



CONTEÚDO FENÓLICO *IN VITRO* EM AÇUCENA DURANTE A ORGANOGÊNESE

PATRÍCIA SILVA FLORES¹; ENIO LUIS PEDROTTI²; DANIELLA BEZERRA SOUSA³;
1,3.EMBRAPA, RIO BRANCO, AC, BRASIL; 2.UFSC, FLORIANÓPOLIS, AC, BRASIL;
patricia.flores@cpafac.embrapa.br

Resumo: Apesar de a produção de compostos fenólicos *in vitro* ser associada à inibição da morfogênese, em estudos preliminares foi observado que a formação destes compostos em explantes de segmentos de bulbos de *Hippeastrum aulicum* antecedeu o processo organogênico. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi identificar a composição de ácidos fenólicos presentes nos explantes de segmentos de bulbos de *H. aulicum* para verificar a relação destes compostos com as respostas observadas *in vitro*. Foram analisados qualitativamente e quantitativamente a composição de ácidos fenólicos em tecidos de explantes com sintomas visuais de oxidação e em amostras de tecidos de bulbo intacto, por meio de cromatografia líquida de alta eficiência. Foram identificados os ácidos gálico, cinâmico e trans-cinâmico nos explantes de segmentos de bulbos e nos tecidos do bulbo com coloração natural, sendo observadas diferenças na concentração destes compostos entre as duas amostras. A presença de ácido cafeico apenas na amostra de tecidos do bulbo com coloração natural. De acordo com a literatura, estes compostos estão relacionados com o metabolismo da auxina. Assim, acredita-se que os mesmos podem ter influenciado a morfogênese em explantes de *H. aulicum*.

Palavras-chave: *Hippeastrum aulicum*, morfogênese, cultura de tecidos

Introdução

A micropropagação é uma alternativa para a propagação vegetativa de culturas que apresentam baixa produção natural de propágulos como é o caso de *Hippeastrum aulicum*. Esta espécie bulbosa, popularmente conhecida como açucena, é nativa do Brasil e apresenta alto potencial ornamental e de uso medicinal, pois produz alcalóides biologicamente ativos e clinicamente benéficos (ANDRADE, 2007).

Para o estabelecimento *in vitro*, recomenda-se que as culturas sejam mantidas em ausência de luz, visando minimizar a oxidação dos explantes. Essa estratégia é adotada para impedir a ação da enzima fenilalaninamonioliase, que participa de reações de síntese de compostos fenólicos que, quando oxidados, formam quinonas que são altamente tóxicas à célula vegetal. Tal enzima é dependente da luz para realizar sua ação catalítica (TAIZ & ZEIGER, 2002). No entanto, apesar de a produção de compostos fenólicos ser associada ao insucesso no estabelecimento *in vitro*, em alguns trabalhos foi



demonstrada a participação destes compostos no estímulo à organogênese (HRUBCOVÁA et al., 2000; LORENZO et al., 2001; SCHNABLOVÁA et al., 2006; BATISH et al., 2008).

Em estudos preliminares, foi observado que a formação de compostos fenólicos em explantes de segmentos de bulbos de *H. aulicum* antecedeu a morfogênese *in vitro*. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi identificar a composição de ácidos fenólicos presentes nos explantes de segmentos de bulbos de *H. aulicum* para verificar a relação destes compostos com as respostas observadas *in vitro*.

Material e Métodos

Foram realizadas análises qualitativa e quantitativa dos ácidos fenólicos por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em amostras de tecidos de explantes de segmentos de bulbos apresentando sintomas de oxidação e em amostras dos tecidos de bulbo com a coloração natural. Os explantes foram coletados de culturas mantidas em meio MS, com 1,00 μM de ANA e 4,00 μM de BAP, após cerca de 30 dias da manifestação visual da oxidação dos tecidos.

As amostras foram compostas de tecidos de três explantes e os ácidos fenólicos determinados através de três leituras em CLAE. Para cada amostra composta foi coletado 1,00 g de tecido macerado em cadinho de porcelana, e diluído em 4 mL de água destilada. As frações concentradas foram ressuspensas em metanol (MeOH) 70,00% (ca. 300,00 μL) e filtradas (0,22 μm). Alíquotas de 10,00 μL da amostra foram analisadas em cromatógrafo líquido (Shimzadu LC – 10A), equipado com coluna C18 (Shim-packCLC-ODS, 25 cm x 4,6 mm \varnothing) e detector espectrofotométrico UV – visível operando em dupla leitura (Ch1 = 280 nm, Ch2 = 225 nm). A eluição foi isocrática, com fluxo de 0,80 mL por minuto, utilizando-se $\text{H}_2\text{O}:\text{AcOH}:\eta - \text{BuOH}$ (350:1:10, v/v/v) como fase móvel. A identificação dos compostos de interesse foi feita com base nos tempos de retenção obtidos a partir da análise de amostras padrões, submetidas as mesmas condições experimentais. Os resultados foram expressos como equivalentes ao ácido gálico utilizado como curva padrão.

