

ÍNDICE

	Página
1. RESUMO.....	2
2. ABSTRACT.....	4
3. INTRODUÇÃO.....	6
4. REVISÃO DE LITERATURA.....	8
5. CAPÍTULO I - Espermidina e espermina exógenas na micropropagação de <i>Aloe vera</i> L. Burm.	16
6. CAPÍTULO II – Poliaminas, fenóis e peroxidase em <i>Aloe vera</i> (L.) Burm. micropropagada.....	34
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
8. APÊNDICE.....	75

1 - RESUMO

MÓGOR, G. Compostos fenólicos e peroxidase em *Aloe vera* (L.) Burm. (babosa) micropropagada, 2005. XX p. Tese (Doutorado)- Instituto de Biociências, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

Resumo:

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a ação da espermidina e espermina durante a micropropagação de *Aloe vera* (L.) Burm. e a participação dessas poliaminas nos teores de compostos fenólicos totais, assim como os flavonóides totais e atividade da peroxidase. O experimento consistiu de duas fases: na fase I diferentes concentrações de ácido naftalenoacético (NAA) e 6-benzilaminopurina (BAP) foram adicionados ao meio de cultura MS (1962). Na fase II, plantas provenientes do Tratamento MS (sem adição de reguladores vegetais) foram inoculadas em meio contendo ou não as poliaminas (espermidina e/ou espermina). Os tratamentos utilizados na fase I não induziram o enraizamento. Não foram notados indícios de oxidação em meio contendo poliaminas. O uso de espermidina no meio de cultura promoveu maior incremento de massa e o maior número de perfilhos foi obtido com o uso da combinação de espermidina e espermina. Plantas submetidas aos tratamentos com espermidina ou espermina apresentaram emissão de raízes durante a fase II, sugerindo possível efeito indutor, quando usadas isoladamente durante a rizogênese. A combinação das duas poliaminas não mostrou-se eficiente durante a rizogênese. Na fase final do experimento, as plantas foram submetidas às análises bioquímicas (poliaminas, fenóis totais solúveis, flavonóides totais solúveis e atividade da peroxidase), juntamente com plantas micropropagadas oriundas da fase I com 90 dias de cultivo *in vitro* (denominadas caracterização) e plantas matrizes (*in vivo*). Espermidina e espermina promoveram aumento no teor de putrescina e flavonóides totais solúveis. Putrescina apresentou as alterações mais significativas, podendo ser utilizada como marcadora de morfogênese em plantas de *Aloe vera* micropropagada. Tecidos em ativo crescimento apresentaram alta atividade de peroxidase, assim como aqueles com maior taxa de oxidação. Nestes tecidos também ocorreu maior teor de flavonóides totais solúveis. A ação conjunta das poliaminas mostrou-se benéfica para o perfilhamento.

Palavras-chave: compostos fenólicos, poliaminas, peroxidase, micropropagação.

2 - ABSTRACT

MÓGOR, G. Phenolic compounds and peroxidase in *Aloe vera* (L.) Burm. (babosa) micropropagated , 2005. XX p. – Thesis (Doctorship) - Biosciences Institute, São Paulo Estate University (UNESP), Botucatu.

Abstract:

The present work has as aim to evaluate the action of spermidine and spermine during the micropropagation of *Aloe vera* (L.) Burm, and the respective participation of these polyamines in the contents of the total phenolic compounds, as well as the total flavonoids, and the activity of peroxidase. The work consisted of two phases: in the phases I different concentrations of naphthaleneacetic acid (NAA) and 6-benzilaminopurine (BAP) have been added to the culture-medium MS (1962). In the phase II, plants proceeding from the MS treatment (without addition of vegetal regulators) were inoculated in medium containing or not the polyamines (spermidine and/or spermine). Thus the phase I as well as the phase II have consisted of four treatments. The utilized treatments in the phase I have not induced the rooting. In the medium containing polyamines any evidence of oxidaton was noted. The use of spermidine in the culture medium promoted great enlargement of mass and the most number of shoots was obtained with the use of the combination of spermidine and spermine. Plants submitted to treatments with spermidine or spermine presented emission of roots during the phase II, suggesting possible inductor effect when used isolated during the rooting. The combination of the two polyamines seemed not to be efficient during the rooting. In the final phase of the experiment, the plants were submitted (polyamines, total phenols, total flavonoids and the activity of peroxidase), together with micropropagated plants with 90 days of cultivation (*in vitro*) denominated characterization and matrix plants (*in vivo*), spermidine and spermine promoted an increase in the content of putrescine and larger content of phenols and total flavonoids. Putrescine presented the most significant alterations, being possible to be utilized as marker of morphogenesis in the *Aloe vera* plants. Tissues in active growth have presented high activity of peroxidase, as well as those with larger rate of oxidation. In these tissues also occurred greater contents of total flavonoids. The joint action of polyamines seemed to be benefic for the shooting of micropropagated *Aloe vera*.

Key-words: Phenolic compounds , polyamines, peroxidase, micropropagation.

3 – INTRODUÇÃO

Ressaltando a importância das plantas medicinais nos seus diversos aspectos para a saúde humana, dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) apontam que 80% da população mundial as utiliza como principal recurso básico de saúde. O mercado internacional de fitoterápicos movimentava milhões de dólares anualmente. No Brasil, cerca de 25% do faturamento da indústria farmacêutica está relacionado com fármacos derivados de plantas, mas apesar de todo este potencial, o Brasil ainda importa 84%, a um custo elevado (Simões et al., 1999).

Nos últimos anos, o interesse pelas propriedades medicinais do gênero *Aloe* aumentou significativamente, porém a oferta de biomassa de *Aloe vera* não tem sido suficiente (Silva et al., 2000). A lentidão e o baixo rendimento em relação à multiplicação convencional são os principais fatores que contribuem para essa demanda frequente (Silva & Debiassi, 2002). Nesse contexto, a cultura de tecidos representa um método viável para acelerar a multiplicação de espécies vegetais e também para recuperação de plantas livres de vírus e outros agentes causadores de doenças (Duval et al., 1998). As técnicas da cultura de tecidos podem ser aplicadas em várias espécies de acordo com diferentes objetivos, tais como a obtenção de plantas isentas de viroses, através da cultura de meristemas e micropropagação através de gemas ou outros explantes, visando a multiplicação de plantas selecionadas. A cultura de ápices maiores que o meristema pode ser suficiente para a limpeza de patógenos como nematóides, bactérias e fungos, uma vez que em condições de cultivo eles podem ser detectados no próprio meio de cultura. A metodologia para a propagação depende, como em todo processo de micropropagação, da assepsia, do estado fisiológico do explante e da composição do meio de cultura em que será inoculado. Depende ainda, principalmente dos reguladores vegetais adicionados ao meio, que irão suprir as deficiências do próprio explante, estimulando respostas para diferenciação, crescimento, alongamento, multiplicação e enraizamento (Luz et al., 1997).

Poucos trabalhos relatam a produção de plantas micropropagadas de *Aloe vera* com o intuito de obtenção de compostos medicinais, porém, em plantas propagadas por métodos convencionais diversas substâncias como vitaminas, aminoácidos, enzimas como a peroxidase, açúcares, minerais e compostos fenólicos são descritos na literatura (Weiner & Weiner, 1994). O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito dos reguladores vegetais (auxina e citocinina), bem como de poliaminas (espermidina e espermina), durante a micropropagação de *Aloe vera* (L.) Burm., assim como, avaliar a participação das poliaminas nos teores de compostos fenólicos, incluindo os flavonóides e na atividade da peroxidase.

4 - REVISÃO DE LITERATURA

Aloe vera (L.) Burm., pertence à família Liliaceae e é conhecida como babosa. Possui folhas carnosas, dispostas em rosetas ou no caule nos nós abreviados e apresenta escapo floral áfilo. As flores são reunidas em inflorescências simples ou compostas. Nesta família, a grande maioria são ervas, possuindo bulbos ou rizomas perenes. As formas semi-arborescentes encontram-se entre o gênero *Aloe* (Gemtchújnicov, 1976).

A babosa é perene, suculenta e com talo único. Possui de 60 a 90 cm de altura. As folhas são carnosas, longas, espinhentas, de pontas agudas, formando um invólucro em torno do caule; as flores são terminais, em cacho alongado apontando para baixo, de coloração amarela ou vermelha, com laivos alaranjados. Apresenta sabor amargo e nauseante, com odor forte e desagradável. Seu habitat são locais ensolarados e secos, e se desenvolvem bem em solos arenosos. Provavelmente, é nativa da África, há muito estabelecida no litoral dos mares Mediterrâneo e Vermelho. É cultivada principalmente em regiões tropicais e subtropicais (Teske & Trentini, 1994).

O uso de plantas medicinais representa um recurso terapêutico amplamente difundido, sendo utilizado desde a antiguidade (Schmid, 1991). Dentre as plantas populares, a babosa é uma das que mais merecem essa qualificação. Quase todos os balcões de cosméticos exibem xampus e cremes para a pele contendo *Aloe vera*. O valor dessa planta reside em sua capacidade de regenerar tecidos danificados, o que faz com bastante eficiência. É possível que a espécie tenha se originado nas ilhas de Cabo Verde e, nos primórdios da história, tenha aparecido no Egito, na Arábia e na Índia. A *Aloe vera* contém glicosídeos antraquinônicos semelhantes àqueles da cáscara sagrada (*Rhamnus purshiana*) e sene (*Cassia angustifolia*). A medicina descobriu novas aplicações para a planta, por exemplo, é utilizada como unguento para tratamento de queimaduras por radiação, cicatrização de feridas, contusões e irritações. O extrato das folhas é indicado como tônico, purgativo e para icterícia. O sumo fresco e viscoso das folhas de babosa serve como um ingrediente emoliente (amaciante da pele) em muitas loções, cremes, unguentos e xampus. O sumo fresco é também largamente empregado em casos de ferimentos e queimaduras, tanto no uso doméstico como em vários produtos farmacêuticos (Reynolds & Dweck, 1999).

Segundo Dorneles et al. (2003), a partir da extração das suas folhas, duas frações podem ser obtidas: um exsudato amargo e um gel mucilaginoso. O primeiro é considerado pela farmacopéia como a droga aloe, líquido extraído das células do periciclo, de coloração amarelo-avermelhada, rico em compostos antracênicos. O segundo provém do parênquima da folha (McKeown, 1987), com aspecto de gel incolor (mucilagem) e tem sido usado para curar queimaduras, cicatrizar feridas, aliviar

dores, além de ser um poderoso agente hidratante (Grindlay, 1986). As diferentes formas de apresentação derivadas da mucilagem das folhas de *Aloe vera* disponíveis são estabilizadas, preparadas por diversos métodos, desde extração por solventes sob condições extremas até processos de extração por secagem em baixas temperaturas. O produto resultante é variável em relação à sua composição e ao comprometimento da propriedade cicatrizante da droga “in natura” (Robbers et al., 1996). Quando a mucilagem é retirada da folha, uma série de modificações enzimáticas ocorrem, decompondo e escurecendo o gel (Smothers, 1983; Leung, 1985).

Diferentes propriedades são atribuídas ao gel e ao exudato de suas folhas desenvolvidas. Diversos autores (Robson et al., 1982; Klein & Penneys, 1988; Marshall, 1990; Shelton, 1991; Canigual & Vila, 1993) atribuem muitos efeitos benéficos à presença de salicilatos e suas implicações num efeito tipo aspirina. Outras substâncias, como lactato de magnésio, presentes no gel são citados como inibidores da produção de histamina e histidina (Rubel, 1983).

O primeiro registro de utilização terapêutica de *A. vera* no continente americano data de 1697; todavia, sua inclusão na farmacopéia dos EUA ocorreu somente em 1820, como purgativo e cicatrizante (Hedendal, 2000).

Seus princípios ativos, contidos na mucilagem, são a aloína, um composto químico de natureza antracênica de ação purgativa, o aloferon, que é um polissacarídeo complexo de ação cicatrizante e a própria mucilagem, que tem ação demulcente (Cruz et al., 2001).

Davis (1997) citou as propriedades imunomodulatórias de polissacarídeos do gel de *Aloe vera*, porém, de acordo com McAuliffe & Hindsgaul (1997), a totalidade das substâncias ativas ainda não estão totalmente elucidadas. Também mencionam atividades antibacterianas, antifúngicas e em alguns casos antivirais, assim como atividades antioxidantes, as quais atualmente despertam grande interesse. Embora não se tenha descoberto ainda todos os segredos do funcionamento de *Aloe vera*, sabe-se que a “mistura específica dos ingredientes” é responsável pelo seu alto poder curativo. As propriedades benéficas não podem ser atribuídas apenas aos polissacarídeos, mas a um efeito sinérgico destes com outras substâncias presentes no gel, tais como vitaminas, enzimas como peroxidase, lipase e catalase, aminoácidos, açúcares, minerais, fibras e compostos fenólicos.

Strickland et al. (1994) destacaram o efeito protetor dos polissacarídeos e oligossacarídeos do gel de *Aloe vera* contra a irradiação UV e também o efeito inibidor sobre o desenvolvimento de *Cândida albicans*, atribuídos às xiloglucanas presentes no gel dessa espécie. Uma atividade recém atribuída à fração de polissacarídeos e glicoproteínas de *Aloe* é a inibição do desenvolvimento de

vários tipos de câncer, especificamente duas glicoproteínas relacionadas com esse processo, aloctin A e aloctin B. Efeito similar é atribuído ao polissacarídeo comercial Acemannan.

De acordo com o exposto, nota-se que essa planta é muito utilizada e diversas propriedades medicinais podem ainda ser atribuídas, necessitando dessa forma, de plantas saudáveis, com alta produtividade.

A propagação de *Aloe vera* é realizada por meio da remoção de brotações laterais, principalmente ao longo da estação de crescimento. O número e a frequência de brotos laterais emitidos é bastante variável, fato que dificulta o planejamento de um sistema produtivo de mudas no que concerne ao seu rendimento. Em geral, três ou quatro brotos laterais são emitidos/ano/planta-matriz. Esta condição gera um sistema de produção com baixo rendimento, sendo um processo moroso e caro, principalmente quando se considera o tempo necessário para a obtenção de um número de mudas que permita a implantação de 1 hectare, por exemplo, com valores de densidade de plantio de 12.000 a 16.000 plantas por hectare, como usualmente é observado em plantios comerciais dessa espécie. Adicionalmente, esse sistema clássico de produção de mudas apresenta como característica maior probabilidade de ocorrência de moléstias no material de plantio, em função das lesões que são feitas à planta-mãe e às mudas (brotos laterais), no momento da colheita. O aumento da oferta de biomassa pressupõe a existência de incrementos de produtividade dos cultivos e/ou a expansão da área desses. A implantação de cultivos com altos rendimentos tem como premissa básica a utilização de material de plantio de alta qualidade genética e sanitária (Silva et al., 2000).

O processo de multiplicação “in vitro” envolve o isolamento de células, tecidos ou órgãos e inoculação em condições assépticas em meio nutritivo próprio, sob condições controladas, visando o completo desenvolvimento dos órgãos. Os métodos padrões incluem a esterilização superficial e a inoculação dos explantes em meios de cultura adequados estéreis, que deverão promover a formação de múltiplas brotações. A regeneração de plantas “in vitro” pode ser resultado da multiplicação clonal, alcançadas com a utilização de estruturas organizadas como ápices ou gemas, ou através de variações genéticas via calos, provenientes de explantes foliares, protoplastos ou outros tecidos somáticos, subsequentemente, os brotos formados são destacados e subcultivados em meios de enraizamento (Castro, 1992).

Diversos tipos de explantes podem ser usados em cultura de células e tecidos vegetais, tais como embriões, ápices caulinares e radiculares, meristemas, epicótilo, etc. A função desses explantes é de servir como parte propagativa, de onde surgirão calos e/ou novas plantas.

A cultura de ápices caulinares, erroneamente chamada de cultura de meristemas, é utilizada para propagação de plantas *in vitro*, recuperação de plantas livres de vírus, conservação e intercâmbio de germoplasma e transformação. Uma das vantagens é, na maioria dos casos a manutenção do genótipo regenerado, em virtude das células do meristema manterem mais uniforme a sua estabilidade genética. Em adição, o ápice é uma estrutura organizada, que pode desenvolver-se diretamente em parte aérea, em meio de cultura adequado, sem passar pela fase de calo. Em geral, a cultura de ápices caulinares é empregada para recuperação de plantas livres de doenças, bem como para produção de plantas idênticas àquelas de onde foram retiradas (Grattapaglia & Machado, 1998).

A variabilidade na resposta morfogênica “*in vitro*” que existe não apenas entre espécies do mesmo gênero, mas também entre genótipos da mesma espécie (diferentes cultivares ou clones), leva frequentemente à necessidade de se definirem protocolos diferenciados (Grattapaglia & Machado, 1998).

Segundo Murashige (1974), a cultura de tecidos basicamente compreende três fases: seleção dos explantes, desinfestação e cultura em meio nutritivo sob condições assépticas; multiplicação dos propágulos através de sucessivos subcultivos ou recultivos em meio apropriado para a multiplicação e transferência dos brotos produzidos para meio de enraizamento e subsequente transplântio das plantas obtidas para um substrato adequado. Debergh & Read (1991) citam que mais uma fase poderia ser acrescentada, como forma de contornar os problemas de contaminação relacionados com explantes oriundos da casa de vegetação ou do campo. Nessa fase, o cultivo de plantas matrizes em condições controladas poderia garantir o bom estado fitossanitário das mesmas, resultando em baixos índices de contaminação quando do cultivo “*in vitro*”.

A morfogênese “*in vitro*”, como um evento de regeneração de plantas, pode ser expressa pelos métodos de cultura de embriões, embriogênese somática e organogênese, que pode ser direta ou indireta. No processo de obtenção de calos (massa de células de proliferação contínua e mais ou menos desordenada), células do tecido do explante são estimuladas a se dividirem, para isso, é essencial a presença de reguladores vegetais, como auxinas e citocininas, adicionados ao meio de cultura básico (Teixeira, 1994). Skoog & Miller (1957) propuseram que as interações quantitativas entre reguladores, especialmente a auxina e a citocinina, proporcionam um mecanismo comum para a regulação dos processos morfogênicos. A formação de raiz, parte aérea e calo em cultura de tecidos é regulada pela disponibilidade e interação destas duas classes de reguladores de crescimento.

