

Avaliação da propriedade reguladora de crescimento vegetal de compostos indólicos derivados do safrol em *Piper hispidinervium* *in vitro*

Liana Hilda Golin Mengarda¹, Rosete Pescador²,
Flávia Aparecida Fernandes da Rosa³ e Ricardo Andrade Rebelo⁴

Resumo – As propriedades auxínicas de novos compostos indólicos sintetizados a partir do safrol 2-AMIM e 3-AMIM foram avaliadas por meio de ensaios *in vitro*, nos quais explantes foliares de pimenta longa, submetidos a diferentes tratamentos, foram analisados quanto à presença e número de raízes e brotos, formação de calos, intumescimento e oxidação. Tanto os tratamentos suplementados com 3-AIA, quanto com 2-AMIM e 3-AMIM, apresentaram-se pouco efetivos na formação de raízes e não foi observada formação de brotos. A maioria dos explantes sofreu oxidação.

Termos para indexação: auxina, pimenta longa, bioensaio.

Assessment of plant growth regulation properties of indole composites derived from safrole in *Piper hispidinervium* *in vitro*

Abstract – The auxin properties of new indole composites synthesized from safrole 2-AMIM and 3-AMIM were evaluated by means of assays *in vitro*, in which leaf explants of *P. hispidinervium*, submitted to different treatments, were analyzed as to the presence and number of roots and shoots, callus formation, intumescence and oxidation. The treatments supplemented with 3-AIA, as well as those with 2-AMIM and 3-AMIM, were less effective in the root formation, and shoot formation was not observed. The majority of the explants underwent oxidation.

Index terms: auxin, long pepper, bioassay.

O safrol é um éter fenólico de fórmula molecular $C_{10}H_{10}O_2$, utilizado pelas indústrias química e farmacêutica por ser precursor de diversas moléculas. Entre elas, encontram-se o butóxido de piperonila e a heliotropina, utilizados em grande escala na fabricação de inseticidas leves biodegradáveis e fixadores de aromas (Valle et al., 2006). A versatilidade sintética e o

uso corrente por diferentes segmentos da indústria colocam o safrol em posição de destaque nos campos da ciência e tecnologia, entre outras. Essa molécula é capaz de formar compostos indólicos que são precursores na síntese de auxinas sintéticas, como, por exemplo, os ácidos 2-naftilacético, 2,4-diclorofenoxiacético, 3-indolbutírico e derivados halogenados (Terry, 1998).

Por sua vez, as auxinas são substâncias quimicamente relacionadas com o ácido 3-indolacético (3-AIA), sintetizadas pelas plantas. Esse grupo de hormônios vegetais desempenha papel importante em vários eventos fisiológicos das plantas, como divisão e alongamento celular, dominância apical, desenvolvimento lateral de raízes e na formação do embrião (Friml, 2003). ▶

Aceito para publicação em 22/7/08.

¹Bióloga, Universidade Federal do Espírito Santo – Ufes –, R. Maranhão, 50, ap. 401, 29101-340 Vila Velha, ES, fone: (27) 3299-3310, e-mail: liana_ya@yahoo.com.br.

²Eng. agr., Dra., Furb/CCEN/Departamento de Ciências Naturais, C.P. 1507, 89012-090 Blumenau, SC, fone: (47) 3321-0272, e-mail: rosetep@furb.br.

³Química, Dra., Furb/CCEN/Departamento de Química, fone: (47) 3321-0276, e-mail: frosa@furb.br.

⁴Farmacêutico, Dr., Furb/CCEN/Departamento de Química, fone: (47) 3321-0276, e-mail: rarebelo@furb.br.

Ao escolher o 3,4-metilenodioxibenzaldeído (piperonal) como precursor de novas estruturas análogas ao 3-AIA, tem-se a possibilidade de obtenção de um produto comercial de custo relativamente baixo, que pode ser facilmente preparado a partir da molécula de safrol (Rosa, 2002). Segundo os mesmos autores, pesquisas com o ácido 5,6-metilenodioxindol-3-il-acético (3-AMIA) forneceram resultados promissores quanto ao seu emprego como regulador de crescimento vegetal. Esses autores observaram que o uso do ácido 5,6-metilenodioxindol-2-il-metanoico (2-AMIM), ácido 5,6-metilenodioxindol-3-il-metanoico (3-AMIM) em bioensaios realizados com sementes de *Lactuca sativa*, *Cucumis sativus* e *Raphanus sativus*, promoveu o crescimento radicular de plântulas, semelhante ao seu análogo natural 3-AIA.

