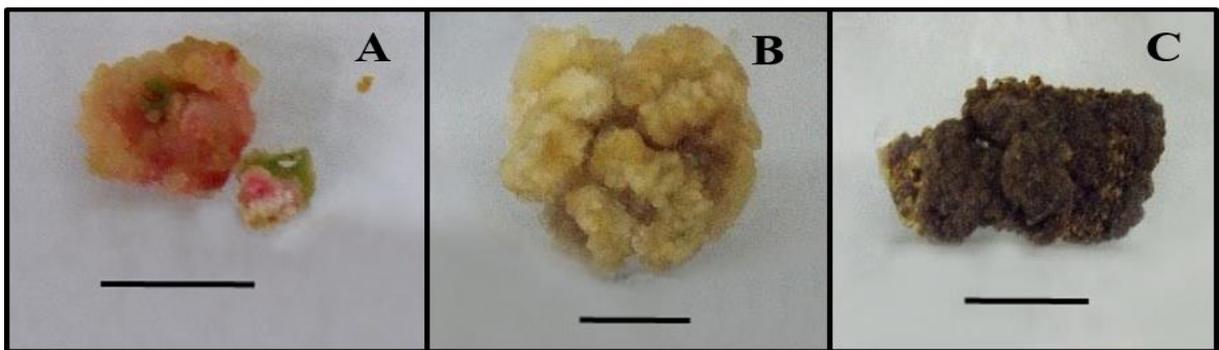


Figura 7: Calos obtidos a partir de segmento foliar de *Byrsonima gardneriana* A. Juss. cultivados em meio MS/2 suplementado com 16 μ M de 6-benzilaminopurina (BAP) + 2 μ M de ácido naftalenoacético (ANA) apresentando diferentes padrões de coloração aos 30 dias de cultivo. As letras correspondem às três linhagens celulares obtidas: A – coloração rosa, B – coloração amarela e C – coloração marrom. Barra = 1cm.

A partir do terceiro ciclo de seleção a linhagem de calos marrons não apresentou viabilidade para seguir com os ensaios, razão pela qual não foram avaliados os teores de antocianinas e massa fresca no quarto e quinto ciclo de seleção para esta linhagem. Com isso, foram considerados para a análise estatística apenas os três primeiros ciclos. No quinto ciclo as linhagens de calos de coloração rosa e amarelo apresentaram-se bastante oxidados, com inibição do crescimento celular, comprovado pela redução da massa fresca, o que indica que nos sucessivos subcultivos ocorreu a perda da viabilidade do material vegetal. Para Nogueira et al. (2008) o cultivo de calos por período superior a cinco repicagens induz à formação de variações morfológicas e fisiológicas, o que, em geral, reduz a viabilidade dos mesmos.

Verificou-se diferenças significativas para o teor de antocianinas entre a linhagem rosa e as demais linhagens, nos três ciclos de cultivo, enquanto que as linhagens amarela e marrom diferiram entre si apenas no segundo e terceiro ciclos. Na comparação dentro de cada linhagem, nos diferentes ciclos de cultivo, verificou-se que a linhagem rosa diferiu entre os subcultivos e apresentou melhor resultado no segundo ciclo (4,6028mg/100g), demonstrando ser a linhagem mais produtiva para o pigmento antocianina (Tabela 2). As linhagens de cor amarela e marrom tiveram o mesmo comportamento, perdendo a capacidade de síntese de antocianinas ao longo dos subcultivos.

Tabela 2: Coloração, massa fresca e teor de antocianinas em calos obtidos a partir de segmentos de folhas *Byrsonima gardneriana* A. Juss. cultivados em meio de cultura MS/2 suplementado com 16µM de 6-benzilaminopurina (BAP) + 2µM de ácido naftalenoacético (ANA), ao final de 5 ciclos de cultivo em intervalos de 30 dias. Feira de Santana, 2018.

Ciclo de cultivo	Linhagem	Coloração	Massa fresca (mg)*	Teor médio de antocianinas (mg/100g)
1º ciclo	A	Rosa	0,2580	4,4576 ^{A b}
	B	Amarelo	0,3188	4,0732 ^{B a}
	C	Marrom	0,4644	4,1300 ^{B a}
2º ciclo	A	Rosa	1,9916	4,6028 ^{A a}
	B	Amarelo	2,2174	2,6295 ^{B b}
	C	Marrom	1,0944	2,0089 ^{C b}
3º ciclo	A	Rosa	1,9588	3,8130 ^{A c}
	B	Amarelo	1,7279	0,6959 ^{C c}
	C	Marrom	0,4549	1,0395 ^{B c}
4º ciclo	A	Rosa	1,1448	3,2324
	B	Amarelo	1,4667	0,5900
5º ciclo	A	Rosa	0,6573	2,4081
	B	Amarelo	1,1802	0,4262

Médias obtidas pelo teste de Tukey à 5% de significância. As letras maiúsculas correspondem às diferenças significativas dentro de cada ciclo, enquanto que as letras minúsculas fazem a comparação das médias de cada linhagem em cada um dos ciclos. *Para massa fresca, não houve diferenças significativas.

Choi & Park (1997) observaram a produção de antocianinas em calos de *Populus alba* e *Populus glandulosa* a partir de 15 linhas de cultivo, com base na coloração, realizando

subculturas em intervalos de 13 dias, em meio MS/2 contendo 0,5 mg L⁻¹ de 2,4-D, 0,1mg L⁻¹ BAP. A linhagem de número 11 foi considerada de alto rendimento de antocianinas (2,227/0,5g de peso fresco) e rápido crescimento celular, porém, perdeu sua capacidade de síntese do pigmento durante repetidas subculturas, assim como a redução do crescimento celular. Em geral, o teor de antocianinas aumentou significativamente a partir da 7^a semana, apresentado o dobro (de 0,8 para 1,7 mg/100g) após a seleção final (17 ciclos), mas o crescimento celular diminuiu com os subcultivos. Ao final das subculturas a produtividade de antocianinas tornou-se heterogênea, o que, para os autores, possivelmente ocorreu devido o surgimento de mutações e/ou variações extracromossômicas (CHOI & PARK, 1997). Esses resultados diferem daqueles observados em *B. gardneriana* quanto ao teor de antocianinas já que este metabólito diminuiu ao longo dos subcultivos, especialmente após o segundo ciclo, porém, assemelha-se quanto ao declínio da massa celular ao longo dos subcultivos. Os subcultivos promoveram a diferenciação do tecido, de modo que o declínio ao longo dos ciclos de seleção pode ser reflexo dessa diferenciação, conforme observado nos resultados apresentados na curva de crescimento.

Comportamento semelhante aos resultados obtidos com *B. gardneriana* foi observado por Lima et al. (2014) ao realizarem os subcultivos de calos de *Brosimum gaudichaudii* Tréc. (Moraceae) obtidos a partir de entrenó. Para esses autores, após sete subcultivos a presença de antocianinas foi reduzida, com a coloração dos calos passando de avermelhado (indicativo da presença de antocianinas) para esverdeado (indicativo da presença de clorofila). Os autores descrevem ainda a mudança na textura dos calos, passando de friáveis nos primeiros subcultivos à compacto.

Outra abordagem para seleção de linhagens mais produtivas em metabólitos secundários é a seleção de diferentes genótipos dentro da mesma espécie e de diferentes fontes de explantes. Botau & Bolda et al. (2013), com o objetivo de selecionar linhagens celulares mais produtivas, quantificaram antocianinas em calos provenientes de 7 acessos de mirtilo (*Vaccinium myrtillus* L.). Para a indução de calos, esses autores utilizaram três tipos de explantes: meristema, folha e caule; cultivados *in vitro* em três meios de cultura (WPM, MS e AND - Anderson Rhododendron medium), sob a influência do ANA, BAP e AS (sulfato de adenina). Os resultados demonstraram a forte influência do genótipo, do meio de cultura e do hormônio aplicado ao meio na indução de calos para produção de antocianinas. Os melhores resultados foram obtidos a partir de explantes de caule, em meio WPM, suplementado com ANA e BAP em igual concentração (1,5mg L⁻¹) e 40mg L⁻¹ de AS. Para os calos obtidos de mirtilo foram obtidos 646mg/100g de antocianinas. Esses autores concluíram que na subcultura de calos de mirtilo, o genótipo e quantidade de AS são fatores importantes para a elevação da taxa de

biossíntese de antocianinas. Esses resultados sugerem a possibilidade de se avaliar a produção de antocianinas em calos provenientes de diferentes explantes, tais como flores e frutos, onde naturalmente ocorre a presença de tecidos especializados na produção de antocianinas.