Reguladores vegetais são substâncias sintéticas, os quais, quando aplicados nas plantas, produzem efeitos semelhantes aos dos hormônios. A atividade dos reguladores vegetais irá depender da concentração e estabilidade no meio de cultura durante a preparação e esterilização do meio. O balanço hormonal no meio é determinante para o processo de regeneração das plantas. As auxinas são sintetizadas nas plantas em regiões de crescimento ativo, como meristema apical, gemas axilares, folhas jovens, e posteriormente são translocadas para diferentes órgãos, onde atuam no mecanismo interno que controla o crescimento. A auxina mais usada para estimular multiplicação em meio de cultura é o ácido alfa-naftaleno acético (NAA), seguido do ácido indol-3-butírico (IBA) e ácido 3-indolilacético (IAA). As citocininas promovem divisão, alongamento e diferenciação celular, retardam a senescência das plantas, promovem a quebra de dominância apical e induzem proliferação de gemas axilares. A citocinina é fundamental para multiplicação da parte aérea e indução de gemas adventícias, sendo a 6-benzilaminopurina (BAP) a mais utilizada, seguida da cinetina 6-furfurilaminopurina (Kt) e N-6-benziladenina (BA). A concentração e o tipo de citocinina são os fatores que mais influenciam a multiplicação *in vitro* (Tagliacozzo, 1998).

A adição de poliaminas ao meio de cultura tem mostrado efeito estimulador de crescimento em várias plantas (Scott et al., 1998). As poliaminas estão envolvidas na regulação do crescimento, divisão e diferenciação celular e também na resposta à várias fontes de estresse e sua aplicação exógena tem sido utilizada por diversos pesquisadores para aumentar ou proporcionar divisão e crescimento celulares (Rajam, 1997).

Slocum et al. (1984) relataram a possível função das poliaminas como reguladores ou mensageiros secundários nas células vegetais. De acordo com Evans & Malmberg (1989) as poliaminas são encontradas nas células em níveis significativamente mais elevados do que de hormônios vegetais, sendo definidas como reguladores vegetais ao invés de hormônios propriamente ditos. As poliaminas são aminas de baixo peso molecular, presentes em todos os organismos vivos e estão envolvidas no processo de divisão celular, crescimento e desenvolvimento. O termo poliamina tem sido usado na literatura para designar aquelas aminas primárias que possuem mais de dois grupamentos amina, como espermidina (triamina) e espermina (tetramina) e ainda, no sentido mais genérico inclui a putrescina (diamina). Uma variedade de outros compostos de aminas primárias são encontradas nas plantas, incluindo cadaverina. Podem ocorrer na forma livre (putrescina, espermidina e espermina) ou conjugada com radicais como o cafeil, cumaril, entre outros, sendo que os níveis destas poliaminas em algumas plantas pode exceder aquelas na forma livre. Acredita-se que 30% do

total das poliaminas encontradas nas plantas estão na forma conjugada. Em pH fisiológico, as poliaminas livres apresentam-se protonadas, atuando como carregador orgânico. Células em divisão têm apresentado níveis mais elevados de poliaminas livres, quando comparadas com células em expansão (Walden et al., 1997). As poliaminas na forma conjugada apresentam-se ligadas a compostos fenólicos, substâncias com baixo peso molecular, ou ainda à macromoléculas (Galston & Kaur-Sawhney, 1990).

A iniciação e o desenvolvimento dos órgãos em explantes de plantas, envolvem a promoção da atividade meristemática, sua manutenção em algumas regiões e concomitante supressão em regiões de maturação (Kay & Basile, 1987). A enzima peroxidase (EC 1.11.1.7), amplamente distribuída no reino vegetal, tem sido relacionada com o início dessa atividade e com a supressão do crescimento (Da Costa et al., 1979).

As peroxidases são hemeproteínas, que na presença de peróxido de hidrogênio catalizam a oxidação de compostos fenólicos (Dilley, 1970). Segundo diversos autores (Walker, 1964; Clemente & Pastore, 1998), as peroxidases têm sido implicadas em vários processos bioquímicos e fisiológicos, tais como biogênese do etileno, balanço hormonal e integridade da membrana.

Rawal & Mehta (1982) relataram que a peroxidase pode ser usada como indicador de diferenciação celular e ainda, apresenta papel significativo no crescimento da planta (Epstein & Laport, 1984) assim como nas mudanças morfogênicas observadas em resposta a agentes físicos, químicos e ao estresse biótico (Gaspar et al., 1985) ou abiótico (Lima et al., 1999). Lima (1994) relata que a peroxidase pode ser utilizada como marcador enzimático de estádios de desenvolvimento de plantas *in vitro*.

A peroxidase é encontrada em plantas de *Aloe vera*, as quais juntamente com outras enzimas (aliase, alcalinase, fosfatase, amilase, carboxipeptidase, catalase, celulase e lipase) atuam em processos digestivos, acelerando o metabolismo e, portanto, favorecendo a eliminação de toxinas e colesterol (Lee et al., 2000).

Além de enzimas, também encontra-se no gel polissacarídeos, aminoácidos, vitaminas, fibras, minerais e compostos fenólicos, sendo que estes estão relacionados com propriedades antioxidantes, contra ataque de radicais livres nas membranas das células (Yu, 1994).

Diversos compostos fenólicos com atividade antioxidante são encontrados nas plantas como derivados de ácido cinâmico, cumarinas, ácidos orgânicos polifuncionais e flavonóides (Pratt & Hudson, 1990).

Nos últimos anos tem-se observado um interesse crescente no estudo da atividade biológica de plantas que contém flavonóides. Neste sentido, vários trabalhos tem sido realizados analisando a ação dos flavonóides na biologia das plantas, bioquímica ecológica, quimiotaxonomia, tecnologia de alimentos e farmacologia. Levando em consideração esses fatores, tornam-se relevantes os conhecimentos sobre as fontes naturais de flavonóides. Os flavonóides por serem compostos fenólicos agem como potentes antioxidantes e formam quelatos com os metais. Eles agem contra vírus, bactérias, fungos e na alimentação, reprodução e desenvolvimento animal. Podem também interferir na germinação de sementes e reprodução de mudas (Vivian et al., 1987). Devido a importância e potencialidade química dos flavonóides, evidencia-se a necessidade da intensificação das investigações de diversos substratos de plantas que contenham essas substâncias (Oliveira et al., 1999). Tais compostos parecem também estar em, praticamente, qualquer interação da planta com o ambiente abiótico. Fatores abióticos naturais como irradiação solar, luz UV, seca, nutrientes e estações do ano influenciam no metabolismo e na produção desses composto (Glyphis & Puttick, 1988).

Os fenóis vegetais são numerosos, estando representados em quase todas as classes de metabólitos secundários (Smith, 1976). Na classificação de Waterman & Mole (1994), são descritos os fenóis simples (com um único anel aromático), metabólitos mais complexos baseados no esqueleto C_6C_3 , metabólitos com o esqueleto carbônico $C_6C_{0-2}C_6$, metabólitos com o esqueleto $C_6C_3C_6$, quinonas, benzofenonas e substâncias afins, alcalóides, terpenos e finalmente, fenóis mascarados. Os flavonóides também são compostos fenólicos e têm sua estrutura baseada em 2-fenil-benzopirano ($C_6C_3C_6$) (Figura 1), sendo representado por várias classes, de acordo com o grau de oxidação do anel central (Harborne, 1973; Ikan, 1991).

Os flavonóides constituem a maior classe de fenólicos vegetais. Os tipos diferentes de flavonóides desempenham funções diversas nos vegetais, incluindo pigmentação e defesa (Taiz & Zeiger, 2004). Nas folhas, as flavonas e os flavonóis, por apresentarem sistemas mais conjugados, são considerados os principais pigmentos que absorvem luz UV, além de serem os mais comuns (Pietta et al., 1989).

Devido a importância e a potencialidade química dos flavonóides, evidencia-se a necessidade de intensificação das investigações de diversos substratos de plantas que contenham estas substâncias (Oliveira et al., 1999).

5 – CAPÍTULO I

COMPOSTOS FENÓLICOS E PEROXIDASE EM *Aloe vera* (L.) Burm. (BABOSA) MICROPROPAGADA

I - Espermidina e espermina exógenas na micropropagação de *Aloe vera* L. Burm.

Gilda Mógor¹, Giuseppina Pace Pereira Lima²

¹Universidade Estadual Paulista – UNESP, Pós-Graduanda do Programa de Ciências Biológicas (Botânica) do Departamento de Química e Bioquímica, Instituto de Biociências, CP 510, CEP 18.618-000, Botucatu, SP.

Tel: (14) 3811-6255 e-mail: mogor@terra.com.br

² Universidade Estadual Paulista – UNESP, Profa. Dra. do Departamento de Química e Bioquímica, Instituto de Biociências, CP 510, CEP 18.618-000, Botucatu, SP.

Tel: (14) 3811-6255 e-mail: gpplima@ibb.unesp.Br

Resumo:

Ápices caulinares de brotações laterais de plantas de *Aloe vera* L. Burm., foram submetidos a assepsia e inoculados em meios nutritivos. O experimento foi dividido em duas fases. Na fase I diferentes concentrações de ácido naftalenoacético (NAA) e 6-benzilaminopurina (BAP) foram adicionados ao meio de cultura MS (1962), totalizando quatro tratamentos. Na fase II, plantas provenientes do Tratamento MS (sem adição de reguladores vegetais) foram inoculadas em meio contendo ou não poliaminas (espermidina e/ou espermina). Na fase I, os melhores resultados para produção de massa e perfilhamento ocorreu com o uso de MS + 8,88 $\mu\text{mol L}^{-1}$ BAP + 5,36 $\mu\text{mol L}^{-1}$ NAA. Os tratamentos utilizados não induziram o enraizamento no período avaliado. Plantas submetidas aos tratamentos com espermidina ou espermina apresentaram emissão de raízes durante a fase II, sugerindo possível efeito indutor, quando usadas isoladamente durante a rizogênese. A combinação das duas poliaminas não mostrou-se eficiente durante a rizogênese. Não foram notados indícios de oxidação no meio contendo poliaminas. O uso de espermidina no meio de cultura promoveu maior incremento de massa e o maior número de perfilhos foi obtido com o uso da combinação de espermidina e espermina.

Palavras-chave: poliaminas, reguladores vegetais, micropropagação, enraizamento.

MÓGOR, G. Phenolic compounds and peroxidase in *Aloe vera* (L.) Burm. (babosa) micropropagated .

I – Exogen spermidine and spermine in the micropropagation of *Aloe vera* (L.) Burm.

Gilda Mógor¹, Giuseppina Pace Pereira Lima²

¹ São Paulo Estate University (UNESP), Pós-Graduator of the Biological Science Programme (Botanic) of the Chemical and Bio-Chemical Department, Bioscience Institute, CP 510, CEP 18.618-000, Botucatu, SP.

Tel: (14) 3811-6255 e-mail: mogor@terra.com.br

² São Paulo Estate University (UNESP), Profa. Dra. of the Chemical and Bio-Chemical Department, Bioscience Institute, CP 510, CEP 18.618-000, Botucatu, SP.

Tel: (14) 3811-6255 e-mail: gpplima@ibb.unesp.Br

Abstract:

The lateral shoots of the *Aloe vera* L. Burm plants have been submitted to an asepsis and inoculated in nutritive medium. The work has been divided in two phases. In the phase I different concentrations of naphthaleneacetic acid (NAA) and 6-benzilaminopurine (BAP) were added to the MS (1962) culture-medium, totalizing four treatments. In the phase II, plants proceeding of the MS Treatment (without addition of vegetal regulators) were inoculated in environment containing or not polyamines (spermidine and/or spermine) totalizing four treatments. In the phase I the best results for mass production and shooting came out with the use of MS + 8,88 $\mu\text{mol L}^{-1}$ BAP + 5,36 $\mu\text{mol L}^{-1}$ NAA. The utilized treatments have not induced the rooting in the valued period. Plants submitted to treatments with spermidine or spermine presented emission of roots during the phase II, suggesting possible inductor effect when used by isolated means during the rooting. The combination of the two polyamines didn't became efficient during the rooting. No traces of oxidation were noted in the environment containing the polyamines. The use of spermidine in the culture-medium promoted a greater mass increasing and the most number of shoots was obtained with the use of the combination of spermidine and spermine.

Key words: polyamines, vegetal regulators, micropropagation, rooting.

INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais representa um recurso terapêutico amplamente difundido, sendo utilizado desde a antiguidade (Schmid, 1991). Entre as inúmeras plantas estudadas com potencial fitoterápico inclui-se o gênero *Aloe*, sendo a espécie *Aloe vera* (L.) Burm. (Liliaceae) a mais utilizada no emprego medicinal, tendo como sinonímia *A. barbadensis* Mill., conhecida como babosa de folhas grandes (Mattos, 2000).

Nos últimos anos, a demanda por parte das indústrias tem aumentado consideravelmente, porém a oferta de biomassa de *Aloe vera* não tem sido suficiente (Silva et al., 2000). A lentidão e o baixo rendimento em relação à multiplicação convencional são os principais fatores que contribuem para essa demanda freqüente (Silva & Debiasi, 2002).

Diversos estudos relatam o cultivo *in vitro* de *Aloe*, assim como o estabelecimento de protocolos, indução de calos e regeneração (Roy e Sarkar, 1991; Hirimburegama & Gamage, 1995), cultivo de ápices e perfilhamento (Chaudhuri & Mukundan, 2001), estabelecimento de protocolo de micropropagação com alta taxa de multiplicação (Silva & Debiasi, 2002; Liao et al, 2004). Nestes trabalhos os autores citam a eficiência dos reguladores utilizados, tais como auxinas e citocininas, em diferentes concentrações e combinações, objetivando a obtenção de plantas saudáveis e em grande número.

As poliaminas têm sido localizadas no vacúolo, mitocôndrias e cloroplastos e parecem estar envolvidas num grande número de processos bioquímicos nos vegetais. Rajam (1997) e Kumar et al. (1997) sugerem a atuação das poliaminas durante o crescimento e desenvolvimento celular, incluindo a estabilização das duplas hélices do DNA, divisão celular, desenvolvimento de órgãos, senescência foliar, amadurecimento de frutos, tuberização e respostas à mudanças ambientais. Poliaminas exógenas (putrescina, espermidina e espermina) em combinação com reguladores têm se mostrado eficientes na multiplicação de brotos e indução de raízes de diversas espécies vegetais (Davies e Olson, 1994; Mirza & Rehman, 1998; Tassoni et al., 2000).

Como a necessidade do mercado vem aumentando a demanda da produção de mudas, o objetivo deste trabalho foi de estudar a interação das poliaminas espermidina e espermina com auxina e citocinina, durante a micropropagação de *Aloe vera* (L.) Burm.

MATERIAL E MÉTODO

Plantas de *Aloe vera* L. Burm. cultivadas em condições de campo, no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), foram utilizadas como doadoras de explantes. Ápices caulinares oriundos de brotações laterais, com tamanho variando entre 0,5 a 1,0 cm de altura, foram retirados com auxílio de bisturi, lavados em água corrente e transferidos para erlenmeyer contendo água destilada. A desinfestação dos explantes foi realizada em câmara de fluxo laminar, utilizando solução de hipoclorito de sódio 30% (água sanitária comercial, contendo 2% de cloro ativo), onde permaneceram por 20 minutos, sendo em seguida submetidos a sucessivas lavagens em água destilada autoclavada e imersos em solução de álcool 70% durante 60 segundos, seguido de novas lavagens em água destilada autoclavada. O meio de cultura utilizado foi o Murashige & Skoog, 1962 (MS) acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de inositol, 1,0 mg L⁻¹ de tiamina e 6 g L⁻¹ de ágar, sendo o pH ajustado para 5,8 (com NaOH ou HCl) de acordo com os tratamentos (Tabela 1). O meio de cultura foi submetido a autoclavagem a 120°C e 1 atm de pressão durante 15 minutos. Os explantes foram inoculados (um explante por tubo) e transferidos para sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2°C, 85% U.R., fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 1000 lux.

O experimento foi dividido em duas fases. Na fase I diferentes concentrações de ácido naftalenoacético (NAA) e 6-benzilaminopurina (BAP) foram adicionados ao meio de cultura (Tabela 1), totalizando quatro tratamentos com 10 repetições, sendo cada repetição composta de quatro explantes, distribuídos em delineamento experimental em blocos casualizados. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. A Tabela 1 apresenta a composição do meio de cultura utilizado nos tratamentos durante a fase I.

Tabela 1. Composição do meio de cultura nos tratamentos durante a fase de obtenção de brotações (fase I).

Tratamentos	Composição do meio de cultura
T ₁	MS
T ₂	MS + 4,44 µmol L ⁻¹ BAP + 2,68 µmol L ⁻¹ NAA
T ₃	MS + 8,88 µmol L ⁻¹ BAP + 2,68 µmol L ⁻¹ NAA
T ₄	MS + 8,88 µmol L ⁻¹ BAP + 5,36 µmol L ⁻¹ NAA

Plantas provenientes do tratamento MS (sem adição de reguladores vegetais) da fase I, foram utilizadas na instalação do experimento da fase II, visando dessa forma a utilização de plantas desenvolvidas em meio isento de reguladores vegetais. Na fase II foram adicionadas as poliaminas espermidina (Spd) e espermina (Spm) ao meio de cultura (Tabela 2), e após definido o melhor tratamento da fase I (caracterização), adotou-se o mesmo balanço de reguladores na instalação de um dos tratamentos da fase II, totalizando quatro tratamentos com 5 repetições, cada repetição composta de 4 explantes, distribuídos em delineamento experimental, em blocos casualizados. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. A Tabela 2 apresenta a composição do meio de cultura utilizado nos tratamentos durante a fase II.