O objetivo do trabalho foi avaliar a atividade reguladora de crescimento vegetal *in vitro* dos compostos indólicos ácido 5,6-metilenodioxindol-2-il-metanoico (2-AMIM), ácido 5,6-metilenodioxindol-3-il-metanoico (3-AMIM), derivados do safrol, utilizando como explantes segmentos foliares de *Piper hispidinervium*.

As sementes de *Piper hispidinervium* foram hidratadas por 24 horas, sendo posteriormente submetidas a assepsia em álcool (70%) e cloro ativo 3%. As sementes fo-

ram, então, colocadas em placas de Petry contendo meio de cultura com sais de MS (Murashige & Skoog, 1962). Na sequência, as plântulas foram transferidas para frascos de cultura contendo a mesma solução nutritiva, onde ficaram por 30 e 100 dias da germinação, as quais foram fonte de explantes, sendo assim denominadas de plântulas de primeiro estágio (E1 = 30 dias da germinação) e de segundo estágio (E2 = 100 dias da germinação).

As plântulas nestes dois estágios de desenvolvimento forneceram explantes foliares, os quais foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10ml de meio de cultura (sais de MS, 30g/L de sacarose, 7g/L de ágar, pH 5,8 e esterilização em autoclave), com combinações de cinetina (KIN) associadas a concentrações de 3-AIA, 2-AMIM, 3-AMIM, totalizando 11 tratamentos, com dez repetições para cada estágio (Tabela 1).

Os resultados mostraram que os tratamentos utilizados não foram efetivos na formação de raízes e brotos, conforme verificado na Tabela 2, mas, por outro lado, levaram à indução da calogênese, ao intumescimento e à oxidação dos explantes, verificados aos 30 dias de cultivo.

Assim, apenas 10% (Tabela 2) dos explantes provenientes de E1 e E2 submetidos ao tratamento 3 (2,0mg/L 3-AMIM + 0,2mg/L KIN) e tratamento 7 (T7) (2,0mg/L 3-AIA + 0,02mg/L

L KIN), respectivamente, foram capazes de desenvolver raízes e em nenhum deles se verificou a formação de brotos, independentemente do tratamento utilizado.

Uma das principais respostas esperadas com o uso da auxina 3-AIA (tratamento testemunha) seria a formação de raízes. Quando esse hormônio é utilizado *in vitro*, é importante na modulação dos processos morfogênicos, levando à formação de raízes quando combinado com baixas concentrações de citocininas (Del Pozo et al., 2005). Porém, no presente estudo, os explantes foliares de *Piper hispidinervium* submetidos ao 3-AIA, bem como aos seus análogos 2-AMIM e 3-AMIM, apresentaram-se pouco efetivos para este tipo de resposta.

Esperava-se, ainda na presente pesquisa, que o balanço hormonal com maior concentração de auxinas em relação à citocinina, como aqueles dos tratamentos T3, T6 e T9, fosse capaz de formar raízes nos explantes; porém, como resposta, observou-se calogênese, intumescimento do explante, e explantes oxidados. Também não foi verificada a formação de parte aérea (brotações) naqueles tratamentos suplementados unicamente com citocinina (T2), ou combinada com auxina em balanços favoráveis às citocininas (T5, T8 e T11).

Observou-se, assim, no presente estudo, que as concentrações das

Tabela 1. *Tratamentos experimentais representados pelos meios de cultura com as diferentes concentrações e combinações dos reguladores de crescimento KIN, 3-AIA, 2-AMIM, 3-AMIM*

Tratamento	Cinetina (KIN)	Ácido 3-indolacético (3-AIA)	Ácido 5,6-metilenodioxindol-2-il-metanoico (2-AMIM)	Ácido 5,6-metilenodioxindol-3-il-metanoico (3-AMIM)
 mg/L			
1	-	-	-	-
2	0,2	-	-	-
3	0,2	-	-	2,0
4	0,02	-	-	2,0
5	1,0	-	-	0,02
6	0,2	2,0	-	-
7	0,02	2,0	-	-
8	1,0	0,02	-	-
9	0,2	-	2,0	-
10	0,02	-	2,0	-
11	1,0	-	0,02	-

Tabela 2. Percentual de explantes e suas respectivas respostas aos tratamentos (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11) que se refere ao balanço das substâncias KIN, 3-AIA, 2-AMIM, 3-AMIM