Resultados e Discussão

Foram identificados em ambas as amostras, os ácidos gálico, cinâmico e *trans*-cinâmico e a presença de ácido cafeico, apenas na amostra de tecidos do bulbo com coloração natural (Tabela 1).

Tabela 1 Concentração ($\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$) de ácidos fenólicos em amostras de tecidos de bulbo intacto e em amostras de explantes de segmentos de bulbo de *Hippeastrum aulicum* com sintomas visuais de oxidação, determinada por cromatografia líquida de alta eficiência.



Amostra	Ácido fenólico	Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
Tecidos do bulbo com coloração natural	Gálico	560, 79
	Cinâmico	245, 45
	<i>trans</i> -cinâmico	1.541, 58
	Cafeico	256, 09
Tecidos de explantes de segmentos de bulbo apresentando sintomas visuais de oxidação	Gálico	870, 51
	Cinâmico	907, 22
	<i>trans</i> -cinâmico	807, 98
	Cafeico	0,00

Alguns ácidos fenólicos agem sinergisticamente no crescimento das plantas como inibidor da auxina oxidase, no catabolismo de auxinas e na regulação do transporte e níveis de auxinas na célula (HRUBCOVÁA et al., 2000; LORENZO et al., 2001; SCHNABLOVÁA et al., 2006; BATISH et al., 2008). Segundo Hrubcováa et al. (2000), o ácido cafeico pode aumentar a quantidade de AIA livre na célula. Os níveis de AIA livre exercem uma importante função na regulação do crescimento e desenvolvimento das plantas, incluindo o alongamento celular. A ausência de ácido cafeico nos explantes que haviam iniciado o processo morfogênico, observada no presente trabalho, pode indicar que este composto foi utilizado durante o processo de diferenciação *in vitro*, sugerindo a participação dos mesmos no processo morfogênico.

Foi observado o aumento nos níveis de ácido gálico e ácido cinâmico nos explantes após o início do processo morfogênico (Tabela 1). O ácido gálico possui efeito antioxidante do AIA endógeno (LORENZO et al., 2001). Com a excisão do explante durante a introdução *in vitro* e exposição à luz, na sala de crescimento, os níveis dos compostos fenólicos nos tecidos tendem a aumentar, pois de acordo com Taiz & Zeiger (2002), a atividade da enzima fenilalanina amônia liase, que catalisa a reação de biossíntese de compostos fenólicos a partir da fenilalanina, é influenciada por fatores ambientais como luz, injúria mecânica aos tecidos, entre outros.

Os resultados observados neste trabalho abrem perspectivas para novos estudos avaliando-se os efeitos de ácidos fenólicos suplementados ao meio para indução de morfogênese na micropropagação da espécie.

Conclusão

Foram identificados os ácidos gálico, cinâmico e *trans*-cinâmico nos explantes de segmentos de bulbos e nos tecidos do bulbo com coloração natural, sendo observadas diferenças na concentração destes compostos entre as duas amostras. A presença de ácido cafeico apenas na amostra de tecidos do bulbo com coloração natural.



Agradecimentos

A CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

Referências Bibliográficas

- ANDRADE, J.P. de. **Análise química e biológica em alcalóides do gênero *Hippeastrum* (Amaryllidaceae)**. 2007. 102p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- BATISH, D. R.; SINGHB, H. P.; KAURA, S.; KOHLIA, R. K.; YADAVA, S. S. Caffeic acid affects early growth, and morphogenetic response of hypocotyl cuttings of mung bean (*Phaseolus aureus*). **Journal of Plant Physiology**, v. 165: p.297-305. 2008.
- HRUBCOVÁA, M.; CVIKROVÁA, M.; EDERA, J.; ZON' B, J.; MACHÁČKOVÁA, I. Effect of inhibition of phenylpropanoid biosynthesis on peroxidase and IAA-oxidase activities and auxin content in alfalfa suspension cultures. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 38, p.949–956, 2000.
- LORENZO, J.C.; BLANCO, M. A.; PELÁEZ, O.; GONZÁLEZ, A.; CID, M.; IGLESIAS, A.; GONZÁLEZ, B.; ESCALONA, M.; ESPINOSA, P.; BORROTO, C. Sugarcane micropropagation and phenolic excretion. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.65, p1-8, 2001.
- SCHNABLOVÁA, R.; SYNKOVÁB, H.; VIČÁNKOVÁC, A.; BURKETOVÁB, L.; EDERC, J.; CVIKROVÁC, M. Transgenic ipt tobacco overproducing cytokinins overaccumulates phenolic compounds during *in vitro* growth. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.44 p.526–534. 2006.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 3 ed. Massachusetts: Sinauer associates. 2002. 690p.