Tabela 2 . Composição do meio de cultura nos tratamentos (fase II).

Tratamentos	Composição do meio de cultura
T ₁	MS + 8,88 $\mu\text{mol L}^{-1}$ BAP + 5,36 $\mu\text{mol L}^{-1}$ NAA
T ₂	MS + 10,0 mmol.L^{-1} Spm
T ₃	MS + 10,0 mmol.L^{-1} Spd
T ₄	MS + 10,0 mmol.L^{-1} Spm + 10,0 mmol.L^{-1} Spd

A solução de poliaminas foi adicionada ao meio de cultura MS (Tabela 2) previamente autoclavado e resfriado (aproximadamente 45°C), com o auxílio de seringa descartável e filtros acopláveis MILLEX^R – Millipore, contendo poros de 0,22 μm , sendo este procedimento realizado em câmara de fluxo laminar. Posteriormente, o meio de cultura foi distribuído em frascos de vidro (268 mL de capacidade) previamente esterilizados, com 40 mL de meio em cada frasco. Após o resfriamento do meio de cultura foi realizada a inoculação, sendo colocada uma planta por frasco. Em seguida, foram transferidos para sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 85% U.R., fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 1000 lux, onde permaneceram por 30 dias, totalizando 120 dias do início do experimento.

Características avaliadas

Durante a fase I foram realizados três subcultivos, em intervalos de 30 dias cada, totalizando 90 dias. Avaliou-se o número de perfilhos (brotações laterais de plantas *in vitro*), contaminação fúngica e bacteriana, oxidação, enraizamento e porcentagem de plantas desenvolvidas.

Foram avaliados na fase II o número de perfilhos (brotações laterais de plantas *in vitro*), presença de raízes e também a massa fresca e massa seca da planta-mãe (explante inicial), perfilhos e rizomas produzidos.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Aos 30 dias da instalação do experimento realizou-se o primeiro subcultivo, ou seja, transferência das plantas para novos meio de cultura de acordo com os tratamentos e foram avaliados o número de explantes contaminados por fungos, bactérias e oxidação, número de perfilhos (brotações laterais), enraizamento e porcentagem de plantas desenvolvidas.

Observou-se taxa média de sobrevivência de 91,87%, com a ocorrência de pequeno número de explantes contaminados por fungos (1,87%), bactérias (3,12%) ou oxidados (3,12%), o que evidencia a eficiência do método de assepsia utilizado. Mesmo utilizando tempo de imersão em solução de hipoclorito de sódio inferior ao utilizado por Silva & Debiasi (2002), a taxa de sobrevivência foi próxima a encontrada pelos autores, que utilizando ápices caulinares de *Aloe vera* L. em solução de hipoclorito de sódio 40% (20 minutos) e solução de álcool 70% (1 minuto) obtiveram taxa de sobrevivência de 93,33%.

O tempo de imersão aos quais os explantes foram submetidos buscou minimizar possíveis efeitos de oxidação, problema freqüentemente encontrado no isolamento de explantes. O tempo de exposição na solução de hipoclorito de sódio, agressivo aos tecidos vegetais, pode favorecer o escurecimento promovido pela oxidação de compostos fenólicos (Mógor et al., 1999).

Para *Aloe polyphylla*, o uso de álcool 70% por dois minutos, seguido de hipoclorito de sódio 1% por 10 minutos, foi eficiente para desinfestação das sementes inoculadas *in vitro*, resultando em plantas sadias sem sintomas de oxidação (Abrie & van Staden, 2001).

Aos 30 e 60 dias os perfilhos não foram destacados da planta-mãe (explante inicial), buscando-se otimizar o procedimento de transferência para novos meios de cultura e com isso, evitar a desidratação dos tecidos, que apresentavam-se tenros, além de possíveis danos que poderiam

promover algum tipo de estresse. Aos 30 dias do início do experimento, foi observado princípio de formação de rizoma em todos os tratamentos, os quais apresentavam-se escurecidos, isto é, oxidados. Tal observação também contribuiu para que os perfilhos não fossem destacados do explante inicial, evitando dessa forma a excisão do rizoma no momento do subcultivo, fato que poderia acentuar a oxidação, como verificado em experimentos prévios.

Plantas de *Aloe* são ricas em compostos fenólicos que afetam o crescimento de culturas *in vitro* e causam o escurecimento do explante e do meio circunvizinho e esse escurecimento parece ser o fator limitante para o estabelecimento de cultura de tecidos de espécies de *Aloe*. O uso de reguladores, tais como N-6-benziladenina (BA), cinetina (KIN), thidiazuron (TDZ), ácido 3-indolilacético (IAA), sozinhos ou em combinação com 2.4 D, foram relatados por aumentar o escurecimento em culturas de *Aloe* (Abrie & van Staden, 2001). O uso de antioxidantes no meio de cultura é comum na micropropagação, tais como polivinilpirrolidona (PVPP), 1.4 dítio-DL-treitol (DTT), entre outros. Em trabalhos com *Aloe vera*, Roy & Sarkar (1991) utilizaram polivinilpirrolidona (PVP) e notaram diminuição no escurecimento promovido por oxidação de fenóis. Neste trabalho foi observado escurecimento em volta dos rizomas formados, assim como na base e nos rizomas dos explantes, contudo, este fato, aliado à freqüente troca de meio parece não ter alterado o crescimento, quando comparados com plantas que não mostraram oxidação, apesar da relação inversa entre alguns tipos de fenóis e crescimento ser descrito na literatura por alguns autores (Mader & Hanke, 1997).

Aos 90 dias, os perfilhos referentes ao tratamento sem adição de reguladores vegetais (Tratamento MS), foram destacados do explante inicial e utilizados na instalação do experimento da fase II. Na Tabela 3 verifica-se a média do número de perfilhos, nos três subcultivos.

Tabela 3. Fase I – Média do número de perfilhos nos tratamentos, aos 30, 60 e 90 dias da instalação do experimento.

Tratamentos	n ^o perfilhos 30 dias	n ^o perfilhos 60 dias	n ^o perfilhos 90 dias
T1 (MS)	2,39 b	2,85 d	3,34 c
T2 (MS+ 4,44 µmol L ⁻¹ BAP + 2,68 µmol L ⁻¹ NAA)	2,44 b	3,12 c	4,31 b
T3 (MS + 8,88 µmol L ⁻¹ BAP + 2,68 µmol L ⁻¹ NAA)	2,46 b	3,52 b	4,35 b
T4 (MS + 8,88 µmol L ⁻¹ BAP + 5,36 µmol L ⁻¹ NAA)	3,35 a	4,35 a	5,35 a
cv%	7,54	2,77	4,15

As médias seguidas de mesma letra na vertical não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Na primeira avaliação (aos 30 dias), o tratamento MS + 8,88 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de BAP + 5,36 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de NAA apresentou maior perfilhamento, com média de 3,35 perfilhos por explante inicial. Os demais tratamentos não apresentaram diferença estatística aos 30 dias. O tratamento 1, considerado controle, como demonstrado em todos os subcultivos, apresentou o menor perfilhamento, o que ressalta a importância dos reguladores vegetais na micropropagação de *Aloe vera*.

Resultados semelhantes foram observados aos 60 e 90 dias, isto é, maior número de perfilhos foi obtido quando se utilizou a combinação de 8,88 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de BAP com 5,36 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de NAA. Esses resultados evidenciam maior perfilhamento à medida que a concentração de BAP aumenta.

O efeito benéfico do N-6-benziladenina (BA), uma citocinina com ação semelhante ao 6-benzilaminopurina (BAP), na multiplicação de brotos de plantas do gênero *Aloe* tem sido descrita na literatura por diversos autores (Natali et al., 1990; Richwine et al., 1995; Abrie & van Staden, 2001). Silva & Debiasi (2002) utilizaram como fonte de explantes gemas apicais, oriundas de plântulas de *Aloe vera* cultivadas *in vitro* em meio de cultura MS acrescido de 4,44 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de BAP e obtiveram como resultado 3,5 brotos por explante inicial, aos 30 dias de cultivo, semelhante ao encontrado no presente trabalho.

A combinação BAP (6,67 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e NAA (4,03 $\mu\text{mol L}^{-1}$) durante a micropropagação de *A. vera* de 16 genótipos de procedências diferentes, induziu aumento do número de perfilhos, sendo que aos 35 dias, a média de 1:2 foi obtida, embora tenha ocorrido a formação de até 1:8 (Silva et al., 2000). Liao et al. (2004) relataram taxa de multiplicação máxima de 1:15 em 4 semanas, utilizando meio de cultura MS semi-sólido com 2,0 mg L^{-1} de BA e 0,3 mg L^{-1} de NAA, na micropropagação de *Aloe vera* L. var. chinensis.

Os tratamentos utilizados não induziram o enraizamento no período avaliado. Segundo Silva et al. (2000), o processo de rizogênese em *Aloe vera* mostrou-se dependente do tempo de cultivo e sugerem que a indução à rizogênese *in vitro* parece estar associada ao esgotamento gradativo dos nutrientes no meio de cultura, indicando tempo médio de cultivo de 45 dias. Abrie & van Staden (2001) relatam que plantas de *Aloe polyphylla* cultivadas em meio com baixa concentração de BA enraizaram algumas vezes espontaneamente, mas não atribuem este resultado ao efeito do regulador ou mesmo sua concentração.

Na instalação do experimento na fase II foram utilizadas apenas as plantas oriundas do tratamento MS (controle), objetivando evitar o possível efeito residual dos reguladores vegetais utilizados na fase I. O tratamento 1 da fase II consistiu na repetição do mesmo balanço hormonal

considerado como sendo o melhor tratamento da fase I (caracterização). Aos demais tratamentos foram adicionadas poliaminas exógenas (espermidina e espermina), com o objetivo de avaliar possíveis alterações proporcionadas pela adição dessas substâncias.

Na Tabela 4 encontram-se os resultados obtidos para massa fresca e número de perfilhos, nos diferentes tratamentos aplicados em *Aloe vera*.

Tabela 4 . Massa fresca (planta-mãe, perfilhos e rizomas) e média dos perfilhos das plantas de *Aloe vera* (L.) Burm., aos 30 dias na fase II, 120 dias do início do experimento.

	T1	T2	T3	T4	
	BAP + NAA	Spm	Spd	Spm + Spd	cv %
Massa fresca da planta-mãe	2,19 a	2,04 a	2,65 a	2,51 a	15,55
Massa fresca dos perfilhos	1,00 b	1,54 ab	1,92 a	1,74 a	20,36
Massa fresca do rizoma	0,96 b	0,80 b	1,52 a	1,76 a	22,01
Número de perfilhos	3,75 c	2,12 d	6,75 b	8,50 a	16,01

As médias seguidas de mesma letra na horizontal não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Os tratamentos não influenciaram significativamente a produção de massa fresca da planta-mãe, por outro lado, afetou a produção de massa fresca dos perfilhos, sendo as maiores médias encontradas no tratamento contendo espermidina. A maior média da massa fresca dos rizomas foi encontrada no tratamento contendo a combinação das duas poliaminas, porém não diferiu significativamente do tratamento contendo somente espermidina, evidenciando que a presença dessa poliamina no meio tende a incrementar a massa fresca de *Aloe* “in vitro”.

Quanto ao número de perfilhos, o tratamento contendo a combinação de espermidina e espermina diferiu estatisticamente dos demais, sugerindo que a associação destas poliaminas apresentam efeito positivo sobre a emissão de perfilhos. Neste caso, nota-se também que o número de perfilhos foi alto também no tratamento contendo apenas espermidina como fonte de poliamina,

indicando possivelmente que essa substância quando usada exogenamente tende a promover maior divisão e crescimento celular nesta planta.

Na ausência de poliaminas exógenas o resultado foi similar em relação ao perfilhamento encontrado aos 30 dias da instalação do experimento na fase I, ou seja, média de 3,35 perfilhos por explante inicial, utilizando a mesma concentração de reguladores vegetais. Esse resultado demonstra que o tipo de explante utilizado não interferiu no número de perfilhos, pois enquanto a fase I utilizou ápices caulinares oriundos de plantas cultivadas *in vivo* (em condições de campo), na fase II utilizou-se plantas estabelecidas *in vitro*. Assim, nestas análises, a adição de espermidina ao meio de cultura mostrou-se eficiente na micropropagação de *Aloe vera* e representa uma alternativa mais econômica em relação ao uso em associação com a espermina.

Poliaminas exógenas em meio de cultura de plantas, representa um método simples de elevar os níveis endógenos de poliaminas e geralmente, tendem a promover o crescimento. A adição de espermina promove aumento do conteúdo de DNA em células embriogênicas de cenoura (Takeda et al., 2002) e aumenta o alongamento e crescimento em pinheiros (Rajasekaram & Blake, 1998).

Espermidina exógena, assim como putrescina e agmatina, têm sido descritas por estimularem desenvolvimento e crescimento de microplântulas de morango, sugerindo que essas substâncias podem ser um fator de crescimento (Tarenghi et al., 1995). Outros autores também correlacionam a presença de espermina e crescimento em calos (Sarjala et al., 1997).

Na Tabela 5 verifica-se o efeito dos tratamentos sobre a produção de massa seca ao final da fase II.

Tabela 5. Massa seca da planta-mãe, perfilhos e rizomas das plantas de *Aloe vera* (L.) Burm., aos 30 dias na fase II, 120 dias do início do experimento.

	T1	T2	T3	T4	
	BAP + NAA	Spm	Spd	Spm + Spd	cv %
Massa seca da planta-mãe	0,15 ab	0,12 b	0,15 ab	0,18 a	20,80
Massa seca do rizoma	0,11 b	0,08 b	0,16 a	0,16 a	17,86
Massa seca dos perfilhos	0,06 b	0,05 b	0,10 a	0,11 a	22,18

As médias seguidas de mesma letra na horizontal não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A média da massa seca da planta-mãe (Tabela 5) não diferiu estatisticamente nos tratamentos, mas nota-se a tendência de aumento na presença de espermidina. Quanto a massa seca do rizoma e dos perfilhos, os tratamentos 3 (MS + Spd) e 4 (MS + Spm + Spd) não diferiram estatisticamente, mas apresentaram maior média.

Espermidina teve um papel importante na indução de perfilhos e aumento de massa em *Aloe vera* no presente trabalho, diferente do encontrado por Trindade & Pais (2003) quando estudaram cultura de tecidos de *E. globulus* e do descrito por Arezi et al. (2000) que analisaram os níveis de poliaminas endógenas e não encontraram correlação com formação de agregados meristemáticos em *E. camaldulensis*.

A partir desses resultados, nota-se que o efeito exógeno das poliaminas espermidina e espermina foi positivo no crescimento e perfilhamento. O efeito estimulante no crescimento e formação de brotos por poliaminas exógenas tem sido comprovado e recomendado por diversos autores (Nas, 2004).

Foi notado nesta fase do trabalho poucos indícios de oxidação em plantas ou no meio contendo poliaminas. Escurecimento acentuado foi observado apenas no controle, o que foi contornado com as trocas freqüentes de meio de cultura e parece não ter influenciado no desenvolvimento das plantas. O escurecimento de tecidos ou do meio de cultura podem gerar danos celulares. As poliaminas, principalmente putrescina e espermidina, foram descritas por diminuir ou amenizar os danos celulares causados por estresse oxidativo (escurecimento) (Tang et al., 2004) e provavelmente, neste trabalho, o bom desenvolvimento encontrado pode ser atribuído à efetividade das poliaminas contra os possíveis danos oxidativos (proteção de membranas, redução de peroxidação de lipídeos, prevenção de formação de radicais livres) (Walters, 2003; Cowley & Walters, 2002; Mackintosh et al., 2001), além de sua ação no crescimento como descrito por diversos autores (Bouchereau et al., 1999; Silveira et al., 2004).

As plantas submetidas aos tratamentos com espermidina ou espermina apresentaram emissão de raízes durante a fase II, sugerindo possível efeito indutor das poliaminas, quando usadas isoladamente, pois o tratamento contendo a combinação das duas substâncias não apresentou desenvolvimento de raízes, em contrapartida, a associação entre espermidina e espermina promoveu aumento no perfilhamento. Nag et al. (2001) relatam que putrescina endógena e IAA aumentaram tanto na indução de raízes como na fase de iniciação, enquanto que os teores de espermidina e espermina não apresentaram mudanças significativas nessas fases, em *Vigna radiata* L.. De acordo

com Friedman et al. (1982) a aplicação de poliaminas exógenas não induz a formação de raízes, diferente do relato de diversos autores que mostram a possível essencialidade na rizogênese de diversas espécies vegetais (Sena & Castro, 1996; Kumar et al., 1997; Bais & Ravishankar, 2002; Neves et al., 2002).

Agazio & Zacchini (2001) descreveram a redução do enraizamento e acúmulo de putrescina e espermidina, o qual foi revertido quando usaram dimetiluréia (DMTU) e atribuem este fato à formação de peróxidos gerados pela ação de poliaminaoxidase, durante a oxidação de espermidina e afirmam que espermidina exógena seria prejudicial ao processo de formação de raízes. Lee (1997), em trabalho com arroz, também observou que a aplicação de espermidina ou espermina inibiram o alongamento das raízes. Neste trabalho, espermidina e espermina podem ter estimulado a rizogênese em *Aloe vera*, como também encontrado em trabalho de Tang et al. (2004).