Tratamento	Brotos	Raízes	Calos	Intumescimento	Oxidação
..... %					
1	-	-	10 (E1) - (E2)	-	60 (E1) 60 (E2)
2	-	-	- (E1) 20 (E2)	-	60 (E1) 50 (E2)
3	-	10 (E1)	30 (E1) 10 (E2)	- (E1) 10 (E2)	40 (E1) 50 (E2)
4	-	-	80 (E1) 30 (E2)	- (E1) - 20 (E2)	- (E1) 20 (E2)
5	-	-	20 (E1) 10 (E2)	- (E1) 20 (E2)	30 (E1) 60 (E2)
6	-	-	50 (E1) 10 (E2)	20 (E1) 40 (E2)	20 (E2) 40 (E2)
7	-	10 (E2)	-	-	100 (E1) 90 (E2)
8	-	-	20 (E1) - (E2)	10 (E1) 10 (E2)	50 (E1) 90 (E2)
9	-	-	-	10 (E2) 20 (E1)	60 (E1) 80 (E2)
10	-	-	10 (E1) - (E2)	40 (E1) 30 (E2)	40 (E1) 100 (E2)
11	-	-	10 (E1) 10 (E2)	70 (E1) 20 (E2)	10 (E1) 60 (E2)

Nota: E1 e E2 - Explantes provenientes de plântulas com 30 e 100 dias de cultivo.

auxinas 3-AIA e 3-AMIM combinadas com menores teores equimolares de citocinina levaram à maior formação de calos nos explantes, cujo maior percentual (80%) é proveniente do estágio E1, submetido ao T4 (2,0mg/L 3-AMIN + 0,02mg/L KIN), conforme mostrado na Figura 1 e na Tabela 2. Esses calos surgiram, principalmente, nas bordas e face abaxial dos segmentos foliares. Nos explantes oriundos de E2 foi observado que 30% deles apresentavam calos, também quando submetidos ao T4. De modo geral, a indução de calos pode representar um resultado satisfatório na cultura de tecidos, havendo a possibilidade de essas células não diferenciadas formarem órgãos, através da organogênese indireta, como, por exemplo, a formação de brotos adventícios.

Os explantes oriundos de E1 submetidos ao T11 e T10 apresentaram-se intumescidos (Figura 1 e Tabela 2), sendo os percentuais

equivalentes a 70% e 40%, respectivamente. Todos os tratamentos que apresentavam na sua composição 3-AMIM (T3, T4 e T5), bem como o tratamento controle (T1) e o tratamento 2, suplementado apenas com KIN, não foram capazes de tornar os explantes de E1 intumescidos. Nos explantes provenientes de E2, foi observado intumescimento em 40% deles quando submetidos ao T6. O intumescimento pode ser decorrente do alongamento das células, tendo em vista estas estarem preparando-se para a divisão/multiplicação, o que pode indicar um aspecto da atividade auxínica.

Foram ainda verificados altos índices de oxidação do material vegetal, sendo que os tratamentos que menos permitiram oxidação nas plantas E1 foram T4 e T6, com percentuais de zero e 20%, respectivamente. Para as plantas de segundo estágio, estes mesmos tratamentos apresentaram também menores valores de oxidação: 20% e

40%. Teores mais elevados de 3-AIA e 2-AMIM, ou de KIN combinado com o 3-AIA, levaram à maior oxidação do material vegetal (Figura 1). O tratamento que apresentou maiores índices de explantes oxidados em E1 foi T7 (2mg/L 3-AIA + 0,02mg/L KIN), e dos provenientes de E2 foi o T10 (2mg/L 2-AMIN + 0,02mg/L KIN), dos quais todos se apresentaram oxidados.

Os bioensaios com explantes de *P. hispidinervium* mostraram que os novos compostos indólicos 2-AMIM e 3-AMIM não apresentaram propriedades auxínicas, tendo como principal variável para esta avaliação a não-formação de raízes. Porém, os tratamentos com o uso da auxina 3-AIA também não foram eficientes na formação de raízes nos explantes. Essas respostas podem ser atribuídas não apenas à propriedade reguladora de crescimento do composto adicionado ao meio de cultura, mas também a fatores endógenos do vegetal, como as