Os resultados obtidos demonstram que a produção de antocianinas não é uma característica estável dentro de cada linhagem de células, o que levou ao declínio no processo de seleção. Esta instabilidade já foi retratada em diversos estudos (CHOI & PARK, 1997; FUMAGALI, 2008; ANANGA et al., 2013; LIMA et al., 2014) e reflete o processo de diferenciação celular no tecido ou a perda da capacidade produtiva em função de variações genéticas e epigenéticas. Realmente, as culturas de células de plantas em geral são heterogêneas, nas quais as características morfológicas e fisiológicas das células apresentam diferenças (FUMAGALI, 2008). Entretanto, as diferentes células de um calo estão em processo de diferenciação e especialização, o que implica que a simples seleção não garante a estabilidade de uma determinada linhagem. Contudo, a identificação de linhagens celulares com alta produtividade de metabólitos, através da seleção de pequenos agregados celulares tem sido uma técnica promissora na obtenção de culturas mais produtivas em metabólitos de interesse (VERPOORTE & MARASCHIN, 2001).

4.4 Efeito do estresse osmótico sobre a produção de antocianinas

Os calos submetidos ao estresse osmótico pela adição de manitol ao meio de cultura apresentaram coloração variando entre amarelo e marrom com regiões rosa e textura friável. Para *B. gardneriana* a adição de manitol ao meio de cultura em concentrações menores (0,0 - controle, 2,5g L⁻¹ e 5,0g L⁻¹) promoveram o aumento na produção de antocianinas, evidenciando que a biossíntese de antocianinas foi estimulada pela redução da disponibilidade de água no meio (Tabela 3). Em concentrações maiores do agente osmótico, contudo, foi observada a redução do pigmento. Já a massa fresca dos calos, obtida em cada tratamento, não apresentou diferenças significativas, demonstrando que o aumento do potencial osmótico do meio de cultura afetou o metabolismo do pigmento, mas não afetou o ciclo e o crescimento celular. O uso de agentes osmóticos no meio de cultura promove redução do metabolismo, pois reduz o potencial hídrico do meio de cultura inibindo a absorção de água e nutrientes pelo explante e, conseqüentemente, age sobre o crescimento e o metabolismo celular (LÉDO et al., 2007).

Tabela 3: Massa fresca e teor de antocianinas em calos obtidos a partir de segmento foliar *Byrsonima gardneriana* A. Juss. cultivados em meio de cultura MS/2 suplementado com 16 μ M de 6-benzilaminopurina (BAP) + 2 μ M de ácido naftalenoacético (ANA), acrescidos de diferentes concentrações de manitol. Feira de Santana, 2018.

Manitol (g L ⁻¹)	Massa fresca (g)*	Teor de antocianinas (mg/100g)
Controle (0,0)	2,0466	1,2022 ^C
2,5	2,1397	1,4410 ^B
5,0	1,4485	2,1687 ^A
7,5	2,0377	0,8335 ^D
10,0	1,5908	1,1231 ^C

Médias de teor de antocianinas obtidas pelo teste de Tukey à 5% de significância. As letras maiúsculas representam diferenças significativas entre os tratamentos. *Não houve diferenças significativas.

As antocianinas são comumente relatadas como sendo induzidas pelo estresse abiótico. No entanto, o nível de estresse necessário para a indução na produção de antocianinas para diferentes fatores é desconhecido (KOVINICH et al., 2014) e podem variar entre as espécies. Kovinich et al. (2014) avaliaram a resposta de *Arabidopsis thaliana* do ponto de vista do acúmulo de antocianinas, utilizando sete condições de estresse fisiologicamente extremos, entre eles o estresse osmótico com a adição de manitol. Os resultados apresentados demonstraram que o uso do manitol à 45,5g L⁻¹ resultou numa redução estatisticamente significativa no total de antocianinas, apresentando níveis mais baixos em comparação ao controle e aos demais tratamentos.

O aumento na produção de antocianinas sob condições de estresse osmótico foi encontrado em calos de *Daucus carota* L. por Rajendran et al. (1992). Esses autores relataram um aumento de 13% na produção de antocianinas utilizando a combinação de 3% de sacarose e 5% de manitol, enquanto a sacarose adicionada individualmente rendeu apenas 5% de antocianinas. Para esta espécie, o aumento do potencial osmótico do meio de cultura resulta em maior produtividade desse pigmento. Corroborando esses autores, Suan See et al. (2011) cultivaram calos de *Melastoma malabathricum* (Melastomataceae) em meio de cultura MS suplementado com diferentes concentrações de sacarose, resultando no aumento da produção de biomassa celular e na concentração do pigmento antocianinas. As células de *M. malabathricum* cultivadas em meio de cultura suplementado com 45g L⁻¹ de sacarose produziram o maior teor do pigmento. Já Kielkowska (2017) estudando o cultivo *in vitro* de células meristemáticas de raízes de *Allium cepa* L. (Liliaceae), verificaram redução no teor de

antocianinas quando submetidas a diferentes concentrações de sorbitol (18,2; 36,4 e 65,5g L⁻¹), corroborando os resultados encontrados em *B. gardneriana*.

Miñano et al. (2004) induziu a produção de antocianinas em culturas de células *Vitis vinifera* var. globo em suspensão a partir de diferentes concentrações de sacarose. Para esta espécie a produção de antocianinas é mais eficiente à medida que aumenta a concentração de sacarose no meio de cultura, sendo que os melhores resultados foram obtidos com 59,9g L⁻¹ de sacarose. Para este autor, o estresse osmótico ou alta viscosidade do meio de cultura inibe a absorção de nutrientes e bloqueia as vias metabólicas responsáveis pela síntese de antocianinas, ativando outras rotas. Ainda segundo o autor, em cada espécie de *Vitis* a concentração de sacarose deve variar para obter uma produção máxima de antocianinas.

Hughes et al. (2010) avaliaram a presença de antocianinas em folhas de espécies perenes durante o inverno e sua relação com o estresse osmótico. Para estes autores, as antocianinas atuam como um soluto no ajuste osmótico (AO), contribuindo para a depressão do potencial osmótico ($\Psi\pi$) interno e a manutenção da pressão de turgor durante condições de estresse hídrico. Ainda segundo esses autores, a síntese de antocianinas pode ser induzida por menores potenciais de água foliar, porém, não podem ser explicados exclusivamente com base no estresse hídrico. Mudanças na expressão de genes que codificam muitas das enzimas envolvidas no acúmulo de antocianinas sugerem que a maioria dos efeitos são transcricionais. De acordo com Kovinich et al. (2014), os trabalhos publicados até então sustentam que as plantas podem preferencialmente sintetizar diferentes antocianinas em resposta a estresses distintos.

4.5 Efeito da radiação UV-C sobre a produção de antocianinas

Os calos submetidos à luz UV-C apresentaram textura compacta e coloração bege com regiões rosa no tratamento controle, e verde nos demais tratamentos. Contudo, o teste de Tukey revelou que a massa fresca dos calos e o teor de antocianinas não diferiram estatisticamente nos diferentes tratamentos (Tabela 4).

A qualidade de luz pode alterar a morfogênese das plantas por meio de uma série de processos mediados por receptores, que absorvem diferentes tipos de luz como famílias de fitocromos, criptocromos e ou fototropinas (FRANKLIN, 2009). Existe uma correlação positiva bem estabelecida entre intensidade de radiação solar e a produção de compostos fenólicos (WALTERMAN & MOLE, 1994), entretanto, pigmentos distintos absorvem radiação em comprimentos de onda específicos (DE ARAÚJO & MIYATA, 2009). Os flavonoides e fenilpropanoides, por exemplo, exercem ação protetora contra a foto-destruição ao absorver e ou dissipar a energia solar, reduzindo possíveis danos causados pela radiação UV-B nos tecidos

mais internos (WALTERMAN & MOLE, 1994). A qualidade da luz afeta não só o desenvolvimento do vegetal *in vitro*, mas também a biossíntese de metabólitos secundários, o que não foi verificado em *B. gardneriana*.