Conclusão

O uso de espermidina ou espermina durante a micropropagação de *Aloe vera* (L.) Burm. promoveu bom desenvolvimento das plantas e indução à rizogênese. A aplicação isolada de espermidina mostrou-se eficiente no perfilhamento. A associação das duas poliaminas não induziu a rizogênese, porém promoveu incremento no perfilhamento.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ABRIE, A.L., van STADEN, J. Micropropagation of the endangered *Aloe polyphylla*. **Plant Growth Regulation**, v.33, p. 19-23, 2001.
- AGAZIO, M., ZACCHINI, M. Di methyl-thiowea, a hidrogen peroxidase trap, partially presents stress effects and ascorbate peroxidase increase in spermidine-treated maize roots. **Plant Cell on Environment**, v.24, p.237-244, 2001.
- AREZI, O., BOXUS P., KEVERS C., Gaspar, T. Hormonal control of proliferation in meristematic agglomerates of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. **In Vitro Cell Development Biology Plant**, v.36, p.398-401, 2000.
- BAIS, H.P., RAVISHANKAR, G.A. Role of polyamines in the ontogeny of plants and their biotechnological applications. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.69, p.1-34, 2002.
- BOUCHEREAU, A., AZIZ, A., LARHER, F., TANGUY, J.M. Polyamines and environmental challenges: recent development. **Plant Science**, v.140, p.103-25, 1999.
- CHAUDHURY, S., MUKUNDAN, U. *Aloe vera* L.- micropropagation and characterization of its gel. **Phytomorphology**, p. 155-57, 2001.
- COWLEY, T.; WALTERS, D.R. Polyamine metabolism in barley reacting hypersensitively to the powdery mildew fungus *Blumeria graminis* f.sp. *hordei*. **Plant, Cell & Environment**, v.25, p.461-68, 2002.
- DAVIS, D.G.; OLSON, P.A. Effects of putrescine and inhibitors of putrescine biosynthesis on organogenesis in *Euphorbia esula* L. **In Vitro Cellular and Development Biology Plant**, v. 30, p. 124-130, 1994.

- FRIEDMAN, RA' A., ALTMAN, A., BACHRACH, U. Polyamines and root formation in mung bean hypocotyl cuttings. **Plant Physiology**, v. 70 (3), p. 844-848, 1982.
- HIRIMBUREGAMA, K., GAMAGE, N. In vitro multiplication of Aloe vera meristem tips for mass propagation. **Horticultural Science**, p.15-18, 1995.
- KUMAR, A., ALTABELA, T., TAYLOR, M., TIBURCIO, A. Recent advance in polyamine research. **Trends Plant Science**, v.2, p.124-30, 1997.
- LEE, T.M. Polyamine regulation of growth and chilling tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) roots cultured in vitro. **Plant Science**, v. 122, p.111-117, 1997.
- LIAO, Z., CHEN, M., TAN, F., SUN, X., TANG, K. Micropropagation of endangered Chinese aloe. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.76, n.2, p.83-6, 2004.
- MACKINTOSH, C.A., SLATER, L.A., WALTERS, D.R. Synthesis of six novel N,N-dialkyl derivatives of spermidine and effects on growth of the fungal plant pathogen *Pyrenophora avenae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 202, p.221–25, 2001.
- MADER, J.C., HANKE, D.E. Polyamine sparing may be involved in the prolongation of cell division due to inhibition of phenyl propanoid synthesis in cytokinin-starved soybean cells. **Journal of Plant Growth Regulation**, v.16, p.89-93, 1997.
- MATTOS, F.J.A. Plantas medicinais, guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil, 2 ed. Fortaleza: **Imprensa Universitária UFC**, 2000, 346p.
- MIRZA, J.I., REHMAN, A. A spermine-resistant mutant of *Arabidopsis thaliana* displays precocious germination. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.20, p.235-40, 1998.

- MÓGOR, G., LIMA, G.P.P., PIZA, I.M.T., VILHENA, S.M.C. Efeito da benzilaminopurina (BAP) na propagação “in vitro” de yacon (*Polymnia sonchifolia* Poep. Endl.). **Acta Biologica Leopoldensia**, v.21, p.195-201, 1999.
- MURASHIGE, T. , SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473 – 97, 1962.
- NAG, S., SAHA, K., CHOUDHURI, M.A. Role of auxin and polyamines in adventitious root formation in relation to changes in compounds involved in rooting. **Journal of Plant Growth Regulation**, v.20, p. 182-194, 2001.
- NAS, M.N. Inclusion of polyamines in the medium improves shoot elongation in halznut (*Coryllus avellana* L.) micropropagation. **Turkian Journal of Agriculture**, v.28, p.189-194, 2004.
- NATALI, L., SANCHEZ, I.C., CAVALLINI, A. In vitro culture of *Aloe barbadensis* Mill: Micropropagation from vegetative meristems. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.20, p.71-71, 1990.
- NEVES, C., SANTOS, H., VILAS-BOAS, L., AMÂNCIO, S. Involvement of free and conjugated polyamines and free amino acids in the adventitious rooting of micropropagated cork oak and grapevine shoots. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.40, p.1071-80, 2002.
- RAJAM, M.V. Polyamines. In: PRASAD, M.N.V. (Ed.). **Plant ecophysiology**. New York: J.Wiley, p.343-74, 1997.
- RAJASEKARAM, L.R., BLAKE, T.J. Early growth of jack pine seedlings by natural plant growth regulators. **Tree Physiology**, v.12, p.420-23, 1998.
- RICHWINE,A.M., TIPTON, J.L., THOMPSON, G.A. Establishment of *Aloe*, *Gasteria* and *Haworthia* shoot cultures from inflorescence explants. **HortScience**, v.30, p.1443-44, 1995.

- ROY, S.C., SARKAR, A. In vitro regeneration and micropropagation of *Aloe vera* L. **Scientia Horticulturae**, p. 107-13, 1991.
- SARJALA, T., HAGGMAN, H., ARONEN, T. Effects of exogenous polyamines and inhibitors on growth and free polyamines of embryogenic *Scott pine* callus. **Journal of Plant Physiology**, v.150, p.597-602, 1997.
- SCHIMID, R. An old medicinal plant: *Aloe vera*. **Parfümerie und Kosmetik**, v. 72, n. 3, p. 146-150, 1991.
- SENA, J.O.A., CASTRO, P.R.C. Poliaminas: aspectos fisiológicos e importância para as plantas. 1996, 41 p. (**Apontamentos, 46**).
- SILVA, J.M.O.D., ARAÚJO, P.S., NECKEL, C.A., IANSSEN, C., OLTRAMARI, A.C., PASSOS, R., TIEPO, E., BACH, D.B., MARASCHIN, M. Micropropagação de babosa. In: **Farmápolis**, 2000. Florianópolis: Sindfar, 2000.
- SILVA, C.G.; DEBIASI, C. Propagação massal de mudas de *Aloe vera* L. (babosa) via clonagem in vitro. **Programa de Incentivo a Pesquisa da Universidade Regional de Blumenau**, 2002, 62 p.
- SILVEIRA, V., FLOH, E.I.S., HANDRO, W., GUERRA, M.P. Effect of plant growth regulators on the cellular growth and levels of intracellular protein, starch and polyamines in embryogenic suspension cultures of *Pinus taeda*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v 76, p.53-60, 2004.
- TAKEDA, T., HAYAKAWA, F., OE, K., MATSUOKA, H. Effect of exogenous polyamines on embryogenic carrot cells. **Biochemical Engineering Journal**, v.12, p.21-28, 2002.

TANG, W., NEWYON, R.J., OUTHAVONG, V. Exogenously added polyamines recover browning tissues into normal callus cultures and improve plant regeneration in pine. **Physiologia Plantarum**, v. 122, p.386-395, 2004.

TARENGHI, E.; CARRÉ, M.; MARTIN-TANGUY, J. Effect of inhibitors of polyamine biosynthesis of polyamine on strawberry microcutting growth and development. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.42, p.47-55, 1995.

TASSONI, A., von BUUREN, M., FRANCESCHETTI, M., FORNALE, S., BAGNI, N. Polyamine content and metabolin in *Arabidopsis thaliana* and effect of spermidine on plant development. **Plant Physiology Biochemistry**, v.36, p.383-93, 2000.

TRINDADE, H., PAIS, M.S. Meristematic nodule culture: a new pathway for in vitro propagation of *Eucalyptus globules*. **Trees - Structure and Function**, v.17, p.308-315, 2003.

WALTERS, D.R. Polyamines and plant disease. **Phytochemistry**, v.64, p. 97–107, 2003.

6 – CAPÍTULO II

COMPOSTOS FENÓLICOS E PEROXIDASE EM *Aloe vera* (L.) Burm. (BABOSA) MICROPROPAGADA

II– Poliaminas, fenóis e peroxidase em *Aloe vera* (L.) Burm. micropropagada

Gilda Mógor¹, Giuseppina Pace Pereira Lima²

¹Universidade Estadual Paulista – UNESP, Pós-Graduanda do Programa de Ciências Biológicas (Botânica) do Departamento de Química e Bioquímica, Instituto de Biociências, CP 510, CEP 18.618-000, Botucatu, SP.

Tel: (14) 3811-6255 e-mail: mogor@terra.com.br

² Universidade Estadual Paulista – UNESP, Profa. Dra. do Departamento de Química e Bioquímica, Instituto de Biociências, CP 510, CEP 18.618-000, Botucatu, SP.

Tel: (14) 3811-6255 e-mail: gpplima@ibb.unesp.Br

RESUMO: Brotações laterais de plantas de *Aloe vera* (L.) Burm. cultivadas *in vitro*, por 90 dias, subcultivadas a cada 30 dias, sem adição de reguladores vegetais, foram inoculadas em meio de cultura MS contendo ou não espermina e/ou espermidina. Após 30 dias de cultivo, as plantas foram submetidas às análises bioquímicas, comparadas entre si e com plantas micropropagadas com 90 dias de cultivo *in vitro* em meio contendo BAP e NAA (denominadas caracterização), bem como com plantas matrizes (*in vivo*). Nas análises bioquímicas foram avaliados os níveis de poliaminas livres, fenóis totais solúveis, flavonóides totais solúveis e atividade da peroxidase. A aplicação exógena de espermina e espermidina promoveu grande número de perfilhos, bem como aumento no teor de putrescina e flavonóides. Putrescina apresentou as alterações mais significativas, podendo ser utilizada como marcadora de morfogênese em *Aloe vera* micropropagada. Tecidos em ativo crescimento apresentaram alta atividade de peroxidase, assim como aqueles com maior taxa de oxidação. Nestes tecidos também ocorreu maior teor de flavonóides totais. A ação conjunta das poliaminas mostrou-se benéfica para o perfilhamento.

Palavras-chave: poliaminas, compostos fenólicos, peroxidase, micropropagação.

MÓGOR, G. Phenolic compounds and peroxidase in *Aloe vera* (L.) Burm. (babosa) micropropagated .

II– Polyamines, phenols and peroxidase in *Aloe vera* (L.) Burm. micropropagated.

Gilda Mógor¹, Giuseppina Pace Pereira Lima²

¹ São Paulo Estate University (UNESP), Pós-Graduator of the Biological Science Programme (Botanic) of the Chemical and Bio-Chemical Department, Bioscience Institute, CP 510, CEP 18.618-000, Botucatu, SP.

Tel: (14) 3811-6255 e-mail: mogor@terra.com.br

² São Paulo Estate University (UNESP), Profa. Dra. of the Chemical and Bio-Chemical Department, Bioscience Institute, CP 510, CEP 18.618-000, Botucatu, SP.

Tel: (14) 3811-6255 e-mail: gpplima@ibb.unesp.Br

Abstract:

Lateral shoots of the *Aloe vera* (L.) Burm. cultivated *in vitro*, without addition vegetal regulators, with 90 days, were inoculated in MS culture-medium, containing or not spermine and/or spermidine. After 30 days of cultivation, the plants were submitted to biochemical analysis, together with micropropagated plants with 90 days of cultivation *in vitro* (denominated as characterization) and matrix plants (*in vivo*). In the biochemical analysis were evaluated the levels of free polyamines, total phenols, total flavonoids and the activity of peroxidase. The exogene application of spermidine promoted large number of shoots. Spermidine and spermine in association promoted an increase in the putrescine contents and a greater shooting, beyond a greater fresh mass and larger content of phenols and flavonoids. The putrescine presented the most significant alterations, enabling to be utilized as marker of morfogenesis in the micropropagated *Aloe vera*. Tissues in active growth have presented high activity of peroxidase, as well as those with greater rate of oxidation. In these tissues also occurred greater contents of total flavonoids, indicating the necessity of antioxidative compounds. The joint action of polyamines seemed to be benefic for the shooting of micropropagated *Aloe vera*.

Key-words: polyamines, compostos phenolics, peroxidase, micropropagation

INTRODUÇÃO

Os vegetais têm capacidade quase ilimitada de sintetizar substâncias, que em muitos casos, são utilizadas como defesa contra microrganismos, insetos e herbívoros (Dempsey et al., 1993) e que servem de modelo para a síntese de inúmeros medicamentos, sendo que grande parte dos compostos secundários já isolados de plantas medicinais ainda está para ser estudado quanto às suas atividades biológicas (Stangarlin et al., 1999). Neste sentido, diversos estudos têm sido realizados na tentativa de se obter fármacos em plantas com potencial fitoterápico, acompanhado de um significativo aumento nos investimentos em pesquisa. O problema maior é o material vegetal, o qual, devido à grande procura, pode se tornar escasso e ainda, a dependência da planta do campo pode ser um entrave na produção destes fitoterápicos.

A cultura de tecidos vegetais tem sido freqüentemente usada como um modelo para estudar desenvolvimento, assim como dos metabólitos presentes, devido maior facilidade de obtenção das plantas, quando estabelecido um protocolo (Arnaldos et al., 2001). Substâncias como poliaminas têm sido utilizadas amplamente no cultivo *in vitro*, juntamente com reguladores vegetais, principalmente as auxinas e citocininas. A adição de poliaminas ao meio de cultura tem mostrado efeito estimulador de crescimento em várias plantas (Scott et al., 1998), estando envolvidas na regulação do crescimento, divisão e diferenciação celular (Rajam, 1997). Durante os últimos anos, tem sido relatadas como eficientes antioxidantes em sistemas experimentais, exercendo este efeito através da proteção de componentes celulares, tais como membranas, ácidos nucléicos e ácidos graxos poli-insaturados, de danos oxidativos (Lovaas, 1991; Lovaas, 1996). As poliaminas e outros reguladores vegetais podem modular eventos morfogênicos (Altamura et al., 1993).

A espécie *Aloe vera* (L.) Burm. (Liliaceae), também conhecida como babosa e tendo como sinonímia *A. barbadensis* Mill., apresenta baixo rendimento no campo (Siva et al., 2000) e a micropropagação poderia ser um método eficaz de produção de plantas (Hu et al., 2003). Diversos compostos tem sido identificados em extratos de *Aloe vera*, incluindo polissacarídeos e flavonóides (Lee et al., 2000; Zhang et al., 2001).

Os compostos fenólicos podem participar de reações de manutenção do nível adequado de reguladores, essenciais para os diversos eventos morfogenéticos (Cvikrová et al., 1998). O papel dos fenólicos tem sido extensivamente estudados nos últimos anos, estando correlacionando entre as diversas ações, no controle do crescimento, já que a relação crescimento e acúmulo de alguns destes

compostos é igualmente inversa (Mader & Hanke, 1997) e podem agir como inibidores. Alguns deles podem promover aumento na taxa de crescimento (Li et al., 1993) e prolongar a ação das auxinas por inibir a ação do ácido 3-indolilacético (IAA) (Krylov et al., 1994). Outra importância relatada aos compostos fenólicos é o estudo da atividade dos flavonóides, os quais desempenham importante papel na saúde humana. As propriedades dos flavonóides são conhecidas nos processos anti-oxidativos, anti-microbianos, anti-mutagênicos e anti-carcinogênicos (Awad et al., 2000). Levando em consideração esses fatores, tornam-se relevantes os estudos sobre as fontes naturais de flavonóides (Oliveira et al., 1999).

As peroxidases são enzimas que participam de reações oxidativas e estão relacionadas com o controle da auxina endógena (Pedreño et al., 1990). Peroxidases tem sido usadas por diversos autores, assim como as poliaminas, como marcadoras bioquímicas de eventos morfogênicos em plantas cultivadas “in vitro” (Lima et al., 1999; Lima et al., 2003).

Assim, como as poliaminas podem atuar em diversas rotas metabólicas, este trabalho objetivou estudar a participação da espermidina e espermina nos mecanismos de formação de compostos fenólicos, incluindo os flavonóides e na atividade da peroxidase.

MATERIAL E MÉTODO

O material vegetal utilizado (brotações laterais de plantas de *Aloe vera* (L.) Burm. cultivadas *in vitro*, sem adição de reguladores vegetais, com 90 dias, foi inoculado em meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de inositol, 1,0 mg L⁻¹ de tiamina e 6,0 g L⁻¹ de ágar, contendo 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido alfa-naftalenoacético (NAA) ou poliaminas espermidina (Spd) e espermina (Spm) e mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2°C, 85% U.R., fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 1000 lux. A solução de poliaminas foi adicionada ao meio de cultura MS, previamente autoclavado e resfriado (aproximadamente 45°C), com o auxílio de seringa descartável e filtros acopláveis MILLEX^R – Millipore, contendo poros de 0,22 µm, sendo este procedimento realizado em câmara de fluxo laminar. Posteriormente, o meio de cultura foi distribuído em frascos de vidro (268 mL de capacidade) previamente esterilizados, com 40 mL de meio em cada frasco. Após o resfriamento completo do meio de cultura foi realizada a inoculação, sendo colocada uma planta por frasco. Após a distribuição das plantas nos quatro tratamentos, contendo 5 repetições (cada repetição composta de 4 explantes), os frascos foram distribuídos em delineamento experimental em blocos casualizados, com fotoperíodo de 16 horas, intensidade luminosa de 1000 lux, por 30 dias. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Posteriormente, as plantas foram submetidas às análises bioquímicas, juntamente com plantas micropropagadas (90 dias de cultivo *in vitro*, denominadas caracterização) e plantas matrizes (*in vivo*), perfazendo 6 tratamentos com 4 repetições, distribuídos em delineamento experimental em blocos ao acaso, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância (Tabela 1). As plantas referentes aos 90 dias de cultivo *in vitro* (caracterização), foram obtidas através da inoculação de ápices caulinares oriundos de brotações laterais de plantas *in vivo* (cultivadas em condições de campo, no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Os ápices caulinares foram inoculados em meio de cultura (MS + 8,88 µmol L⁻¹ de BAP + 5,36 µmol L⁻¹ de NAA), o qual, a partir de experimentos prévios, mostrou ser o melhor meio indutor de organogênese na espécie estudada. Nesta época, essas plantas foram analisadas quanto aos teores de poliaminas endógenas livres, flavonóides totais solúveis, fenóis totais solúveis e atividade da peroxidase.