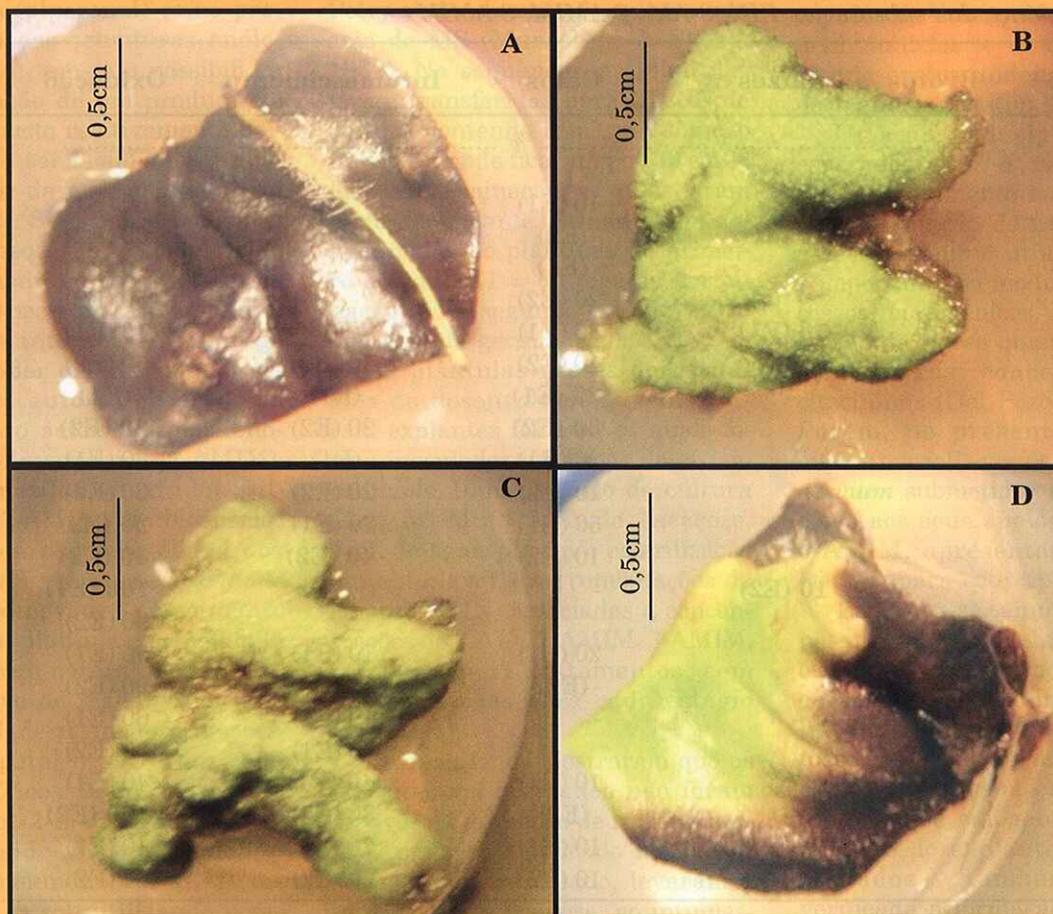


Figura 1. Explantes foliares de *Piper hispidinervium*, (A) Raiz em explante oxidado, submetido ao T3 (2mg/L 3-AMIM + 0,2MG/L KIN). (B) Explante apresentando formação de calo na borda abaxial do segmento foliar, proveniente de T4 (2mg/L 3-AMIM + 0,02mg/L KIN). (C) Explante intumescido, proveniente de T11 (0,02mg/L 2-AMIM + 1mg/L KIN). (D) Explantes E2 em processo de oxidação provenientes de T8 (0,02mg/L 3-AIA + 1,0mg/L KIN)

propriedades dos tecidos e o estágio de desenvolvimento do tecido do explante, além da composição bioquímica das células vegetais. As respostas ainda podem ter sido influenciadas pelo fato de ser o piperonal uma substância sintetizada pelas células da *P. hispidinervium*.

Ainda se remete à oxidação como um dos principais agravantes para que os resultados obtidos na presente pesquisa tenham sido insatisfatórios quanto à eficiência do 2-AMIM e 3-AMIM como reguladores de crescimento com propriedade auxínica.

Conclui-se que os tratamentos testados, aqueles mostrados na Tabela 1, não apresentaram atividade auxínica nos bioensaios realizados *in vitro* utilizando-se material vegetal de *Piper hispidinervium*.

Literatura citada

1. DEL POZO, J.C.; LOPES-MATAS, A.; RAMIREZ-PARRA, E. et al. Hormonal control of the plant cell cycle. *Physiologia Plantarum*, v.123, p.173-183, 2005.
2. FRIML, J. Auxin transport - shaping the plant. *Curr. Opin. Plant. Bio.*, v.6, p.7-12, 2003.
3. MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.15, n.6, p.473-479, 1962.
4. ROSA, F.A.F. Síntese e avaliação da atividade reguladora de crescimento vegetal de novos compostos indólicos derivados do safrol e relacionados ao ácido indol 3-acético. 2002. 209p. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2002.
5. TERRY, R. *Metabolic pathways of agrochemicals* - Part 1. Herbicides and plant growth regulators. Cambridge, UK: Royal Society Chemistry, 1998. 775p.
6. VALLE, R. de C.S.C. *Estratégias de cultivo de células de pimenta longa (Piper hispidinervium) e determinação de parâmetros cinéticos*. 2003. 166f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2003.
7. VALLE, R. de C.S.C.; OCHNER, G.; DEBIASI, C. et al. Performace of *Piper hispidinervium* cell in submerged sytem. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Curitiba, v.49, p.43-51, 2006. ■