Tabela 4: Massa fresca e teor de antocianinas em calos obtidos a partir de segmento foliar de *Byrsonima gardneriana* A. Juss. cultivados em meio de cultura MS/2 suplementado com 16 μ M de 6-benzilaminopurina (BAP) + 2 μ M de ácido naftalenoacético (ANA), expostos à radiação UV-C por diferentes intervalos de tempo. Feira de Santana, 2018.

Exposição à luz UV-C/ minutos	Massa fresca (g) *	Teor de antocianinas (mg/100g) *
0	3,0800	5,8650
2	3,9925	1,8125
4	3,6497	5,6112
8	3,2812	5,3568
16	3,0979	5,6677
32	4,6451	2,5737
64	3,8239	4,0302

* As massas e os teores de antocianinas não apresentaram diferenças significativas pelo teste de Tukey à 5% de significância.

Após a exposição dos calos à luz UV-C, unidades de calos foram selecionadas e submetidas ao teste de viabilidade com cloreto de tetrazólio, onde todos reagiram ao teste demonstrando regiões coradas, o que indica a manutenção da viabilidade do material vegetal (Figura 8).

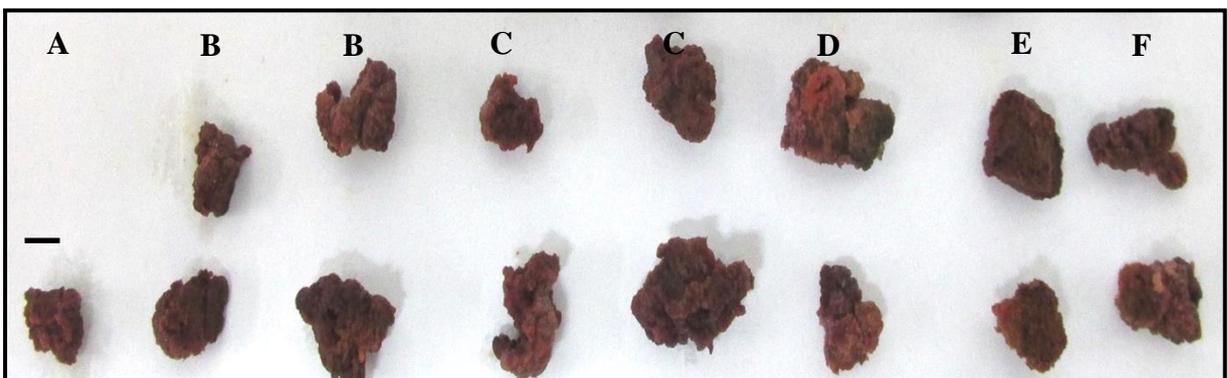


Figura 8: Calos de *Byrsonima gardneriana* A. Juss. expostos à luz ultravioleta submetidos à teste de viabilidade com cloreto de tetrazólio à 0,5%. As letras correspondem ao tempo de exposição à luz UV-C (A - 2min, B - 4min, C - 8min, D - 16min, E - 32 min e F - 64min). Barra = 1cm.

Segundo Ananga et al. (2013) a luz é um importante agente estimulador da biossíntese de antocianinas. Para Park et al. (2007) há uma correlação positiva quanto ao acúmulo de antocianina em folhas de alface irradiada com UV-B, na qual foi observado o aumento da expressão de genes de proteínas ribossômicas, enquanto os genes associados à fotossíntese foram reprimidos.

Resultados diferentes aos obtidos em *B. gardneriana* foram encontrados em culturas de células de *Malva neglecta* L. obtidas a partir de segmento foliar subcultivadas e expostas a radiação ultravioleta (UV-B: 0, 432, 864 e 1296 J/m² e 0, 612, 1284 e 1836 J/m² para UV-C) por diferentes intervalos de tempo (0, 30, 60 e 90 min). A exposição à radiação UV, em particular por períodos mais longos, reduziu a viabilidade e integridade da membrana das células de *Malva*, porém, o conteúdo total de flavonoides e antocianinas tiveram seus níveis aumentados (GHANATI et al., 2013). A indução e acumulação de antocianinas por radiação UV-A também foi observada em *Arabidopsis thaliana* (CHRISTIE & JENKINS, 1996) e cultura de células de cenoura (HIRNER & SEITZ, 2000).

Resultado diferente foi obtido por Cetin (2014) ao avaliar a composição fenólica em amostras de calos de *Vitis vinifera* L. expostas à lâmpada UV-C de 6W, obtendo mudanças significativas nos níveis do metabólito de acordo com a distância da irradiação, tempo de exposição à irradiação (5 minutos aprox. 25,2 - 57,6 kJ cm⁻² e 10 minutos aprox. 50,4 - 115,2 kJ cm⁻²) e tempo de incubação. O maior teor de fenólico total (155,14 mg/100g) foi detectado em calos expostos a UV-C por 5min a partir de 30cm de distância e amostrados após 24h. Teores totais de flavonoides também foram afetados positivamente pela radiação UV-C, obtendo-se os melhores níveis em calos expostos por 5min à 30cm de distância, e amostrados após 24h e 48h de incubação. O menor teor de fenólicos e flavonoides foi obtido a partir de calos não irradiados.

Para *B. gardneriana* não foi observada uma tendência ao aumento da biossíntese de antocianinas com a metodologia utilizada. Entre os fatores que podem ter contribuído para os resultados obtidos sugere-se o nível de radiação da lâmpada utilizada não adequado, o pequeno intervalo de tempo de exposição dos calos e a distância não adequada entre os calos e a fonte de luz utilizada.

4.6 Efeito da interação de reguladores vegetais na produção de antocianinas

Os calos submetidos ao meio de cultura com diferentes concentrações dos reguladores vegetais BAP e 2,4-D apresentaram textura compacta, enquanto que a coloração variou com os tratamentos. Em ausência de 2,4-D ou em concentrações mais baixas desse regulador vegetal

(2,5 μ M) os calos apresentaram coloração rosa intenso uniformemente distribuído em toda a massa do calo. Com o aumento das concentrações de 2,4-D (5,0; 10,0 e 20,0 μ M) os calos apresentaram coloração amarela com algumas regiões rosadas (Figura 9). Não houve diferenças significativas para a massa fresca dos calos entre os diferentes tratamentos.