Para as análises bioquímicas (poliaminas livres, flavonóides totais solúveis, fenóis totais solúveis e atividade da peroxidase), as plantas micropropagadas com 90 dias em meio MS acrescido de BAP e NAA e aquelas com 120 dias (90 dias em meio MS sem adição de reguladores e cultivadas por 30 dias em meio contendo ou não as poliaminas espermidina e espermina), foram separadas em planta-mãe (explante inicial), perfilhos e rizomas, enquanto as plantas matrizes (oriundas do campo) foram separadas em epiderme e rizomas. Nas plantas matrizes o gel (mucilagem) não foi utilizado nas análises, enquanto as micropropagadas foram utilizadas inteiras, ou seja, sem separação da epiderme com o gel, devido a grande dificuldade de separação. As análises realizadas na epiderme da planta matriz (*in vivo*) foram comparadas com a planta-mãe (explante inicial com 90 dias de cultivo) e com as que receberam tratamentos (ausência ou presença de espermidina e/ou espermina por mais 30 dias, 120 dias de cultivo). Essas análises também foram realizadas nos respectivos rizomas. A análise dos perfilhos foram feitas apenas nas plantas micropropagadas, tanto com 90 dias, como com 120 dias de cultivo *in vitro*.

Tabela 1. Tratamentos submetidos às análises bioquímicas.

Tratamentos	
T ₁ (plantas <i>in vivo</i>)	Plantas Matrizes
T ₂ (90 dias <i>in vitro</i>)	MS + 8,88 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de BAP + 5,36 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de NAA (caracterização)
T ₃ (120 dias <i>in vitro</i>)	MS + 8,88 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de BAP + 5,36 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de NAA
T ₄ (120 dias <i>in vitro</i>)	MS + 10,0 mmol.L^{-1} Spm
T ₅ (120 dias <i>in vitro</i>)	MS + 10,0 mmol.L^{-1} Spd
T ₆ (120 dias <i>in vitro</i>)	MS + 10,0 mmol.L^{-1} Spm + 10,0 mmol.L^{-1} Spd

Nas análises bioquímicas foram avaliados os níveis de poliaminas, fenóis totais solúveis, flavonóides totais solúveis e atividade da peroxidase, em plantas micropropagadas com 120 dias de cultivo *in vitro* (com adição de auxina e citocinina ou poliaminas exógenas), plantas micropropagadas com 90 dias de cultivo *in vitro* (caracterização) e plantas matrizes (*in vivo*).

Teor de Poliaminas livres

A análise foi realizada de acordo com o método de Flores & Galston (1982) modificado por Lima (1994). Amostras de material fresco (planta-mãe, perfilhos e rizomas) de plantas micropropagadas e amostras da planta matriz (epiderme e rizomas) foram pesadas e homogeneizadas em ácido perclórico 5% gelado e centrifugadas durante 20 minutos a 4°C. Alíquotas foram transferidas para tubo de ensaio, juntamente com cloreto de dansila (diaminophthylsulfônico-Cl)-(5 mg mL⁻¹ de acetona) e de solução de Na₂CO₃ saturado. Foram adicionados 100µL de prolina e os tubos após agitação foram mantidos por 30 minutos no escuro. Em seguida, 500µL de benzeno foram adicionados e os tubos novamente agitados. Alíquotas da fase orgânica foram retiradas e submetidas à cromatografia de camada delgada.

As placas empregadas (20 x 20 cm de 500µde espessura, recobertas com camada de sílica gel 60G), foram ativadas a 100°C por 2 horas. Os solventes cromatográficos utilizados foram a mistura clorofórmio:triethylamina (5:1), para a separação das poliaminas putrescina, espermidina e espermina. A separação cromatográfica foi realizada por 1 hora a 25°C, sendo todo o processo acompanhado por luz UV. Padrões de poliaminas foram processados da mesma maneira. Após esse processo, as placas foram secas e as poliaminas quantificadas por espectroscopia de emissão de fluorescência em aparelho VDS (Video Documentation System), através do programa Image Pro-IPW, no Laboratório de Física e Biofísica do Instituto de Biociências (UNESP) - Botucatu. Os teores de poliaminas livres foram expressos em nmol.put.g.m.f⁻¹, nmol.spd.g.m.f⁻¹ e nmol.spm.g.m.f⁻¹.

Teor de Fenóis Totais Solúveis

A análise foi realizada de acordo com o método espectrofotométrico Folin-Denis (Horwitz, 1995). Amostras de material seco e moído de plantas micropropagadas (planta-mãe, perfilhos e rizomas) e amostras da planta matriz (epiderme e rizomas) foram coletadas, pesadas e colocadas em tubos de centrífuga. Em cada tubo foi adicionado acetona 70% e água destilada. Em seguida foram levados para banho ultrassônico e centrifugados a 10.000 rpm. O sobrenadante foi colocado em frascos e mantidos em gelo. Alíquotas de 0,1 mL foram transferidas para tubos de ensaio e o volume completado com água destilada. Adicionou-se o reagente Folin-Denis e a solução saturada de Na₂CO₃.

Após agitação dos tubos, estes foram mantidos em repouso por 45 minutos e a leitura da absorbância realizada a 725 nm. Os resultados foram expressos em μg fenóis (ácido tânico) $\text{g}^{-1} \text{ms}^{-1}$.

Teor de Flavonóides Totais Solúveis

A análise foi realizada de acordo com o método espectrofotométrico adaptado de Santos & Blatt (1998) e Awad et al. (2000). Amostras de material fresco foram pesadas e maceradas em 20 mL de solução A (metanol 70% e ácido acético 10%). Posteriormente, foram levados ao banho ultrassônico e após filtragem, centrifugados a 10.000 rpm. Após a transferência do sobrenadante para tubos de ensaio foram acrescentados cloreto de alumínio e ácido acético 10%, sendo em seguida agitados e mantidos em repouso durante 30 minutos. A leitura da absorbância foi realizada a 425 nm e os resultados expressos em μg flavonóides (rutina/quercetina) $\text{g}^{-1} \text{m.s}^{-1}$.

Atividade da Peroxidase (E C 1.11.1.7)

A análise foi realizada de acordo com o método espectrofotométrico de Allan et al. (1974) modificado por Lima et al. (1999). Amostras de material fresco de plantas micropropagadas e amostras da planta matriz foram pesados e macerados em tampão fosfato 0,2 M, pH 6,7. Após centrifugação, foi adicionada solução de peróxido de hidrogênio e fenol. Os tubos contendo o sistema de reação foram mantidos em banho-maria por 5 minutos, sendo interrompida a reação com adição de etanol absoluto. A leitura da absorbância foi realizada a 505 nm. A atividade específica da peroxidase foi expressa em μmol de H_2O_2 decomposto $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As plantas com 120 dias de cultivo *in vitro* foram submetidas às análises bioquímicas, juntamente com plantas com 90 dias de cultivo *in vitro* (caracterização) e plantas matrizes (*in vivo*).

O maior valor de putrescina (Tabela 3) na planta-mãe (*in vitro*) foi encontrado no tratamento contendo a mistura das poliaminas espermidina e espermina, o qual apresentou diferenças significativas dos demais tratamentos. Resultados semelhantes são encontrados quando se analisou o teor dessa diamina nos perfilhos. Esses valores podem estar relacionados com o maior perfilhamento obtido nesse tratamento em relação aos demais, sugerindo que os teores de putrescina aumentam em tecidos em crescimento ativo (Rey et al., 1994). Diversos autores, entre eles Galston & Kaur-Sawhney (1995), relatam que a putrescina, assim como as demais poliaminas, é requerida para o crescimento e desenvolvimento ótimo de várias plantas. Esse fato se deve provavelmente a essa amina ser a precursora de espermidina e espermina (Bouchereau et al., 1999).

Tabela 3. Teores de putrescina na epiderme da planta matriz (*in vivo*) e planta-mãe (explante inicial) dos tratamentos *in vitro*; rizoma da planta matriz (*in vivo*) e dos tratamentos *in vitro*; perfilhos (brotações laterais de plantas *in vitro*), expressos em nmol de putrescina. grama de matéria fresca⁻¹.

	Planta Matriz	Caract. 90 dias	BAP+NAA 120 dias	Spm 120 dias	Spd 120 dias	Spm+Spd 120 dias	cv%
Epiderme/Planta-mãe	31,27 bc	45,50 bc	53,82 b	29,26 c	28,60 c	121,74 a	19,85
Rizoma	14,10 c	22,58 bc	176,31 a	155,45 a	63,82 b	132,85 a	20,97
Perfilho		37,83 c	37,00 c	37,79 c	77,90 b	121,60 a	14,54

As médias seguidas de mesma letra na horizontal não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Quanto aos teores de putrescina nos perfilhos, o tratamento contendo a combinação de espermidina e espermina apresentou valores mais elevados. Esse tratamento induziu maior número de perfilhos (8,50) em relação à aplicação de BAP + NAA (3,75 perfilhos), espermina (2,12 perfilhos) e espermidina (6,75 perfilhos), conseqüentemente maior atividade meristemática. Tal resultado concorda com os de Maki et al. (1991), sugerindo que a putrescina deve agir no controle do progresso das fases de mitose nas células, evidenciando aumento dos teores durante esse período. Desai &

Metha (1985) também verificaram em explantes foliares de *Passiflora* sp., que os teores de putrescina aumentaram durante a emissão de brotações.

Geralmente os teores de poliaminas estão associados com crescimento ativo dos tecidos, Meijer & Simmonds (1988) relataram que os teores de putrescina são relacionados com as mudanças ocorridas em função do processo de diferenciação. Neste trabalho, na associação de espermina e espermidina ocorreu maior número de perfilhos, diferindo estatisticamente quanto ao teor de putrescina dos demais tratamentos, apresentando valor superior. Assim, o maior valor encontrado de putrescina no tratamento contendo as duas poliaminas pode estar relacionado com a maior emissão de perfilhos.

Quanto aos teores de putrescina no rizoma aos 120 dias, os tratamentos contendo BAP + NAA, espermina e a combinação de espermina + espermidina apresentaram os maiores valores, não ocorrendo diferenças significativas entre estes tratamentos.

Tabela 4. Teores de espermina na epiderme da planta matriz (*in vivo*) e planta-mãe (explante inicial) dos tratamentos *in vitro*; rizoma da planta matriz (*in vivo*) e dos tratamentos *in vitro*; perfilhos (brotações laterais de plantas *in vitro*), expressos em nmol de espermina. grama de matéria fresca⁻¹.

	Planta Matriz	Caract. 90 dias	BAP+NAA 120 dias	Spm 120 dias	Spd 120 dias	Spm+Spd 120 dias	cv%
Epiderme/Planta-mãe	41,73 b	79,48 a	80,07 a	38,54 b	30,93 b	63,19 a	16,36
Rizoma	46,22 bc	31,53 c	122,15 a	71,61 b	60,48 bc	50,15 bc	21,29
Perfilho		53,69 b	53,90 b	92,73 a	98,59 a	85,90 a	12,92

As médias seguidas de mesma letra na horizontal não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Verifica-se que há aumento dos teores de espermina na planta-mãe (Tabela 4) aos 90 dias de cultivo *in vitro* em relação ao encontrado na epiderme da planta matriz. Resultado inverso é observado no rizoma. Os teores, nos órgãos analisados, foram maiores que os encontrados para putrescina. Provavelmente, este resultado se deve ao meio de cultivo, propício ao crescimento e desenvolvimento, onde putrescina poderia estar sendo convertida em espermidina e espermina (Marton & Morris, 1987; Galston & Kaur-Sawhney, 1995). Nota-se que a aplicação das poliaminas isoladas ou em combinação não induziram aumento no teor de espermina quando comparado com o tratamento contendo BAP e

NAA, tanto nas folhas (epiderme/planta-mãe) como no rizoma. Resultado inverso pode ser observado nos perfilhos, que por estarem provavelmente em ativo desenvolvimento, apresentaram maiores níveis dessa poliamina.

Scott et al. (1998) citam que as poliaminas, apesar de desempenharem papéis positivos em vários sistemas de cultura, em alguns casos mostram-se ineficientes. Segundo Rugini et al. (1992), os diferentes efeitos que as poliaminas apresentam para um mesmo evento podem estar relacionados com a aplicação de uma concentração inadequada à espécie, ou à altas concentrações endógenas já existentes no tecido, o que poderia explicar os resultados encontrados neste trabalho, podendo ocorrer ação das poliaminas oxidases, gerando peróxidos (Smith, 1985) ou mesmo à reconversão à putrescina (Tassoni et al. 2000).

Tabela 5. Teores de espermidina na epiderme da planta matriz (*in vivo*) e planta-mãe (explante inicial) dos tratamentos *in vitro*; rizoma da planta matriz (*in vivo*) e dos tratamentos *in vitro*; perfilhos (brotações laterais de plantas *in vitro*), expressos em nmol de espermidina. grama de matéria fresca⁻¹.

	Planta Matriz	Caract. 90 dias	BAP+NAA 30 dias	Spm 30 dias	Spd 30 dias	Spm+Spd 30 dias	cv%
Epiderme/Planta-mãe	33,94 b	50,48 a	20,82 c	23,59 c	13,77 c	33,72 b	14,80
Rizoma	32,72 cd	24,19 d	77,40 b	45,21 cd	47,54 c	113,22 a	17,30
Perfilho		20,64 c	12,01 c	48,98 b	26,91 c	74,08 a	19,06

As médias seguidas de mesma letra na horizontal não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

A Tabela 5 evidencia que o teor de espermidina na planta aos 90 dias de cultivo foi maior e difere significativamente dos demais valores encontrados na epiderme/planta-mãe. A aplicação exógena de espermidina não induziu o teor endógeno ao aumento. Esse resultado, assim como do encontrado para espermina, pode ter sido devido à época analisada, já que essas substâncias poderiam ter sido metabolizadas, ou através de enzimas de interconversão (Tassoni et al., 2000) ou através de enzimas oxidativas, que promovem a degradação dessas substâncias (Smith, 1985).

O uso de poliaminas exógenas no meio de cultura, de acordo Takeda et al., 2002 é uma maneira simples de elevar os níveis endógenos de poliaminas e algumas vezes, induzir regeneração.

Poliaminas exógenas (putrescina, espermidina, espermina) isoladas ou em combinação, resultaram num aumento de crescimento de calos, os quais apresentaram formação de brotações e

raízes com maior frequência que o controle em *Pinus virginiana* Mill. e putrescina ou espermidina isoladas foram os melhores tratamentos para crescimento de calos, formação de brotos e enraizamento desta espécie (Tang et al., 2004). Neste trabalho, o uso de espermidina foi também o melhor tratamento tanto para produção de massa (fresca/seca), como para indução de brotação (perfilhos), aplicada tanto isolada, quanto em combinação com espermina.

Mader & Hanke (1997) afirmam que os níveis de putrescina livre aumentaram em cultivo *in vitro* de soja, especialmente no período inicial, antes do crescimento se tornar restrito para a expansão celular e a diminuição no teor de putrescina foi associada com o final da divisão celular. Neste trabalho, a putrescina apresentou as alterações mais significativas, podendo, neste caso, ser utilizada como marcador bioquímico de aumento do número de plantas.

O teor de fenóis em plantas cultivadas *in vitro* com 90 dias (caracterização) foram maiores na folha da planta-mãe, quando comparados com os demais tratamentos e a aplicação exógena de espermina induziu valores semelhantes significativamente. Quando utilizou-se espermina combinada com espermidina, os tecidos analisados mostraram os menores teores de fenóis totais solúveis. Quanto ao rizoma, a mesma tendência pode ser observada, porém os menores teores são verificados na planta matriz. Em relação aos perfilhos, aqueles cultivados em meio contendo espermina e espermidina combinadas e aplicadas exógenamente, mostraram valores altos, menores apenas que a planta cultivada *in vitro* com 90 dias.

Nota-se que ocorreu correlação inversa entre os teores de fenóis, aplicação de poliaminas exógenas e crescimento (massa seca e número de perfilhos). Uma das funções dos fenóis está relacionada com a modulação do desenvolvimento vegetal, pela regulação do catabolismo do ácido indolacético (IAA) e outra função importante está relacionada com o aumento da rigidez da parede celular e conseqüentemente, a formação das ligações fenólicas com compostos da parede e a perda da extensibilidade, diminuindo o crescimento celular (Volpert et al., 1995; Kroon & Williamson, 1999; Arnaldos et al., 2001).

O teor de fenóis encontrado nos tratamentos contendo poliaminas exógenas está de acordo com o papel dos fenóis descrito na literatura, isto é, há uma relação inversa com o potencial de crescimento (Nakamura et al., 1998) e as poliaminas como são compostos relacionados com o crescimento de células e tecidos, promoveram o resultado esperado. Plantas cultivadas em meio contendo BAP e NAA aos 120 dias apresentaram menor índice de massa e número de perfilhos, se comparadas com as cultivadas em meio contendo espermidina combinada ou não com espermina, apresentando o maior

teor de fenóis totais. Este teor encontrado pode também ser devido à presença da auxina no meio de cultura, já que os fenóis estão relacionados com este regulador (Arnaldos et al., 2001).

A associação de espermina e espermidina exógenas promoveram o maior número de perfilhos (8,50) e apresentou também baixo teor de fenóis totais, além do maior teor de putrescina.

Tabela 6. Teores de fenóis totais na epiderme da planta matriz (*in vivo*) e planta-mãe (explante inicial) dos tratamentos *in vitro*; rizoma da planta matriz (*in vivo*) e dos tratamentos *in vitro*; perfilhos (brotações laterais de plantas *in vitro*), expressos em μg fenóis (ácido tânico). grama de matéria seca⁻¹.

	Planta Matriz	Caract. 90 dias	BAP+NAA 120 dias	Spm 120 dias	Spd 120 dias	Spm+Spd 120 dias	cv%
Epiderme/Planta-mãe	97,25 b	173,10 a	117,60 b	137,62 ab	101,75 b	119,87 b	15,03
Rizoma	32,10 c	119,37 a	88,60 b	128,25 a	92,60 b	79,62 b	12,77
Perfilho		139,37 a	79,37 b	85,92 b	98,50 ab	107,50 ab	20,85

As médias seguidas de mesma letra na horizontal não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Os compostos fenólicos são substratos principais de peroxidases, enzimas relacionadas com o crescimento e organogênese (De Klerk, 1996; Kanmegne & Omokolo, 2003).

Tabela 7. Atividade de peroxidase na folha (epiderme) da planta matriz (*in vivo*) e planta-mãe (explante inicial) dos tratamentos *in vitro*; rizoma da planta matriz (*in vivo*) e dos tratamentos *in vitro*; perfilhos (brotações laterais de plantas *in vitro*), expressos em μmol de H_2O_2 decomposto. min^{-1}mg . de proteína⁻¹.

	Planta Matriz	Caract. 90 dias	BAP+NAA 120 dias	Spm 120 dias	Spd 120 dias	Spm+Spd 120 dias	cv%
Epiderme/planta-mãe	0,166 a	0,144 a	0,040 c	0,080 bc	0,069 c	0,122 ab	21,38
Rizoma	0,123 d	0,395 bc	0,751 a	0,516 b	0,269 cd	0,471 bc	21,35
Perfilho		0,030 c	0,047 c	0,064 c	0,461 a	0,138 b	15,95

As médias seguidas de mesma letra na horizontal não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

As maiores atividades da enzima peroxidase (Tabela 7) ocorreram na epiderme da planta matriz, na caracterização e no uso exógeno da combinação das poliaminas espermidina e espermina. Entre as funções atribuídas às peroxidases em plantas, estão aquelas relacionadas ao estresse (Castillo, 1992). Em relação a planta matriz (cultivada em condições de campo e analisada 6 horas após a

coleta, devido ao transporte do material vegetal, mesmo que em condições de temperatura baixa), a alta atividade observada tanto nas folhas como no rizoma poderia ser atribuída ao possível estresse causado pelos fatores externos. Já em relação ao aumento verificado na caracterização, este fato poderia ser devido às sucessivas subculturas ou manipulação. Aumento de atividade da peroxidase durante a subcultura de tecidos *in vitro* também foi noticiada por Laukkanen et al. (1999) em *Pinus sylvestris*, onde observaram que durante a transferência de meios, os tecidos apresentaram maior atividade da peroxidase e os autores ainda atribuem que esse aumento poderia estar relacionado com a lignificação das células.

Nos rizomas, nota-se os maiores valores para atividade da peroxidase em todas as plantas *in vitro*. Foi verificada a presença de oxidação em todos os rizomas testados (escurecimento), tanto na caracterização, provenientes de 90 dias de cultivo *in vitro*, como nos tratamentos contendo BAP + NAA e aqueles contendo espermina e/ou espermidina exógena.

Devido a taxa de oxidação observada, não foi retirado o rizoma durante os subcultivos referentes à caracterização, pois em experimentos prévios foi observado que a retirada dos rizomas acentuavam a oxidação. A atividade da peroxidase apresenta alterações em tecidos com oxidação e/ou necrosados. A atividade desta enzima, assim como da polifenoloxidase (capazes de catalisar a formação e polimerização de quinonas de compostos fenólicos) muda significativamente durante o cultivo *in vitro*. Tal polimerização pode causar o escurecimento dos tecidos, pela conversão dos precursores coloridos em polímeros marrons e a atividade de enzimas oxidativas aumenta durante esse processo (Laukkamen et al., 1999). Provavelmente, neste trabalho, a alta atividade da peroxidase em rizomas está relacionada com a formação de compostos oxidados, que tornariam o rizoma escurecido, sendo também exsudado para o meio de cultura. A opção de não separar o rizoma da planta durante a subcultura foi porque ao seccionarmos o material vegetal, os conteúdos do citoplasma e vacúolos seriam misturados, os compostos fenólicos poderiam ser oxidados e poderiam modificar a cinética de enzimas importantes para o metabolismo da planta, alterando seu desenvolvimento e resultando num maior escurecimento e danos, os quais poderiam ser letais para os explantes, como também descrito por Compton & Preece, 1986 e Laukkanen et al., 2000.

As poliaminas são descritas como substâncias que podem prevenir ou diminuir a oxidação, agindo como possível antioxidante (Lovaas, 1996) e provavelmente, poderiam interferir na atividade da peroxidase. Nas folhas de *Aloe vera*, verifica-se que na aplicação de espermina ou espermidina isoladas não ocorreu diferenças, o mesmo para o tratamento contendo BAP + NAA, porém

apresentaram atividade menor em relação a aplicação da mistura das duas poliaminas. A alta atividade observada neste tratamento poderia ser relacionada com o ativo crescimento observado neste tratamento, tanto para folhas, como para os perfilhos, pois a peroxidase tem sido descrita na literatura como possível marcador de organogênese (Kanmegne & Omokolo, 2003; Bonfill et al., 2003; De Klerk, 1996), apresentando alterações na atividade antes dos eventos morfogênicos se manifestarem (Gaspar et al., 1996; Anderson et al., 1986) e no caso específico de perfilhos, o tratamento com espermina e espermidina foi o que induziu maior número de perfilhos, maior teor de putrescina e apresentou alta atividade da enzima, podendo neste caso a enzima peroxidase ser também tomada como indicador de crescimento ativo em *Aloe vera*. Por outro lado, como descrito em Kanmegne & Omokolo (2003), parece que cada evento morfogênico que ocorre (calogênese, rizogênese, formação de brotos, etc.) estaria caracterizado por um padrão de isoperoxidase específico, necessitando neste caso de estudos mais aprofundados sobre o papel bioquímico de peroxidases ácidas e básicas.

Os teores de flavonóides encontrados no presente estudo (Tabelas 8 e 9), principalmente nos rizomas de plantas tratadas com espermidina e a associação de espermina e espermidina foram maiores que o relatado em maçã por Awad et al. (2000), fruto que apresenta grandes níveis dessas substâncias. Tanto com base em quercetina ou rutina, nota-se que a aplicação de espermidina e a associação de espermina e espermidina induziram teores elevados de flavonóides nas folhas da planta-mãe.

Tabela 8. Teores de quercetina na folha (epiderme) da planta matriz (*in vivo*) e planta-mãe (explante inicial) dos tratamentos *in vitro*; rizoma da planta matriz (*in vivo*) e dos tratamentos *in vitro*; perfilhos (brotações laterais de plantas *in vitro*), expressos em μg fenóis (ácido tânico). grama de matéria seca⁻¹.

	Planta Matriz	Caract. 90 dias	BAP+NAA 120 dias	Spm 120 dias	Spd 120 dias	Spm+Spd 120 dias	cv%
Epiderme/Planta-mãe	1,99 ab	1,56 bc	1,70 bc	1,16 c	1,94 ab	2,28 a	16,42
Rizoma	1,66 c	3,49 b	3,28 b	4,70 ab	6,06 a	5,68 a	14,87
Perfilho		1,46 bc	1,98 ab	1,22 c	1,35 bc	2,59 a	14,54

As médias seguidas de mesma letra na horizontal não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Resultados semelhantes são observados no rizoma, enquanto que nos perfilhos apenas a associação das duas poliaminas promoveu os maiores valores. Nos rizomas, onde foi também

observada alta atividade da peroxidase, por provavelmente estarem relacionadas com estresse, os níveis de flavonóides pode ter sido maior devido à alta taxa de oxidação observada no tecido, causando o escurecimento. O aumento poderia estar relacionado com o possível papel antioxidante dessas substâncias. Esse efeito pode ser devido principalmente às espécies reativas de oxigênio (ROS), envolvendo radical superóxido (O_2^-), radical hidroxila (OH) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), sendo o peróxido o maior contribuinte para as ROS (Apel & Hirt, 2004). Starzyinsk et al. (2003) encontraram correlação positiva entre o conteúdo de flavonóides em brócolis e a atividade antiradical livre, medida via DPPH (1,1-difenil-2-picridrazil), indicando que os fenóis solúveis analisados tem um papel importante como componente do sistema antioxidante. Possivelmente, os teores encontrados neste trabalho estejam relacionados com a proteção aos tecidos do rizoma, órgão que apresentou maior nível de oxidação nestas plantas estudadas.

Tabela 9. Teores de rutina na folha (epiderme) da planta matriz (*in vivo*) e planta-mãe (explante inicial) dos tratamentos *in vitro*; rizoma da planta matriz (*in vivo*) e dos tratamentos *in vitro*; perfilhos (brotações laterais de plantas *in vitro*), expressos em μg fenóis (ácido tânico). grama de matéria seca⁻¹.

	Planta Matriz	Caract. 90 dias	BAP+NAA 120 dias	Spm 120 dias	Spd 120 dias	Spm+Spd 120 dias	cv%
Epiderme/Planta-mãe	3,10 ab	2,52 ab	2,54 ab	2,12 b	3,59 a	3,57 a	20,53
Rizoma	2,92 c	5,18 bc	4,79 c	5,40 bc	8,43 a	7,90 ab	21,10
Perfilho		2,55 bc	3,35 ab	1,95 c	2,46 bc	4,47 a	17,57

As médias seguidas de mesma letra na horizontal não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Nos perfilhos, os maiores teores de flavonóides são observados nos tratamentos que usaram a combinação das duas poliaminas e que apresentaram maior perfilhamento, assim como maior teor de putrescina. provavelmente essa combinação e os teores usados das poliaminas tenham proporcionado um sistema conveniente de crescimento, além da possível proteção dos tecidos contra danos oxidativos gerados por exudatos do rizoma, podendo ter promovido aumento dos flavonóides.

Outra relação que poderia ser citada é a dos flavonóides e IAA, já que os flavonóides parecem proteger esse regulador (Wagner et al., 1998). Diversos trabalhos mostram a ação de flavonóides específicos (quercetina e rutina) inibindo IAA oxidase em altas concentrações, mas que podem acelerar a catálise do IAA em baixas concentrações (Mathesius, 2001). Os flavonóides que inibem a

atividade da IAA oxidase poderiam agir como um substrato alternativo para a peroxidase, protegendo o IAA de oxidação (Kefeli & Dashek, 1984), favorecendo o crescimento. Os flavonóides também podem inibir a oxidação do IAA pela remoção de peróxido de hidrogênio, o qual é produzido na ação oxidativa que precede a atividade da peroxidase e é necessário para oxidação do IAA (Galston et al., 1950).

Assim, os maiores teores de flavonóides encontrados encontrados no rizoma poderiam estar relacionados com os danos oxidativos, tentando preservar o tecido, pois o mesmo apresentava-se escurecido externamente, porém internamente, no local onde cresciam os perfilhos, o tecido estava sem sinais de oxidação.

Os valores observados nos perfilhos no tratamento contendo a combinação de espermidina e espermina, poderia estar relacionado ao ativo crescimento encontrado, além da possibilidade da ação conjunta das poliaminas e flavonóides parece ter sido benéfica para o perfilhamento de *Aloe vera* micropropagada.

CONCLUSÃO

Ocorreu correlação inversa entre teores de fenóis, aplicação de poliaminas e desenvolvimento de plantas de *Aloe vera* (L.) Burm. *in vitro*. A ação conjunta das poliaminas mostrou-se benéfica para o perfilhamento.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ALLAIN, C.C., POON, L.C., CHAIN, C.S.G., RICHMOND, W., FU, P.C. Enzymatic determination of total serum cholesterol. **Clin. Chem.**, v. 20, p. 470-5, 1974.
- ALTAMURA, M.M., TORRIGIANI, P., FALASKA, G., ROSSINI, P., BARNI, N. Morpho-functional gradients in superficial and deep tissues along tobacco stem: polyamine levels, biosynthesis and oxidation and organogenesis in vitro. **Journal of Plant Physiology** , v. 142, p.543-55, 1993.
- ANDERSON, J.M., OKKELSI, F., ULUSKOV, P., MARCUSSEN, J. Plant peroxidases related to differentiation in vitro cultures. In: GREPPIN, H.; PENEL, C.; GASPAR, T.H. (Eds), **University of Geneve**, Suíça, p. 353-359, 1986.
- ARNALDOS, T.L., MUNÓZ, R., FERRER, M.A., CALDERÓN, A.A. Changes in phenol content during strawberry (*Fragaria X ananassa*, c.v. Chandler) callus culture. **Physiologia Plantarum**, v. 113, p. 315-322, 2001.
- AWAD, A.M., JAGER, A. de, WESTING, L.M. van. Flavonoid and chlorogenic acid levels in apple fruit: characterisation of variation. **Scientia Horticulturae**, v.83, p. 249-263, 2000.
- BONFILL, M., CUSIDÓ, R.M., PALAZÓN, J., CANUT, E., PIÑOL, T., MORALES, C. Relationship between peroxidase activity and organogenesis in *Panax ginseng* calluses. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 73, p.37-41, 2003.
- BOUCHEREAU, A., AZIZ, A., LARHER, F., TANGUY, J.M. Polyamines and environmental challenges: recent development. **Plant Science**, v.140, p.103-25, 1999.
- CASTILLO, F.J. Peroxidase and stress. In: PENEL, C.; GASPAR, T.H.; GREPPIN, H. (Eds). Plant Peroxidases 1980-1990, topics and detailed literature on molecular, biochemical and physiological aspects., **University of Geneve**, Suíça, p. 187-203, 1992.

- COMPTON, M.E.; PREECE, J.E. Exudation and explant establishment. N. S. Int Assn. **Plant Tissue Culture**, v.50, p. 9-18, 1986.
- CVIKROVÁ, M.; MALA, J.; EDER, J.; HRUBCOVÁ, M.; VÁGNER, M. Abscisic acid, polyamines and phenolic acids in sessile oak somatic embryos in relation to their conversion on potential. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 36, p. 247-255, 1998.
- DE KLERK, G. J. Markers of adventitious root formation. **Agronomie**, v. 16, p.609-616, 1996.
- DEMPSEY, D. A., SILVA, H., KLESSIG, D. F. Engineering disease and pest resistance in plants. **Trends Microbiology**, v.6, p. 54-61, 1993.
- DESAI, H.V., METHA, A.R. Changes in polyamine levels during shoot formation, root formation, and callus induction in cultured *Passiflora* leaf discs. **Journal of Plant Physiology**, v.119, p.45-53, 1985.
- FEUCHT, W., TREUTTER, D. Effects of abscisic acid and (+) catechin on growth and leaching properties of callus from four fruit species. **Gartenbauwissenschaften**, v.61, p. 174-78, 1996.
- FEUCHT, W.; TREUTTER, D.; KEUKENKAMP, I. Growth enhancement of grapevine callus by catechin in auxin-free media. **Vitis**, v. 37, p.67-71, 1998.
- FLORES, H.E., GALSTON, A.W. Analysis of polyamines in higher plants by high performance liquid chromatography. **Plant Physiology**, v.69, p.701-6, 1982.
- GALSTON, A.W.; BONNER, J.; BAKER, R.S. Flavoprotein and peroxidase as constituents of the indoleacetic oxidase of peas. **American Journal of Botany**, v.37, p.677-78, 1950.
- GALSTON, A.W., KAUR-SAWHNEY, R. Polyamines as endogenous growth regulators. In: DAVIES, P.J. (Ed). **Plant Hormones: Physiology, Biochemistry & Molecular Biology**. Dordrecht: Kluwer, p.158-78, 1995.

- GASPAR, T., PENEL, C., CASTILHO, F.J., GREPPIN, H. A two-step control of basic and acidic peroxidases and its significance for growth and development. **Plant Physiology**, v. 37, p. 165-186, 1985.
- HORWITZ, H. Official method of analysis of the association of official agricultural chemists. 8 ed. **Association of Agricultural Chemists**, Washington, p. 144, 1995.
- HU, Y. XU, J.; HU, Q. Evaluation of antioxidant potential of *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) extracts. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 51, p. 7788-91, 2003.
- KANMEGNE, G., OMOKOLO, N. D. Changes in phenol content and peroxidase activity during *in vitro* organogenesis in *Xanthosoma sagittifolium* L. **Plant Growth Regulation**, v.40, p.53-57, 2003.
- KEFELI, V.I., DASHEK, W.V. Non-hormonal stimulations and inhibitors of plant growth development. **Biological Reviews**, v. 59, p. 273-288, 1984.
- KROON, P. A., WILLIAMSON, G. Hydroxycinnamates in plants and foods. Current and future perspectives. **Journal of Science Food Agricultural**, v. 79, p. 355-361, 1999.
- KRYLOV, S.N., KRYLOVA, S.M.; CHEBORATEV, I.J.; CHEBORATEVA, A.B. Inhibition of enzymatic indole-3-acetic acid oxidation by phenols. **Phytochemistry**, v. 36, p. 263-267, 1994.
- LAUKKANEN, H., HÄGGMAN, H., KONTUNEN-SOPPELA, S., HOHTOLA, A. Tissue browning of *in vitro* cultures of scots pine: Role of peroxidase and polyphenol oxidase. **Physiologia Plantarum**, v. 106, p. 337-343, 1999.
- LAUKKANEN, H., SOINI, H., KONTUNEN-SOPPELA, S., HOHTOLA, A., VILJANEN, M. A mycobacterium isolated from tissue cultures of native *Pinus sylvestris* interferes with growth of Scots pine seedlings. **Tree Physiology**, v. 20, p. 915-920, 2000.
- LEE, T.M. Polyamine regulation of growth and chilling tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) roots cultured *in vitro*. **Plant Science**, v. 122, p.111-117, 1997.