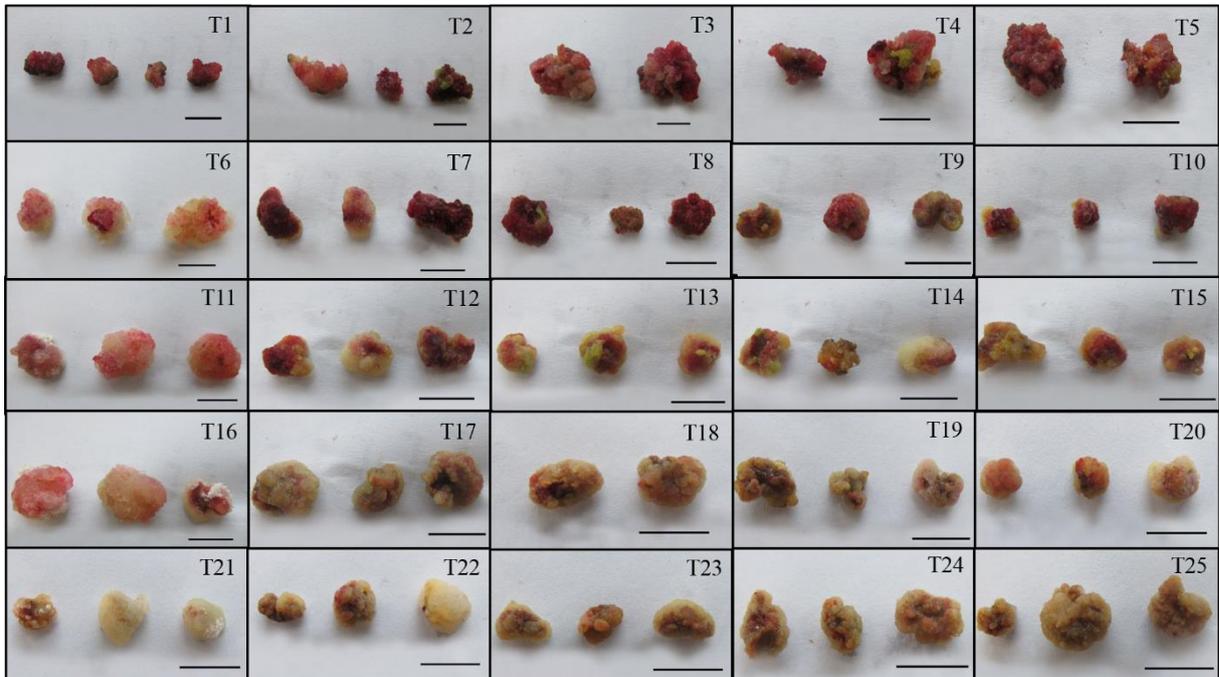


Figura 9: Coloração dos calos obtidos a partir de segmento foliar de *Byrsonima gardneriana* A. Juss., cultivados em meio de cultura MS/2 por 30 dias e transferidos para um novo meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de BAP (6-benzilaminopurina) e 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacético), respectivamente: T1: 0,0 + 0,0; T2: 4,0 + 0,0; T3: 8,0 + 0,0; T4: 16,0 + 0,0; T5: 32,0 + 0,0; T6: 0,0 + 2,5; T7: 4,0 + 2,5; T8: 8,0 + 2,5; T9: 16,0 + 2,5; T10: 32,0 + 2,5; T11: 0,0 + 5,0; T12: 4,0 + 5,0; T13: 8,0 + 5,0; T14: 16,0 + 5,0; T15: 32,0 + 5,0; T16: 0,0 + 10,0; T17: 4,0 + 10,0; T18: 8,0 + 10,0; T19: 16,0 + 10,0; T20: 32,0 + 10,0; T21: 0,0 + 20,0; T22: 4,0 + 20,0; T23: 8,0 + 20,0; T24: 16,0 + 20,0; T25: 32 + 20,0. Barra = 1cm. Feira de Santana, 2018.

Mesmo não tendo sido detectados efeitos significativos pelo teste de média adotado, pode-se observar que a presença do BAP foi um importante estimulador para o biossintese do pigmento em questão, já que na ausência desse regulador os níveis de antocianinas foram sempre baixos (Tabela 5). Já na ausência de 2,4-D os melhores resultados foram obtidos com as maiores concentrações de BAP (32 μ M, correspondente ao tratamento 5 - T5), porém, a interação entre os reguladores apresentou efeito positivo e a presença da auxina 2,4-D mostrou-se eficiente nas concentrações de 2,5 μ M e 20 μ M. Os calos do tratamento controle apresentaram uma produção média de antocianinas de 16,1364mg/100g, enquanto que os calos submetidos à 8,0 μ M de BAP e 20 μ M de 2,4-D produziram 58,5118 mg/100g, o que representa um aumento de 362% na produção do pigmento.

Tabela 5: Coloração, massa fresca e teor de antocianinas em calos de calos *Byrsonima gardneriana* A. Juss. obtidos a partir de segmento foliar cultivados em meio de cultura MS/2 suplementado com diferentes concentrações de e BAP (6-benzilaminopurina) e 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacético). Feira de Santana, 2018.

Tratamento	BAP (μM)	2,4-D (μM)	Coloração	Massa fresca (média) mg*	Teor de médio de antocianinas (mg/100g)**
T1	0,0	0,0	Rosa	0,5939	16,1364
T2	4,0	0,0	Rosa	1,4464	11,2504
T3	8,0	0,0	Rosa	1,3362	12,0545
T4	16,0	0,0	Rosa	0,8742	10,6853
T5	32,0	0,0	Rosa	0,3785	10,0260
T6	0,0	2,5	Amarelo + rosa	2,7841	5,8056
T7	4,0	2,5	Rosa	0,6677	23,5440
T8	8,0	2,5	Rosa	0,5152	40,3591
T9	16,0	2,5	Rosa	0,2869	28,9567
T10	32,0	2,5	Rosa	0,3508	27,7190
T11	0,0	5,0	Amarelo + rosa	1,6336	6,5090
T12	4,0	5,0	Amarelo + rosa	0,4247	13,2067
T13	8,0	5,0	Amarelo + rosa	0,3933	14,5887
T14	16,0	5,0	Amarelo + rosa	0,4478	8,2475
T15	32,0	5,0	Amarelo + rosa	0,6713	7,2425
T16	0,0	10,0	Amarelo + rosa	0,9219	7,5124
T17	4,0	10,0	Amarelo + rosa	0,5178	13,6979
T18	8,0	10,0	Amarelo + rosa	0,3787	13,6683
T19	16,0	10,0	Amarelo + rosa	0,2869	16,4236
T20	32,0	10,0	Amarelo + rosa	0,3131	10,5222
T21	0,0	20,0	Amarelo + rosa	0,4004	12,6575
T22	4,0	20,0	Amarelo + rosa	0,4176	19,6217
T23	8,0	20,0	Amarelo + rosa	0,3180	58,5118
T24	16,0	20,0	Amarelo + rosa	0,3236	21,6288
T25	32,0	20,0	Marrom	0,3302	28,2043

* A massa fresca não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos. **Os dados não atenderam aos pressupostos de homogeneidade e normalidade, até mesmo após transformações dos dados, não sendo aplicado o teste de médias.

Corroborando esses resultados, um notável aumento na concentração de antocianinas foi observado em calos de *Crataegus sinaica* BOSS obtidos a partir de caule (0,1580mg/100g, 11,79 vezes maior que o controle) e de folha (0,1480µg/100g) quando o meio de cultura continha 2mg L⁻¹ de BAP e 1mg L⁻¹ de ANA (MAHARIK et al., 2009). Para esta espécie, a adição de ANA na cultura não afetou o acúmulo de antocianinas, até mesmo quando combinado com cinetina, mas está relacionada ao aumento da massa do calo. Os maiores crescimentos dos calos, avaliando-se os pesos fresco e seco, foram registradas em meios de cultura que continham 1mg L⁻¹ de 2,4-D e 1mg L⁻¹ de cinetina para ambos os explantes (MAHARIK et al., 2009).

Dios-López et al. (2011) avaliou diferentes reguladores vegetais na indução da produção de antocianinas em calos e suspensão celular obtidos a partir de segmento foliar de três variedades de *Hibiscus sabdariffa* L. (China, Reyna e branca), assim como a massa fresca e seca. A presença de cinetina promoveu o crescimento celular, mas não influenciou o acúmulo de antocianinas, sendo uma relação inversamente proporcional (taxa de crescimento celular X produção de antocianinas). A auxina ANA não mostrou qualquer efeito sobre a síntese de antocianinas ou de fenólicos totais nas três variedades estudadas, enquanto que 2,4-D aumentou entre 60 e 70% o conteúdo de compostos fenólicos nas linhas celulares das variedades China e Reyna.

Pandey et al. (2015) cultivaram calos obtidos a partir de raiz principal e folhas de plântulas de *Daucus carota* cultivadas *in vitro* em meio de cultura MS. O crescimento máximo de calos foi observado no tratamento em que foi utilizado 3mg L⁻¹ de 2,4-D e 0,2mg L⁻¹ cinetina, enquanto combinações de AIA e cinetina promoveram menor crescimento de calos. Quanto à produção de antocianinas, o estudo constatou que a cinetina isoladamente não influenciou a produção de antocianinas, enquanto que a combinação de auxina AIA e cinetina (3,0mg L⁻¹ e 0,2mg L⁻¹, respectivamente) levou à produção máxima do pigmento.

Deste modo, a interação de auxinas e citocininas é essencial para assegurar o crescimento e determinar os níveis de metabólitos secundários produzidos pelas células cultivadas *in vitro*. Contudo, o efeito dos reguladores vegetais deve ser avaliado experimentalmente para cada espécie (ANANGA et al., 2013). Por essa razão, não há um protocolo específico para a produção de antocianinas *in vitro*, devido à grande variabilidade de respostas entre diferentes espécies de plantas, porém há uma tendência geral da combinação de citocinina e auxina (MAHARIK et al., 2009).

CONCLUSÃO

Na curva de crescimento de *Byrsonima gardneriana*, a fase de crescimento linear, observada entre 21º e 56º dia de cultivo, é o período recomendado para o subcultivo de calos da espécie; aos 21 dias de cultivo verifica-se a melhor relação entre o teor de antocianinas e a massa dos calos embora não haja nesta fase a cobertura total do explante por células indiferenciadas; a seleção de calos a partir da coloração, não se mostrou uma metodologia eficiente para a obtenção de linhagens celulares mais produtivas em antocianinas, apesar de apresentar um aumento no segundo ciclo para uma das linhagens; baixas concentrações de manitol, até 5g L⁻¹, adicionado ao meio de cultura, são eficientes na estimulação da produção de antocianinas em calos da espécie; a radiação UV-C no tempo de exposição utilizado não foi eficiente para induzir o aumento da biossíntese do metabólito em estudo; apesar da tendência de maior produção de antocianinas em calos cultivados na presença de BAP associado a 2,4-D novos estudos devem ser conduzidos, buscando-se um melhor entendimento do efeito dos reguladores vegetais na estimulação da produção desse pigmento.

REFERÊNCIAS

- AMEIRA, O. A. et al. Estabelecimento de cultura de células em suspensão e identificação de flavonoides em *Cordia verbenacea* DC. **Embrapa Amazônia Oriental-Artigo em periódico indexado (ALICE)**. 2009.
- AMMIRATO, P.V. **Handbook of plant cell culture**. New York: Macmillan, v.3, 1984.
- ANANGA, A. et al. Production of anthocyanins in grape cell cultures: a potential source of raw material for pharmaceutical, food, and cosmetic industries. **The Mediterranean Genetic Code-Grapevine and Olive**. InTech, 2013.
- ANDERSON, W. R. Origins of Mexican Malpighiaceae. **Acta Botanica Mexicana**, v. 104, p. 107-156, 2013.
- BEZERRA, E. S.; LOPES, A. V.; MACHADO, I. C. Reproductive biology of *Byrsonima gardnerana* A. Juss.(Malpighiaceae) and interactions with Centris bees (Centridini) in northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Botany**, v. 32, n. 1, p. 95-108, 2009.
- BOTAU, D.; BOLDA, V. The selection of some tissue lines producers of anthocyanins in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) callus culture. **Scientific Bulletin**. Series F. Biotechnologies, v. 17, p. 49-52, 2013.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução RDC n 26, de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, 2014.
- CALIXTO, J. B. **Biodiversidade como fonte de medicamentos**. Ciência e Cultura, Santa Catarina, v. 55, n. 3, p. 37-39, 2003.
- CASATI, P.; WALBOT, V. Gene expression profiling in response to ultraviolet radiation in maize genotypes with varying flavonoid content. **Plant Physiol**, n. 132. p. 1739-1754, 2003.
- CASTRO, R. A. de; ALBIERO, A. L. M. O mercado de matérias primas para indústria de fitoterápicos. **Revista Fitos**, v. 10, n. 1, p. 59-72 2016.
- CETIN, E. S. Induction of secondary metabolite production by UV-C radiation in *Vitis vinifera* L. Öküzgözü callus cultures. **Biological research**, v. 47, n. 1, p. 37, 2014.
- CHIAVEGATTO, R. B. **Viabilidade celular, índice mitótico e ultraestrutura de calos de *Byrsonima verbascifolia* (L.) DC. (Malpighiaceae)**. 2014. 88 f. Dissertação (Mestrado em Botânica Aplicada - Sistemática Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, 2014.
- CHOI, M. S.; PARK, Y. G. Selection of a high anthocyanin-producing cell line from callus cultures of hybrid poplar (*Populus alba* Lx *P. glandulosa* Uyeki). **International Journal of Forest Genetics**, 1997.
- CHRISTIE, J.M.; JENKINS, G. I. Distinct UV-B and UV-A/blue light signal transduction pathways induce chalcone synthase gene expression in Arabidopsis cells. **The Plant Cell**, v. 8, n. 9, p. 1555-1567, 1996.

- CID, L. P. B. Cultivo *in vitro* de plantas. 1ª ed. Brasília – DF, Embapa, 303f. 2010.
- DAVID, J. P. et al. Radical scavenging, antioxidante and cytotoxic activity of Brazilian caatinga plants. **Fitoterapia**, v. 78, p. 215-218, 2007.
- DE AMORIM, E. L. C. et al. **Fitoterapia: instrumento para uma melhor qualidade de vida**. Infarm, Pernambuco, v. 15, n. 1, p. 66-69, 2003.
- DE ARAUJO, A. G.; MIYATA, M. P. L. Y. Qualidade de luz na biometria e anatomia foliar de plântulas de *Cattleya loddigesii* L. (Orchidaceae) micropropagadas. **Ciência Rural**, v. 39, n. 9, p. 2506-2511, 2009.
- DE MORAIS JÚNIOR, O. P. et al. **Métodos para quebra de dormência em sementes de murici (*Byrsonima crassifolia* (L.) Rich.)**, 2015.
- DIOS-LÓPEZ, A. D. et al. Inducción de antocianinas y compuestos fenólicos en cultivos celulares de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) *in vitro*. **Chapingo**. Serie Horticultura, v. 17, n. 2, p. 77-87, agosto de 2011.
- FIGUEREDO, C. A. de; GURGEL, I. G. D.; GURGEL JUNIOR, G. D. A. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos: construção, perspectivas e desafios. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 24, p. 381-400, 2014.
- FLORES, R. **Cultura de tecidos e produção de B-ecdisona em *Pfaffia glomerata* e *Pfaffiatuberosa* (Amaranthaceae)**. 2006. 168 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.
- FRANÇA, S. C. Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas. **Farmacognosia da planta ao medicamento**, Porto Alegre-RS, Editora da UFSC, v.5 p.128, 2001.
- FRANKLIN, K. A. Light and temperature signal crosstalk in plant development. **Current opinion in plant biology**, v. 12, n. 1, p. 63-68. 2009.
- FUMAGALI, E. et al. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 627-641, 2008.
- GARZÓN, G. A. Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: revisión. **Acta Biológica Colombiana**, v. 13, n. 3, p. 27-36, 2008.
- GEORGE, E.F. Plant Propagation by Tissue Culture. **Edington: Exegeties**. 574p. 1993.
- GHANATI, F.; KHATAMI, F.; BEMANI, E. Effects of UV B and UV C radiation on viability, growth, and major natural compounds of *Malve neglecta* L. cells. **Iranian Journal of Plant Physiology**. V. 4, cap. 1, p. 881- 887, 2013.
- GIULIETTI, A. M. et al. Espécies endêmicas da Caatinga. **Vegetação e Flora da Caatinga**, Recife: APNE/CNIP, p. 103-119, 2002.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374, 2007.

GÓMEZ-ZELEDÓN, J.; JIMÉNEZ, V. M. Producción in vitro de antocianinas-revisión. **Acta Biológica Colombiana**, v. 16, n. 1, p. 3, 2011.

GOTTLIEB, O. R.; BORIN, M. R. M. B; SIMÕES, C. M. O. Em Farmacognosia: da planta ao medicamento. **Simões, C. M. O., org.** v. 3, 3ª ed., editora da UFRGS: Porto Alegre, 2001.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. **Material didático de apoio à disciplina de Biotecnologia.** Santa Catarina. 2006.

GUILHON-SIMPLICIO, F.; PEREIRA, M. de M. Aspectos químicos e farmacológicos de *Byrsonima* (Malpighiaceae). **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 1032-1041, 2011.

GUO, J.; HAN, W.; WANG, M. Ultraviolet and environmental stresses involved in the induction and regulation of anthocyanin biosynthesis: a review. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 25, 2008.

HAMERSKI, L.; REZENDE, M. J. C.; DA SILVA, B. V. Usando as cores da natureza para atender aos desejos do consumidor: substâncias naturais como corantes na indústria alimentícia. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 3, p. 394-420, 2013.

HASENCLEVER, L. **A relação Universidade-Empresa e a inovação no Brasil: os casos do Porto Digital da indústria farmacêutica e da UEG.** 2013. Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro .2013.