- LEE, K.Y., WEINTRAUB, S.T., YU, B.P. Isolation and identification of a phenolic antioxidant from *Aloe barbadensis*. **Free Radical Biology & Medicine**, v.28, n.2, p.261-65, 2000.
- LI, H.H., INOUE, M., NISHIMURA, H., MIZUTANI, J., TSUZUKI, E. Interactions of trans-cinnamic acid in seedling growth and seed germination of lettuce. **Journal of Chemical Ecology**, v.19, p.1175-87, 1993.
- LIMA, G.P.P. **Efeito do cálcio sobre o teor de poliaminas e atividade da peroxidase e redutase de nitrato em calos de arroz (*Oryza sativa* L. cv. IAC 4440)**. Botucatu, 1994. 85 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.
- LIMA, G.P.P., BRASIL, O.G., OLIVEIRA, A.M. Poliaminas e atividade da peroxidase em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivado sob estresse salino. **Scientia Agrícola**, v. 56, n.1, p.21-25, 1999.
- LIMA, G.P.P., PIZA, I.M.T., HENRIQUE, A., TAKAKI, M. Polyamines on salinity biochemical marker in callus of *Eucalyptus urograndis*. **VB**, p. 43-48, 2003.
- LOVAAS, E. Antioxidative effects of polyamines. **Journal of the American Oil Chemical Society**, v. 68, p.353-58, 1991.
- LOVAAS, E. Antioxidante and metal-chellatying effects of polyamines. In: H. Sies (Ed.). Advances in pharmacology antioxidants in disease mechanisms and therapy. **Academic Press**, New York, v. 38, p. 119-149, 1996.
- MADER, J.C., HANKE, D.E. Polyamine sparing may be involved in the prolongation of cell division due to inhibition of phenyl propanoid synthesis in cytokinin-starved soybean cells. **Journal of Plant Growth Regulation**, v.16, p.89-93, 1997.
- MAKI, H., ANDO, S., KODAMA, H., KOMANINE, A. Polyamines and the cell cycle of *Cantharus roseus* cells in culture. **Plant Physiology**, v.96, p. 1008-13, 1991.

- MARTON, L.J., MORRIS, D.R. Molecular and cellular functions of the polyamines. Inhibition of polyamine metabolism. Biological significance and Basis of therapies. In: MEGANN, P.P., PEGG, A.E., SJOERDSMA, A. (Eds.) **Academic Press**, New York, p. 79-105, 1987.
- MATHESIUS, U. Flavonoids induced in cells induging nodule organogenesis in white clover are regulators of auxin breakdown by peroxidases. **Journal of Experimental Botany**, v.52, p. 419-26, 2001.
- MEIJER, E.G.; SIMMONDS, J. Polyamine levels in relation to growth and somatic embryogenesis in tissue cultures of *Medicago sativa* L. **Journal of Experimental Botany**, v. 38, p.787-94, 1988.
- MURASHIGE, T. , SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473 – 97, 1962.
- NAKAMURA, M., SEIKI, M., FURUSAKI, S. Enhanced anthocyanin methylation by growth limitation in strawberry suspension culture. **Enzyme and Microbial Technology**, v.22, p. 404-08, 1998.
- OLIVEIRA, M.C.C., CARVALHO, M.G., FERREIRA, D.T., FILHO, R.B. Flavonóides das flores de *Stiffitia chrysantha* Mikan, **Química Nova**, v.22, n.2, 1999.
- PEDREÑO, M.A., ROS-BARCELÓ, A., GRACIA-CARMONA, F., MUÑOZ, R. Oxidation of dihydroxyfumaric acid in the absence of H₂O₂ by cell-wall bound peroxidases from lupin: A possible general model. **Plant Physiology and Biochemistry**., v.28, p.37-42, 1990.
- RAJAM, M.V. Polyamines. In: PRASAD, M.N.V. (Ed.). **Plant ecophysiology**. New York: J.Wiley, p.343-74, 1997.
- RAY, S.D. GA, ABA, phenol interaction in the control of growth: phenolics compounds as effective modulations of GA-ABA interactions in radish seedling. **Biologia Plantarum**, v.28, p. 361-69, 1986.

- REY, M., TIBURCIO, A.F., DÍAZ-SALA, C., RODRÍGUEZ, R. Endogenous polyamine concentrations in juvenile, adult and in vitro reinvigorated hazel. **Tree Physiology**, v. 14, n. 2, p. 191-200, 1994.
- RUGINI, E.; LUPPINO, M.; AGAZIO, M.; GREGO, S.; DE AGAZIO, M. Endogenous polyamine and root morphogenesis variations under different treatment in cutting and in vitro explants of olive. **Acta Horticulturae**, v.300, p.225-232, 1992.
- SANTOS, M.D., BLATT, C.T.T. Teor de flavonóides e fenóis totais em folhas de *Pyrostegia venusta* Miers. de mata e de cerrado. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 21, n. 2, p. 135-140, 1998.
- SCOTT, E. A., DHUNDY, R.B., SUBHASH, C.M. Metabolism of polyamines in transgenic cells of carrot expressing a mouse ornithine decarboxylase cDna. **Plant Physiology**, v.116, p.299-307, 1998.
- SILVA, J.M.O.D., ARAÚJO, P.S., NECKEL, C.A., IANSSEN, C., OLTRAMARI, A.C., PASSOS, R., TIEPO, E., BACH, D.B., MARASCHIN, M. Micropropagação de babosa. In: **Farmápolis**, 2000. Florianópolis: Sindfar, 2000.
- SMITH, T.A. Polyamines. **Annual Review of Plant Physiology**, v.36, p. 117-43, 1985.
- STANGARLIN, R. J., SCHWAN-ESTRADA, K. R. F., CRUZ, M. E. S., NOZAKI, M. H. Plantas Medicinais e controle alternativos de fitopatógenos. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 11, p.16-21, 1999.
- STARZYNSK, A., MARECZEK, A. Physiological changes in the antioxidant system of broccoli flower buds senescing during short-term storage, related to temperature and packaging. **Plant Science**, v.165, p.1387-95, 2003.

- TAKEDA, T., HAYAKAWA, F., OE, K., MATSUOKA, H. Effect of exogenous polyamines on embryogenic carrot cells. **Biochemical Engineering Journal**, v.12, p.21-28, 2002.
- TANG, W., NEWYON, R.J., OUTHAVONG, V. Exogenously added polyamines recover browning tissues into normal callus cultures and improve plant regeneration in pine. **Physiologia Plantarum**, v. 122, p.386-395, 2004.
- TASSONI, A., von BUUREN, M., FRANCESCHETTI, M., FORNALE, S., BAGNI, N. Polyamine content and metabolin in *Arabidopsis thaliana* and effect of spermidine on plant development. **Plant Physiology Biochemistry**, v.36, p.383-93, 2000.
- TEUTONICO, R.A., DUDLEY, M.W., ORR, J.D., LYNN, D.G., BINNS, A.N. Activity and accumulation of cell division – promoting phenolics in tobacco tissue cultures. **Plant Physiology**, v. 97, p. 288-97, 1991.
- VOLPERT, R., OSSWALD, W., ETYSNER, E.F. Effects of cinnamic acids derivatives in indole acetic acid oxidation by peroxidase. **Phytochemistry**, v.38, p. 19-32, 1995.
- WAGNER, G.R., YOUNGMAN, R.Y., ESTNER, E.F. Inhibitors of chloroplast photo-oxidation by flavonoids and mechanism of the antioxidative action. **Journal of Phytochemistry and Photobiology**, V. B 1, p.451-60, 1988.
- ZHANG, Z.T.; DU, Y.J.; LIU, Q.G.; LIU, Y. Determination of the antioxidative effect of *Aloe vera*. **Nature Products Research Development**, v.13, p.45-46, 2001.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRIE, A.L., van STADEN, J. Micropropagation of the endangered *Aloe polyphylla*. **Plant Growth Regulation**, v.33, p. 19-23, 2001.
- AGAZIO, M., ZACCHINI, M. Di methyl-thiowea, a hidrogen peroxidase trap, partially presents stress effects and ascorbate peroxidase increase in spermidine-treated maize roots. **Plant Cell on Environment**, v.24, p.237-244, 2001.
- ALLAIN, C.C., POON, L.C., CHAIN, C.S.G., RICHMOND, W., FU, P.C. Enzymatic determination of total serum cholesterol. **Clin. Chem.**, v. 20, p. 470-5, 1974.
- ALTAMURA, M.M., TORRIGIANI, P., FALASKA, G., ROSSINI, P., BARNI, N. Morpho-functional gradients in superficial and deep tissues along tobacco stem: polyamine levels, biosynthesis and oxidation and organogenesis in vitro. **Journal of Plant Physiology** , v. 142, p.543-55, 1993.
- ANDERSON, J.M., OKKELSI, F., ULUSKOV, P., MARCUSSEN, J. Plant peroxidases related to differentiation in vitro cultures. In: GREPPIN, H.; PENEL, C.; GASPAR, T.H. (Eds), **University of Geneve**, Suíça, p. 353-359, 1986.
- APEL, K., HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal traduction. **Annual Review Plant Biology**, v. 55, p. 373-99, 2004.
- AREZI, O., BOXUS P., KEVERS C., Gaspar, T. Hormonal control of proliferation in meristematic agglomerates of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. **In Vitro Cell Development Biology Plant**, v.36, p.398-401, 2000.
- ARNALDOS, T.L., MUNÓZ, R., FERRER, M.A., CALDERÓN, A.A. Changes in phenol content during strawberry (*Fragaria X ananassa*, c.v. Chandler) callus culture. **Physiologia Plantarum**, v. 113, p. 315-322, 2001.

- AWAD, A.M., JAGER, A. de, WESTING, L.M. van. Flavonoid and chlorogenic acid levels in apple fruit: characterisation of variation. **Scientia Horticulturae**, v.83, p. 249-263, 2000.
- BAIS, H.P., RAVISHANKAR, G.A. Role of polyamines in the ontogeny of plants and their biotechnological applications. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.69, p.1-34, 2002.
- BONFILL, M., CUSIDÓ, R.M., PALAZÓN, J., CANUT, E., PIÑOL, T., MORALES, C. Relationship between peroxidase activity and organogenesis in *Panax ginseng* calluses. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 73, p.37-41, 2003.
- BOUCHEREAU, A., AZIZ, A., LARHER, F., TANGUY, J.M. Polyamines and environmental challenges: recent development. **Plant Science**, v.140, p.103-25, 1999.
- CASTILLO, F.J. Peroxidase and stress. In: PENEL, C.; GASPAR, T.H.; GREPPIN, H. (Eds). Plant Peroxidases 1980-1990, topics and detailed literature on molecular, biochemical and physiological aspects., **University of Geneve**, Suíça, p. 187-203, 1992.
- CASTRO, C.E.F. Propagação de plantas ornamentais. In: CASTRO, C.E.F. **Manual de floricultura**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, p.53-78, 1992.
- CHAUDHURY, S., MUKUNDAN, U. *Aloe vera* L.- micropropagation and characterization of its gel. **Phytomorphology**, p. 155-57, 2001.
- CLEMENTE, E., PASTORE, G.M. Peroxidase and polyphenoloxidase, the importance for food technology. **Bolletim da SBCTA**, v.32, n.2, p.167-71, 1998.
- COMPTON, M.E.; PREECE, J.E. Exudation and explant establishment. N. S. Int Assn. **Plant Tissue Culture**, v.50, p. 9-18, 1986.

- COWLEY, T.; WALTERS, D.R. Polyamine metabolism in barley reacting hypersensitively to the powdery mildew fungus *Blumeria graminis* f.sp. *hordei*. **Plant, Cell & Environment**, v.25, p.461–68, 2002.
- CRUZ, G.F., INNECCO, R., MATTOS, S.H. Estudo do ciclo vegetativo e reprodutivo da babosa. **Horticultura Brasileira**, v.19, 2001.
- CVIKROVÁ, M.; MALA, J.; EDER, J.; HRUBCOVÁ, M.; VÁGNER, M. Abscisic acid, polyamines and phenolic acids in sessile oak somatic embryos in relation to their conversion on potential. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 36, p. 247-255, 1998.
- DA COSTA, N.P. Método da peroxidase para identificação de cultivares de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, v.1, n.1, p.89-93, 1979.
- DAVIS, D.G.; OLSON, P.A. Effects of putrescine and inhibitors of putrescine biosynthesis on organogenesis in *Euphorbia esula* L. **In Vitro Cellular and Development Biology Plant**, v. 30, p. 124-130, 1994.
- DAVIS, R.H. Aloe vera: a scientific approach. New York: **Vantage Press**, 1997.
- DEBERGH, P.C., READ, P.E. Micropropagation. In: DEBERGH, P.C., ZIMMERMAN, R.H. (Eds) Micropropagation: technology and application. London: **Kluwer Academic Publishers**, p.1-13, 1991.
- DE KLERK, G. J. Markers of adventitious root formation. **Agronomie**, v. 16, p.609-616, 1996.
- DEMPSEY, D. A., SILVA, H., KLESSIG, D. F. Engineering disease and pest resistance in plants. **Trends Microbiology**, v.6, p. 54-61, 1993.

- DESAI, H.V., METHA, A.R. Changes in polyamine levels during shoot formation, root formation, and callus induction in cultured *Passiflora* leaf discs. **Journal of Plant Physiology**, v.119, p.45-53, 1985.
- DILLEY, D.R. Encimes. In: HÚLME, A.C. The biochemistry of fruits and their products. London. **Academic Press**, v. 1, p.179-207, 1970.
- DORNELES, D., WOUK, A.F., PONTAROLO, R., OLIVEIRA, A.B. Efeito de *Aloe vera* Linné sobre a cicatrização de feridas de pele em coelhos. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 4, n.1, p.39-46, 2003.
- DUVAL, C.M., CALDAS, L.S., RESENDE, R.O. Aplicações da cultura de tecidos na fitopatologia. In: TORRES, A.C., CALDAS, L.S., BUSO, J.A. (Eds.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, p.45-68, 1998.
- EPSTEIN, L., LAPORT, D.T.A. An intramolecular linkage involving isodityrosine in extensin. **Phytochemistry**, v. 23, p.1241-46, 1984.
- EVANS, P.T., MALMBERG, R.L. Do polyamines have a role in plant development? **Annu. Rev. Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.40, p.235-60, 1989.
- FLORES, H.E., GALSTON, A.W. Analysis of polyamines in higher plants by high performance liquid chromatography. **Plant Physiology**, v.69, p.701-6, 1982.
- FEUCHT, W., TREUTTER, D. Effects of abscisic acid and (+) catechin on growth and leaching properties of callus from four fruit species. **Gartenbauwissenschaften**, v.61, p. 174-78, 1996.
- FEUCHT, W.; TREUTTER, D.; KEUKENKAMP, I. Growth enhancement of grapevine callus by catechin in auxin-free media. **Vitis**, v. 37, p.67-71, 1998.
- FRIEDMAN, R.A., ALTMAN, A., BACHRACH, U. Polyamines and root formation in mung bean hypocotyl cuttings. **Plant Physiology**, v. 70 (3), p. 844-848, 1982.

- GALSTON, A.W.; BONNER, J.; BAKER, R.S. Flavoprotein and peroxidase as constituents of the indolacetic oxidase of peas. **American Journal of Botany**, v.37, p.677-78, 1950.
- GALSTON, A.W., KAUR-SAWHNEY, R. Polyamines as endogenous growth regulators. In: DAVIES, P.J. (Ed). **Plant Hormones: Physiology, Biochemistry & Molecular Biology**. Dordrecht: Kluwer, p.158-78, 1995.
- GASPAR, T., PENEL, C., CASTILHO, F.J., GREPPIN, H. A two-step control of basic and acidic peroxidases and its significance for growth and development. **Plant Physiology**, v. 37, p. 165-186, 1985.
- GASPAR, T.H., KEVERS, C., PENEL, C., GREPPIN, H., REID, D.M., THORPE, T.A. Plant hormones and plant growth regulation in plant tissue culture. **In Vitro Cellular and Development Biology-Plant.**, v. 32, p. 272-289, 1996.
- GEMTCHÚJNICOV, I. D. de. **Manual de taxonomia vegetal**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1976. 368 p.
- GLYPHIS, J.P., PUTTICK, G.M. Phenolic in some Southern African Mediterranean shrubland plants. **Phytochemistry**, p.743-51, 1988.
- GRATTAPAGLIA, D., MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.C., CALDAS, L.S., BUSO, J.A. (Eds) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 1998, v.1, p.183-260.
- GRINDLAY, D., REYNOLDS, T. The Aloe vera phenomenon: a review of the properties and modern uses of the leaf parenchyma gel. **Journal of Ethnopharmacology.**, n. 16, p. 117 -151. 1986.
- HARBONE, J.B. Flavonoids. In: **Phytochemistry VII** (L.P. Miller. Ed.). Van Nostrand Reinhold Company, New York, 1973, v. 3, p.351-380.
- HEDENDAL, BE. Whole Leaf Aloe Vera - Almost a panacea. **Health Consciousness**, v. 13, n.1, 2000.

- HIRIMBUREGAMA, K., GAMAGE, N. In vitro multiplication of Aloe vera meristem tips for mass propagation. **Horticultural Science**, p.15-18, 1995.
- HORWITZ, H. Official method of analysis of the association of official agricultural chemists. 8 ed. **Association of Agricultural Chemists**, Washington, p. 144, 1995.
- HU, Y. XU, J.; HU, Q. Evaluation of antioxidant potential of *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) extracts. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 51, p. 7788-91, 2003.
- IKAN, R. Acetogenins. In: Natural Products. A Laboratory Gride. 2. ed. **Academic Press**: London, p.1-22, 1991.
- KANMEGNE, G., OMOKOLO, N. D. Changes in phenol content and peroxidase activity during *in vitro* organogenesis in *Xanthosoma sagittifolium* L. **Plant Growth Regulation**, v.40, p.53-57, 2003.
- KAY, L.E., BASILE, D. Specific peroxidase isoenzymes are correlated with organogenesis. **Plant Physiology**, v.84, p.99-105, 1987.
- KEFELI, V.I., DASHEK, W.V. Non-hormonal stimulations and inhibitors of plant growth development. **Biological Reviews**, v. 59, p. 273-288, 1984.
- KLEIN, A.D., PENNEYS, N.S. Aloe vera. **Journal American Academy Dermatology**, p. 714-20, 1988.
- KROON, P. A., WILLIAMSON, G. Hydroxycinnamates in plants and foods. Current and future perspectives. **Journal of Science Food Agricultural**, v. 79, p. 355-361, 1999.
- KRYLOV, S.N., KRYLOVA, S.M.; CHEBORATEV, I.J.; CHEBORATEVA, A.B. Inhibition of enzymatic indole-3-acetic oxidation by phenols. **Phytochemistry**, v. 36, p. 263-267, 1994.
- KUMAR, A., ALTABELA, T., TAYLOR, M., TIBURCIO, A. Recent advance in polyamine research. **Trends Plant Science**, v.2, p.124-30, 1997.