HIRNER, A. A.; SEITZ, H. U. Isoforms of chalcone synthase in *Daucus carota* L. and their differential expression in organs from the European wild carrot and in ultraviolet-A irradiated cell cultures. **Planta**, v. 210, n. 6, p. 993-998, 2000.

HUGHES, N. M. et al. **Association between winter anthocyanin production and drought stress in angiosperm evergreen species.** Journal of experimental botany, v. 61, n. 6, p. 1699-1709, 2010.

KIELKOWSKA, A. *Allium cepa* root meristem cells under osmotic (sorbitol) and salt (NaCl) stress *in vitro*. **Acta Botânica Croatica**, v. 76, n. 2, p. 146-153, 2017.

KLEIN, T. et al. Fitoterápicos: um mercado promissor. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 3, p. 241-248, 2010.

KOVINICH, N. et al. Not all anthocyanins are born equal: distinct patterns induced by stress in Arabidopsis. **Planta**, v. 240, n. 5, p. 931-940, 2014.

LAMEIRA, O. A. **Propagação in vitro e in vivo, dinâmica de crescimento de células, nutrição e identificação de flavonoides em erva baleeira (Cordia verbenacea L.).** 1997. 88p. Tese doutorado. UFLA – Lavras. 1997.

LARCHER, W.; PICCIONI, M. Ecofisiologia vegetal. **Edagricole.** São Carlos, 531p., 1993

LÉDO, A. da S. et al. Efeito da sacarose e do manitol na conservação in vitro por crescimento lento de coqueiro anão. **Magistra**, Cruz das Almas-BA, v. 19, n. 04, p. 346-351, 2007.

LIMA, M. R. et al. *In vitro* cultivation of *Brosimum gaudichaudii* Tréc.(Moraceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 2, p. 462-466, 2014.

LOPES, T. et al. Antocianinas: uma breve revisão das características estruturais e da estabilidade. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 13, n. 3. 2007.

LÓPEZ O. P.; JIMÉNEZ A.R.; VARGAS F.D. et al. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains – **Reviews Food Science Nutrition**, v.40, n.3, p.173-289, 2000.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. **Plantarum**, Nova Odessa –SP, v. 4, p. 352, 2002.

LUIS, Z. G. **Propagação in vitro e caracterização anatômica de gemas adventícias e embriões somáticos de murici (*Byrsonima basiloba* Juss., Malpighiaceae)**. 2008. 107f. Dissertação (mestrado em Botânica). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Brasília – UNB, Brasília-DF, 2008.

MAHARIK, N.; ELGENGAIHI, S.; TAHA, H. Anthocyanin production in callus cultures of *Crataegus sinaica* boiss. **Int J Acad Res**, v. 1, n. 1, p. 30-34, 2009.

MAMEDE, M. C. H. **Gênero Byrsonima**. Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB8827>>. Acesso em: 03 Mai. 2017.

MARQUES, J. As Caatingas: debates sobre a ecorregião do Raso da Catarina. Fonte Viva, Paulo Afonso – BA, p.77-94, 2007.

MEDEIROS, M. F. T. Historical ethnobotany: an approach through historical documents and their implications nowadays. Recent developments and case studies in ethnobotany. NUPEEA, **Recife**, p. 127-142, 2010.

MIÑANO, A. et al. Efecto de la concentración de sacarosa en la producción de antocianinas a partir de cultivos celulares de *Vitis vinifera* L. var. red globe. **Revista Peruana de Biología**, v. 11, n. 2, p. 187-192, 2004.

MORO, L. **Regulação hormonal da biossíntese de antocianinas em framboesas (*Rubus idaeus*) no período pós-colheita**. 2013. 85f. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo - USP. 2013.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. **A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures**. *Physiologia Plantarum*, v. 15, n. 3, p. 493-497, 1962.

NEPOMUCENO, C. F.. **Propagação e conservação in vitro de *Martianthus leucocephalus* (MART. ex BENTH.) J.F.B. PASTORE**. 2012. 179f. Tese (Doutorado em Botânica) - Programa de Pós-graduação em Botânica, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia. 2012.

NOGUEIRA, R. C. et al. *In vitro* germination of (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, n. 5, p. 1053-1059, 2004.

NOGUEIRA, R. C. et al. Indução de calos em explantes foliares de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, Minas Gerais, v. 31, n. 2, p. 366-370, 2007.

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

OLÓRTEGUI, R. V. **Evaluación de antioxidantes fenólicos presentes en la corteza de *Byrsonima crassifolia* (Indano)**. 2016. 115f. Trabalho de conclusão de curso. FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS, Perú, 2016.

PANDEY, A.; RATHORE, D. K. S.; PATHAKAR, A. **Production of secondary metabolite (anthocyanin) from callus culture of *Daucus Carota***. International Journal of Advanced Scientific and Technical Research, Issue 5, volume 2, 2015.

PARK, JS. et al. Genes up-regulated during red coloration in UV-B irradiated lettuce leaves. **Plant cell reports**, v. 26, n. 4, p. 507-516, 2007.

PEREIRA, R. J. & CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. *Journal of biotechnology and biodiversity*, v. 3, n. 4. 63-68, 2012.

PIMENTEL, F. de O. et al. **Atividade antioxidante de *Byrsonima crassa* Nied. e *Byrsonima fagifolia* Nied. em modelos de indução de úlcera gástrica**. 2006. 111f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). UNICAMP, Campinas, São Paulo, 2006.

PIMENTEL, V. P. et al. Biodiversidade brasileira como fonte da inovação farmacêutica: uma nova esperança?. **Revista do BNDES**, Rio de Janeiro, n. 43, p. 41-89, 2015.

QUISEN, R. C.; ANGELO, P. C. da S.de. Manual de procedimentos do Laboratório de Cultura de tecidos. **Embrapa Amazônia Ocidental**. Manaus-AM. 2008, p. 13 – 2008.

RAJENDRAN, L. et al. Anthocyanin production in callus cultures of *Daucus carota* L. as influenced by nutrient stress and osmoticum. **Biotechnol Letters**, v. 4, n. 8, p. 707–712, 1992.
REZENDE, J.C. et al. Influência do meio de cultura e concentração de ágar no crescimento e desenvolvimento de plântulas de café oriundas da embriogênese somática direta. **Scientia Agraria**. 9(1):21-26. 2008.

RIBEIRO, I. G. **Estabelecimento da cultura de calos de *Cleome spinosa* Jacq. (Capparaceae)**. 2004. 71f. Trabalho de conclusão de curso. Universidade do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2004.

RIBEIRO, J. E. L. S. et al. Flora da reserva Ducke: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central. **INPA**, Manaus, p. 505-511, 1999.

ROLIM, T. L. et al. Constituintes químicos e atividade antioxidante de *Byrsonima gardneriana* A. Juss. (Malpighiaceae). **Química Nova**, v. 36, n.4, p. 524-527, 2013.

SÁ, F. S. **Potencial micropropagativo e conservação *in vitro* de *Byrsonima gardneriana* A. Juss.** 2015. 81f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal). Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal- Universidade do Estado da Bahia. Paulo Afonso-Ba. 2015.

SAMPAIO, C. R. P. **Caracterização físico-química, capacidade antioxidante e compostos bioativos de frutos de murici vermelho (*Byrsonima ligustrifolia* A. Juss.) em cinco estádios de maturação.** 2015. 102f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos)- Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

SILVA, R. C. da. **Cultura *in vitro* de calos e quantificação de compostos fenólicos em gabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa* O. Berg.).** 2016. 50f. Dissertação (Mestrado em Botânica), Universidade Federal do Paraná, Curitiba – Paraná. 2016.

SILVA, R. S. **Extração e estabilidade de pigmentos antocianínicos de frutos de Maria-Pretinha (*Solanum americanum* Mili.).** Tese de Mestrado. 1996. . 76 f. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 1996.

SIMIONI, R. E. et al. **Contribuição ao conhecimento químico dos Metabólitos Secundários de três espécies *Baccharis* da seção *Cylindrica*: *Baccharis pentodonta*, *Baccharis tridentata* e *Baccharis rufescens*.** 2013. 116 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2013.

SMITH, R.H. **Plant tissue culture: techniques and experiments.** United States of American. San Diego: Academic Pressn, Third Edition, 171p. 1992.

SOUSA, F. C. F. **Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: Uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais.** Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 18(4). p. 642-654, 2008.

STRATMANN, J. W. et al. UVB/UVA radiation activates a 48kDa myelin basic protein kinase and potentiates wound signaling in tomato leaves. **Photochemistry and Photobiology**, v. 71, n. 2, p. 116-123, 2000.

SUAN SEE, K.; BHATT, A.; LAI KENG, C. Effect of sucrose and methyl jasmonate on biomass and anthocyanin production in cell suspension culture of *Melastoma malabathricum* (Melastomaceae). **Revista de Biología Tropical**, v. 59, n. 2, p. 597-606, 2011.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal.** Universitat Jaume I, 2007.

TARRAHI, R.; REZANEJAD, F. Callogenesis and production of anthocyanin and chlorophyll in callus cultures of vegetative and floral explants in *Rosa gallica* and *Rosa hybrida* (Rosaceae). **Turkish Journal of Botany**, v. 37, n. 6, p. 1145-1154, 2013.

TÁVORA, F. L. et al. **Comentários à Lei nº 13.123, de 20 de maio de 2015: Novo Marco Regulatório do Uso da Biodiversidade.** 2015.

- TEIXEIRA, L. A. G.; MACHADO, I. C. Sistema de polinização e reprodução de *Byrsonima sericea* DC (Malpighiaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 14, n. 3, p. 347-357, 2000.
- TEIXEIRA, L. N.; STRINGHETA, P. C.; OLIVEIRA, F. A. Comparação de métodos para quantificação de antocianinas. **Ceres**, Viçosa, Minas Gerais, v.55, n.4, p.297- 304, 2008.
- TOLEDO, A. C. O. et al. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Revista Lecta**, v. 21, n. 1/2, p. 7-13, 2003.
- ULM, R, et al. Genome-wide analysis of gene expression reveals function of the bZIP transcription factor HY5 in the UV-B response of Arabidopsis. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 101: 1397-1402, 2004.
- VASCONCELOS FILHO, S. C. **Caracterização anatômica e histoquímica de folhas, calogênese e fitoquímica de calos de murici (*Byrsonima verbascifolia* Rich, ex A. Juss.)**. 70f. Dissertação (Mestrado em Botânica)- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2008.
- VERPOORTE, R.; MARASCHI, M. Engenharia do metabolismo de plantas medicinais. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**, v. 1, p. 381-432, 2001.
- WALTERMAN, P. G.; MOLE, S. Analysis of phenolic plant metabolites. **Blackwell Scientific**, 248p, 1994.
- ZANDERLUCE, G. L. **Propagação *in vitro* e caracterização anatômica de gemas adventícias e embriões somáticos de murici (*Byrsonima basiloba* Juss., Malpighiaceae)**. 2008. 95f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade de Brasília, Brasília, 2008.
-

APÊNDICES

APÊNDICE 1: Coeficiente de variação, ajuste do modelo de transformação e teste de médias da curva de crescimento.

```
#Coeficiente de variação: 0.09707775

#tuk2 = TukeyHSD(m2, "dose2", ordered = FALSE)

Tukey multiple comparisons of means
 95% family-wise confidence level

#Ajuste do modelo com a transformação raiz quadrada
> m2 = aov(sqrt(resp)~dose2)
> summary(m2)

      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
dose2   13  44.12   3.394  366.7 <2e-16 ***
Residuals 111   1.03   0.009

Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Fit: aov(formula = sqrt(resp) ~ dose2)

      diff          lwr          upr          p adj
7-0    4.317534e-16 -0.15554120  0.15554120  1.0000000
14-0    2.183439e-15 -0.15554120  0.15554120  1.0000000
21-0    2.092600e+00  1.93705905  2.24814144  0.0000000
28-0    1.167501e+00  1.01196025  1.32304264  0.0000000
35-0    1.161093e+00  1.00555159  1.31663398  0.0000000
42-0    1.089922e+00  0.93438106  1.24546345  0.0000000
49-0    6.081059e-01  0.44777775  0.76843414  0.0000000
56-0    6.140065e-01  0.45846531  0.76954770  0.0000000
63-0    6.234373e-01  0.46789607  0.77897846  0.0000000
70-0    6.529341e-01  0.49739294  0.80847533  0.0000000
77-0    3.576936e-01  0.20215245  0.51323484  0.0000000
84-0    1.270927e+00  1.11538600  1.42646839  0.0000000
92-0    1.452236e+00  1.29669466  1.60777706  0.0000000
14-7    1.751685e-15 -0.15554120  0.15554120  1.0000000
21-7    2.092600e+00  1.93705905  2.24814144  0.0000000
28-7    1.167501e+00  1.01196025  1.32304264  0.0000000
35-7    1.161093e+00  1.00555159  1.31663398  0.0000000
42-7    1.089922e+00  0.93438106  1.24546345  0.0000000
49-7    6.081059e-01  0.44777775  0.76843414  0.0000000
56-7    6.140065e-01  0.45846531  0.76954770  0.0000000
63-7    6.234373e-01  0.46789607  0.77897846  0.0000000
70-7    6.529341e-01  0.49739294  0.80847533  0.0000000
77-7    3.576936e-01  0.20215245  0.51323484  0.0000000
84-7    1.270927e+00  1.11538600  1.42646839  0.0000000
92-7    1.452236e+00  1.29669466  1.60777706  0.0000000
21-14   2.092600e+00  1.93705905  2.24814144  0.0000000
28-14   1.167501e+00  1.01196025  1.32304264  0.0000000
35-14   1.161093e+00  1.00555159  1.31663398  0.0000000
42-14   1.089922e+00  0.93438106  1.24546345  0.0000000
49-14   6.081059e-01  0.44777775  0.76843414  0.0000000
56-14   6.140065e-01  0.45846531  0.76954770  0.0000000
63-14   6.234373e-01  0.46789607  0.77897846  0.0000000
70-14   6.529341e-01  0.49739294  0.80847533  0.0000000
77-14   3.576936e-01  0.20215245  0.51323484  0.0000000
84-14   1.270927e+00  1.11538600  1.42646839  0.0000000
```