- LAUKKANEN, H., HÄGGMAN, H., KONTUNEN-SOPPELA, S., HOHTOLA, A. Tissue browning of in vitro cultures of scots pine: Role of peroxidase and polyphenol oxidase. **Physiologia Plantarum**, v. 106, p. 337-343, 1999.
- LAUKKANEN, H., SOINI, H., KONTUNEN-SOPPELA, S., HOHTOLA, A., VILJANEN, M. A mycobacterium isolated from tissue cultures of native *Pinus sylvestris* interferes with growth of Scot pinus seedlings. **Tree Physiology**, v. 20, p. 915-920, 2000.
- LEE, T.M. Polyamine regulation of growth and chilling tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) roots cultured in vitro. **Plant Science**, v. 122, p.111-117, 1997.
- LEE, K.Y., WEINTRAUB, S.T., YU, B.P. Isolation and identification of a phenolic antioxidant from *Aloe barbadensis*. **Free Radical Biology & Medicine**, v.28, n.2, p.261-65, 2000.
- LEUNG, A. Y. *Aloe vera* Update: A New Form Questions Integrity of Old. **D & CI**, p. 42-46, Sept. 1985.
- LI, H.H., INOUE, M., NISHIMURA, H., MIZUTANI, J., TSUZUKI, E. Interactions of trans-cinnamic acid in seedling growth and seed germination of lettuce. **Journal of Chemical Ecology**, v.19, p.1175-87, 1993.
- LIAO, Z., CHEN, M., TAN, F., SUN, X., TANG, K. Micropropagation of endangered Chinese aloe. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.76, n.2, p.83-6, 2004.
- LIMA, G.P.P. **Efeito do cálcio sobre o teor de poliaminas e atividade da peroxidase e redutase de nitrato em calos de arroz (*Oryza sativa* L. cv. IAC 4440)**. Botucatu, 1994. 85 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.
- LIMA, G.P.P., BRASIL, O.G., OLIVEIRA, A.M. Poliaminas e atividade da peroxidase em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivado sob estresse salino. **Scientia Agrícola**, v. 56, n.1, p.21-25, 1999.
- LIMA, G.P.P., PIZA, I.M.T., HENRIQUE, A., TAKAKI, M. Polyamines on salinity biochemical marker in callus of *Eucalyptus urograndis*. **VB**, p. 43-48, 2003.

- LOVAAS, E. Antioxidative effects of polyamines. **Journal of the American Oil Chemical Society**, v. 68, p.353-58, 1991.
- LOVAAS, E. Antioxidante and metal-chellatying effects of polyamines. In: H. Sies (Ed.). *Advances in pharmacology antioxidants in disease mechanisms and therapy*. **Academic Press**, New York, v. 38, p. 119-149, 1996.
- LUZ, J.M.Q., PASQUAL, M., SOUZA, R.J. Cultura de tecidos e biotecnologia em mandioquinha-salsa. **Informe Agropecuário**, v.19, n.190, p.18-21, 1997.
- MACKINTOSH, C.A., SLATER, L.A., WALTERS, D.R. Synthesis of six novel N,N-dialkyl derivatives of spermidine and effects on growth of the fungal plant pathogen *Pyrenophora avenae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 202, p.221–25, 2001.
- MADER, J.C., HANKE, D.E. Polyamine sparing may be involved in the prolongation of cell division due to inhibition of phenyl propanoid synthesis in cytokinin-starved soybean cells. **Journal of Plant Growth Regulation**, v.16, p.89-93, 1997.
- MAKI, H., ANDO, S., KODAMA, H., KOMANINE, A. Polyamines and the cell cycle of *Cantharus roseus* cells in culture. **Plant Physiology**, v.96, p. 1008-13, 1991.
- MARSHALL, J.M. Aloe vera gel: what is the evidence? **Pharmaceutical Journal**, p. 360-62, 1990.
- MARTON, L.J., MORRIS, D.R. Molecular and cellular functions of the polyamines. Inhibition of polyamine metabolism. Biological significance and Basis of therapies. In: MEGANN, P.P., PEGG, A.E., SJOERDSMA, A. (Eds.) **Academic Press**, New York, p. 79-105, 1987.
- MATHESIUS, U. Flavonoids induced in cells indugoing nodule organogenesis in white clover are regulators of auxin breakdown by peroxidases. **Journal of Experimental Botany**, v.52, p. 419-26, 2001.

- MATTOS, F.J.A. Plantas medicinais, guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil, 2 ed. Fortaleza: **Imprensa Universitária UFC**, 2000, 346p.
- McAULIFFE, J.C., HINDSGAUL, O. carbohydrate drugs-an ongoing challenge. **Chemistry and Industry**, p. 170-74, 1997.
- McKEOWN, E. *Aloe vera*. **Cosmetics & Toiletries**, v. 102, n. 6, p. 64-65, 1987.
- MEIJER, E.G.; SIMMONDS, J. Polyamine levels in relation to growth and somatic embryogenesis in tissue cultures of *Medicago sativa* L. **Journal of Experimental Botany**, v. 38, p.787-94, 1988.
- MIRZA, J.I., REHMAN, A. A spermine-resistant mutant of *Arabidopsis thaliana* displays precocious germination. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.20, p.235-40, 1998.
- MÓGOR, G., LIMA, G.P.P., PIZA, I.M.T., VILHENA, S.M.C. Efeito da benzilaminopurina (BAP) na propagação “in vitro” de yacon (*Polymnia sonchifolia* Poep. Endl.). **Acta Biologica Leopoldensia**, v.21, p.195-201, 1999.
- MURASHIGE, T. , SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473 – 97, 1962.
- MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue culture. **Annual Review of Plant Physiology**, v.25, p.135-66, 1974.
- NAG, S., SAHA, K., CHOUDHURI, M.A. Role of auxin and polyamines in adventitious root formation in relation to changes in compounds involved in rooting. **Journal of Plant Growth Regulation**, v.20, p. 182-194, 2001.
- NAKAMURA, M., SEIKI, M., FURUSAKI, S. Enhanced anthocyanin methylation by growth limitation in strawberry suspension culture. **Enzyme and Microbial Technology**, v.22, p. 404-08, 1998.

- NAS, M.N. Inclusion of polyamines in the medium improves shoot elongation in hazelnut (*Coryllus avellana* L.) micropropagation. **Turkian Journal of Agriculture**, v.28, p.189-194, 2004.
- NATALI, L., SANCHEZ, I.C., CAVALLINI, A. In vitro culture of *Aloe barbadensis* Mill.: Micropropagation from vegetative meristems. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.20, p.71-71, 1990.
- NEVES, C., SANTOS, H., VILAS-BOAS, L., AMÂNCIO, S. Involvement of free and conjugated polyamines and free amino acids in the adventitious rooting of micropropagated cork oak and grapevine shoots. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.40, p.1071-80, 2002.
- OLIVEIRA, M.C.C., CARVALHO, M.G., FERREIRA, D.T., FILHO, R.B. Flavonóides das flores de *Stiffitia chrysantha* Mikan, **Química Nova**, v.22, n.2, 1999.
- PEDREÑO, M.A., ROS-BARCELÓ, A., GRACIA-CARMONA, F., MUÑOZ, R. Oxidation of dihydroxyfumaric acid in the absence of H₂O₂ by cell-wall bound peroxidases from lupin: A possible general model. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.28, p.37-42, 1990.
- PIETTA, P.G., MAURI, P.L., MANERA, E., CEVA, P.L., RAVA, A. An improved HPLC determination of flavonoids in medicinal plant extracts. **Chromatographia**, v.27, p.509-12, 1989.
- PRATT, D.E., HUDSON, B.J.F. Natural antioxidants not exploited commercially. In: HUDSON, B.J.F. (Eds.) Food antioxidants. Amsterdam: **Elsevier**, 1990, 171 p.
- RAJAM, M.V. Polyamines. In: PRASAD, M.N.V. (Ed.). **Plant ecophysiology**. New York: J.Wiley, p.343-74, 1997.
- RAJASEKARAM, L.R., BLAKE, T.J. Early growth of jack pine seedlings by natural plant growth regulators. **Tree Physiology**, v.12, p.420-23, 1998.

- RAY, S.D. GA, ABA, phenol interaction in the control of growth: phenolics compounds as effective modulations of GA-ABA interactions in radish seedling. **Biologia Plantarum**, v.28, p. 361-69, 1986.
- RAWAL, S.K., MEHTA, A.R. Changes in enzymes activity and isoperoxidase in haploid tobacco callus during organogenesis. **Plant Science Letters**, v.24, p.67-77, 1982.
- REYNOLDS, T., DWECK, A.C. Aloe vera leaf gel: a review update. **Journal of Ethnopharmacology**, p.3-37, 1999.
- REY, M., TIBURCIO, A.F., DÍAZ-SALA, C., RODRÍGUEZ, R. Endogenous polyamine concentrations in juvenile, adult and in vitro reinvigorated hazel. **Tree Physiology**, v. 14, n. 2, p. 191-200, 1994.
- RICHWINE, A.M., TIPTON, J.L., THOMPSON, G.A. Establishment of *Aloe*, *Gasteria* and *Haworthia* shoot cultures from inflorescence explants. **HortScience**, v.30, p.1443-44, 1995.
- ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLE, V. E. Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology. **Baltimore: Williams & Wilkins**, p.53-54, 1996.
- ROBSON, M.C., HEGGERS, J.P., HAGSTROM, W.J. Myth, magic, withcraft or fact? Aloe vera revisited. **Journal of Burn Care and Rehabilitation**, p.157-63, 1982.
- ROY, S.C., SARKAR, A. In vitro regeneration and micropropagation of *Aloe vera* L. **Scientia Horticulturae**, p. 107-13, 1991.
- RUBEL, B.L. Possible mechanisms of the healing actions of aloe gel. **Cosmetics and Toiletries**, p. 109-14, 1983.

- RUGINI, E.; LUPPINO, M.; AGAZIO, M.; GREGO, S.; DE AGAZIO, M. Endogenous polyamine and root morphogenesis variations under different treatment in cutting and in vitro explants of olive. **Acta Horticulturae**, v.300, p.225-232, 1992.
- SANTOS, M.D., BLATT, C.T.T. Teor de flavonóides e fenóis totais em folhas de *Pyrostegia venusta* Miers. de mata e de cerrado. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 21, n. 2, p. 135-140, 1998.
- SARJALA, T., HAGGMAN, H., ARONEN, T. Effects of exogenous polyamines and inhibitors on growth and free polyamines of embryogenic *Scott pine* callus. **Journal of Plant Physiology**, v.150, p.597-602, 1997.
- SCHIMID, R. An old medicinal plant: *Aloe vera*. **Parfümerie und Kosmetik**, v. 72, n. 3, p. 146-150, 1991.
- SCOTT, E. A., DHUNDY, R.B., SUBHASH, C.M. Metabolism of polyamines in transgenic cells of carrot expressing a mouse ornithine decarboxylase cDna. **Plant Physiology**, v.116, p.299-307, 1998.
- SENA, J.O.A., CASTRO, P.R.C. Poliaminas: aspectos fisiológicos e importância para as plantas. 1996, 41 p. (**Apontamentos, 46**).
- SHELTON, R.M. aloe vera Its chemical and therapeutic properties. **International Journal of Dermatology**, p. 679-83, 1991.
- SILVA, J.M.O.D., ARAÚJO, P.S., NECKEL, C.A., IANSSEN, C., OLTRAMARI, A.C., PASSOS, R., TIEPO, E., BACH, D.B., MARASCHIN, M. Micropropagação de babosa. In: **Farmápolis**, 2000. Florianópolis: Sindfar, 2000.
- SILVA, C.G.; DEBIASI, C. Propagação massal de mudas de *Aloe vera* L. (babosa) via clonagem in vitro. **Programa de Incentivo a Pesquisa da Universidade Regional de Blumenau**, 2002, 62 p.

- SILVEIRA, V., FLOH, E.I.S., HANDRO, W., GUERRA, M.P. Effect of plant growth regulators on the cellular growth and levels of intracellular protein, starch and polyamines in embryogenic suspension cultures of *Pinus taeda*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v 76, p.53-60, 2004.
- SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A., PETROVICK, P. R. Farmacognosia – da planta ao medicamento. **Editora da Universidade e Editora da USC**.1999, 821 p.
- SKOOG, F., MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. **Symposia Society Experimental Biology**, v.11, p.118–31, 1957.
- SLOCUM, R.D., KAUR-SAWHNEY, R., GALSTON, A.W. The physiology and biochemistry of polyamines in plants. **Archives Biochemistry and Biophysics**., v.235, p.283-303, 1984.
- SMITH, P.M. The chemotaxonomy of plants. **Edward Arnold**, Bristol, 1976.
- SMITH, T.A. Polyamines. **Annual Review of Plant Physiol.**, v.36, p. 117-43, 1985.
- STANGARLIN, R. J., SCHWAN-ESTRADA, K. R. F., CRUZ, M. E. S., NOZAKI, M. H. Plantas Medicinais e controle alternativos de fitopatógenos. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 11, p.16-21, 1999.
- STARZYNSK, A., MARECZEK, A. Physiological changes in the antioxidant system of broccoli flower buds senescing during short-term storage, related to temperature and packaging. **Plant Science**, v.165, p.1387-95, 2003.
- STRICKLAND, F.M., PELLEY, R.P., KRIPKE, M.L. Prevention of ultraviolet radiation-induced suppression of contact and delayed hypersensitivity by *Aloe barbadensis* gel extract. **Journal of Investigative Dermatology**, p. 197-204, 1994.

- TAGLIACOZZO, G.M.D. Fitormônios e seus efeitos biológicos *in vivo* e *in vitro*. In: TOMBOLATO, A.F.C., COSTA, A.M.M. (Coords) **Micropropagação de plantas ornamentais**. Bol.Téc. Instit. Agron. Campinas, n.174, p.1-72, 1998.
- TAIZ, L., ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. **Artmed**, 3^a. ed., 2004, 719 p.
- TAKEDA, T., HAYAKAWA, F., OE, K., MATSUOKA, H. Effect of exogenous polyamines on embryogenic carrot cells. **Biochemical Engineering Journal**, v.12, p.21-28, 2002.
- TANG, W., NEWYON, R.J., OUTHAVONG, V. Exogenously added polyamines recover browning tissues into normal callus cultures and improve plant regeneration in pine. **Physiologia Plantarum**, v. 122, p.386-395, 2004.
- TARENGHI, E.; CARRÉ, M.; MARTIN-TANGUY, J. Effect of inhibitors of polyamine biosynthesis of polyamine on strawberry microcutting growth and development. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.42, p.47-55, 1995.
- TASSONI, A., von BUUREN, M., FRANCESCHETTI, M., FORNALE, S., BAGNI, N. Polyamine content and metabolin in *Arabidopsis thaliana* and effect of spermidine on plant development. **Plant Physiology Biochemistry**, v.36, p.383-93, 2000.
- TEIXEIRA, J.B. **Embriogênese somática**. Brasília: Embrapa-Cenargem, 1994, 7p.
- TESKE, M., TRENTINI, A.M.M. *Herbarium – Compêndio de Fitoterapia*. Curitiba : **Editora Herbarium Laboratório Botânico**, p. 35-37, 1994.
- TEUTONICO, R.A., DUDLEY, M.W., ORR, J.D., LYNN, D.G., BINNS, A.N. Activity and accumulation of cell division – promoting phenolics in tobacco tissue cultures. **Plant Physiology**, v. 97, p. 288-97, 1991.
- TRINDADE, H., PAIS, M.S. Meristematic nodule culture: a new pathway for *in vitro* propagation of *Eucalyptus globules*. **Trees - Structure and Function**, v.17, p.308-315, 2003.

- VIVIAN, C., ELLIOT, M., JEFFREY, H. **Plant Flavonoids in Biology and Medicine**, Alan R. Liss, Inc. New York, v.23, p.8, 1987.
- VOLPERT, R., OSSWALD, W., ETYSNER, E.F. Effects of cinnamic acids derivatives in indole acetic acid oxidation by peroxidase. **Phytochemistry**, v.38, p. 19-32, 1995.
- YU, B.P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiology Review** n. 74, p.139-62, 1994.
- WAGNER, G.R., YOUNGMAN, R.Y., ESTNER, E.F. Inhibitors of chloroplast photo-oxidation by flavonoids and mechanism of the antioxidative action. **Journal of Phytochemistry and Photobiology**, V. B 1, p.451-60, 1988.
- WALDEN, R., CORDEIRO, A., TIBURCIO, A.F. Polyamines: small molecules triggering pathways in plant growth and development. **Plant Physiology**, v.113, p.1009-13, 1997
- WALTERS, D.R. Polyamines and plant disease. **Phytochemistry**, v.64, p. 97–107, 2003.
- WALKER, G.C. Color determination frozen French beans (*Phaseolus vulgaris* L.) **Journal of Food Science**, v.29, n.4, p.383-88, 1964.
- WATERMAM, P.G., MOLE, S. Analysis of phenolic plant metabolites. **Blackwell Scientific Publications**, London., 1994.
- WEINER, M., WEINER, J.A. Herbs that heal. **Mill Valley**, Quantum Books, 1994.
- ZHANG, Z.T.; DU, Y.J.; LIU, Q.G.; LIU, Y. Determination of the antioxidative effect of *Aloe vera*. **Nature Products Research Development** , v.13, p.45-46, 2001.

8 - APÊNDICE