92-14	1.452236e+00	1.29669466	1.60777706	0.0000000
28-21	-9.250988e-01	-1.08063999	-0.76955760	0.0000000
35-21	-9.315075e-01	-1.08704865	-0.77596626	0.0000000
42-21	-1.002678e+00	-1.15821919	-0.84713680	0.0000000
49-21	-1.484494e+00	-1.64482249	-1.32416611	0.0000000
56-21	-1.478594e+00	-1.63413493	-1.32305254	0.0000000
63-21	-1.469163e+00	-1.62470418	-1.31362179	0.0000000
70-21	-1.439666e+00	-1.59520731	-1.28412491	0.0000000
77-21	-1.734907e+00	-1.89044779	-1.57936540	0.0000000
84-21	-8.216730e-01	-0.97721425	-0.66613185	0.0000000
92-21	-6.403644e-01	-0.79590558	-0.48482319	0.0000000
35-28	-6.408661e-03	-0.16194986	0.14913253	1.0000000
42-28	-7.757919e-02	-0.23312039	0.07796200	0.9078855
49-28	-5.593955e-01	-0.71972370	-0.39906731	0.0000000
56-28	-5.534949e-01	-0.70903614	-0.39795375	0.0000000
63-28	-5.440642e-01	-0.69960538	-0.38852299	0.0000000
70-28	-5.145673e-01	-0.67010851	-0.35902612	0.0000000
77-28	-8.098078e-01	-0.96534899	-0.65426660	0.0000000
84-28	1.034257e-01	-0.05211545	0.25896694	0.5727142
92-28	2.847344e-01	0.12919322	0.44027561	0.0000006
42-35	-7.117053e-02	-0.22671173	0.08437066	0.9503253
49-35	-5.529868e-01	-0.71331504	-0.39265865	0.0000000
56-35	-5.470863e-01	-0.70262748	-0.39154508	0.0000000
63-35	-5.376555e-01	-0.69319672	-0.38211433	0.0000000
70-35	-5.081587e-01	-0.66369985	-0.35261746	0.0000000
77-35	-8.033991e-01	-0.95894033	-0.64785794	0.0000000
84-35	1.098344e-01	-0.04570679	0.26537560	0.4717153
92-35	2.911431e-01	0.13560188	0.44668427	0.0000003
49-42	-4.818163e-01	-0.64214450	-0.32148811	0.0000000
56-42	-4.759157e-01	-0.63145694	-0.32037455	0.0000000
63-42	-4.664850e-01	-0.62202619	-0.31094379	0.0000000
70-42	-4.369881e-01	-0.59252931	-0.28144692	0.0000000
77-42	-7.322286e-01	-0.88776980	-0.57668741	0.0000000
84-42	1.810049e-01	0.02546375	0.33654614	0.0084672
92-42	3.623136e-01	0.20677241	0.51785480	0.0000000
56-49	5.900563e-03	-0.15442763	0.16622876	1.0000000
63-49	1.533132e-02	-0.14499688	0.17565951	1.0000000
70-49	4.482819e-02	-0.11550000	0.20515638	0.9994868
77-49	-2.504123e-01	-0.41074049	-0.09008410	0.0000400
84-49	6.628213e-01	0.50249306	0.82314945	0.0000000
92-49	8.441299e-01	0.68380172	1.00445811	0.0000000
63-56	9.430756e-03	-0.14611044	0.16497195	1.0000000
70-56	3.892763e-02	-0.11661357	0.19446882	0.9998464
77-56	-2.563129e-01	-0.41185405	-0.10077166	0.0000109
84-56	6.569207e-01	0.50137949	0.81246188	0.0000000
92-56	8.382294e-01	0.68268816	0.99377055	0.0000000
70-63	2.949687e-02	-0.12604432	0.18503807	0.9999937
77-63	-2.657436e-01	-0.42128481	-0.11020242	0.0000043
84-63	6.474899e-01	0.49194874	0.80303113	0.0000000
92-63	8.287986e-01	0.67325740	0.98433979	0.0000000
77-70	-2.952405e-01	-0.45078168	-0.13969929	0.0000002
84-70	6.179931e-01	0.46245186	0.77353426	0.0000000
92-70	7.993017e-01	0.64376053	0.95484292	0.0000000
84-77	9.132335e-01	0.75769235	1.06877474	0.0000000
92-77	1.094542e+00	0.93900102	1.25008341	0.0000000
92-84	1.813087e-01	0.02576747	0.33684986	0.0082750

APÊNDICE 2: Quadro de análise de variância e teste de médias para o experimento de seleção.

Quadro da análise de variância

	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Ciclo	2	25.307	12.6533	4065.3	0.0000e+00
Cor	2	20.800	10.3998	3341.3	1.0000e-23
Ciclo	4	7.978	1.9946	640.8	3.8743e-19
Resíduo	18	0.056	0.0031		
Total	26	54.141			

CV = 1.83 %

Teste de normalidade dos resíduos (Shapiro-Wilk)

Valor-p: 7.108199e-08

ATENCAO: a 5% de significância, os resíduos não podem ser considerados normais!

Quadro da análise de variância

	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Cor	2	20.79965	10.39983	3341.2638	0
Ciclo:Cor A	2	1.06038	0.53019	170.3392	0
Ciclo:Cor B	2	17.23452	8.61726	2768.5591	0
Ciclo:Cor C	2	14.98999	7.49500	2407.9979	0
Residuo	18	0.05603	0.00311		
Total	26	54.14056	2.08233		

Ciclo dentro do nível A de Cor - Teste de Tukey

Grupos Tratamentos Médias

a	2	4.6028
b	1	4.4576
c	3	3.813

Ciclo dentro do nível B de Cor - Teste de Tukey

Grupos Tratamentos Médias

a	1	4.0732
b	2	2.634833
c	3	0.6959

Ciclo dentro do nível C de Cor - Teste de Tukey

Grupos Tratamentos Medias

a	1	4.13
b	2	2.0089
c	3	1.0395

Quadro da análise de variância - Cor dentro de cada nível do Ciclo

	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Ciclo	2	25.30655	12.65327	4065.2531	0
Cor:Ciclo	1	2 0.25831	0.12916	41.4952	0
Cor:Ciclo	2	2 10.99300	5.49650	1765.92	0
Cor:Ciclo	3	2 17.52668	8.76334	2815.4917	0
Residuo	18	0.05603	0.00311		
Total	26	54.14056	2.08233		

Cor dentro do nível 1 de Ciclo - Teste de Tukey

Grupos Tratamentos Médias

a	1	4.4576
b	3	4.13
b	2	4.0732

Cor dentro do nível 2 de Ciclo - Teste de Tukey

Grupos Tratamentos Médias

a	1	4.6028
b	2	2.634833
c	3	2.0089

Cor dentro do nível 3 de Ciclo - Teste de Tukey

Grupos Tratamentos Médias

a	1	3.813
b	3	1.0395
c	2	0.6959

APÊNDICE 3: Extrato dos dados e teste de médias para o experimento de estresse osmótico.

Df	ntr	t.value	alpha	test	name.t
4	5	2.021075	0.05	Kruskal-Wallis	tratamento
	rank	resp	std r	Min	Max
0	18.555556	1.1021667	0.4247813 9	0.0333	1.4934
2.5	30.000000	1.4409667	0.1144862 9	1.3264	1.5917
5.0	41.000000	2.1686778	0.4050612 9	1.6321	2.8092
7.5	7.222222	0.8338778	0.0934623 9	0.7547	1.0566
10.0	18.222222	1.1230667	0.3432860 9	0.3579	1.6106

trt means M

1	5.0	41.000000	a
2	2.5	30.000000	b
3	0	18.555556	c
4	10.0	18.222222	c
5	7.5	7.222222	d

APÊNDICE 4: Extrato dos dados e teste de médias e análise de variância para o experimento de exposição à luz UV-C.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
trat_fator	6	146.7	24.451	3.147	0.00991 **
Residuals	56	435.1	7.769		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Tukey multiple comparisons of means
95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = resp ~ trat_fator)

	diff	lwr	upr	p adj
2-0	-4.0524889	-8.0704734	-0.03450442	0.0467659
4-0	-0.2538444	-4.2718289	3.76414003	0.9999952
8-0	-0.5081889	-4.5261734	3.50979558	0.9997148
16-0	-0.1973444	-4.2153289	3.82064003	0.9999989
32-0	-3.2913111	-7.3092956	0.72667336	0.1773247
64-0	-1.8347889	-5.8527734	2.18319558	0.8014004
4-2	3.7986444	-0.2193400	7.81662891	0.0754629
8-2	3.5443000	-0.4736845	7.56228447	0.1179157
16-2	3.8551444	-0.1628400	7.87312891	0.0680260
32-2	0.7611778	-3.2568067	4.77916225	0.9971701
64-2	2.2177000	-1.8002845	6.23568447	0.6267708
8-4	-0.2543444	-4.2723289	3.76364003	0.9999951
16-4	0.0565000	-3.9614845	4.07448447	1.0000000
32-4	-3.0374667	-7.0554511	0.98051780	0.2567713
64-4	-1.5809444	-5.5989289	2.43704003	0.8900002
16-8	0.3108444	-3.7071400	4.32882891	0.9999840
32-8	-2.7831222	-6.8011067	1.23486225	0.3565957
64-8	-1.3266000	-5.3445845	2.69138447	0.9496956
32-16	-3.0939667	-7.1119511	0.92401780	0.2373049
64-16	-1.6374444	-5.6554289	2.38054003	0.8727094
64-32	1.4565222	-2.5614622	5.47450669	0.9228891

APÊNDICE 5: Extrato dos dados, teste de normalidade e homogeneidade para o experimento de interação entre os reguladores BAP e 2,4-D.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
	24	34966	1456.9	3.693	1.66e-07 ***
Residuals	200	78894	394.5		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Bartlett test of homogeneity of variances

Bartlett's K-squared = 99.657, df = 24, p-value = 3.437e-11

Shapiro-Wilk normality test

W = 0.94276, p-value = 9.873e-08

Kruskal-Wallis rank sum test

Kruskal-Wallis chi-squared = 60.752, df = 24, p-value = 4.998e-05

