

# Efeitos da coloração dos explantes e da quantidade de compostos fenólicos totais na introdução *in vitro* de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.)

*Effects of colouring of the explants and quantity of total phenolic compounds on in vitro introduction of pitanga (Eugenia uniflora L.)*

Cassio Geremia Freire<sup>1</sup>, Bianca Schweitzer<sup>2</sup>, Leyza Paloschi de Oliveira<sup>1</sup>, Renato Luis Vieira<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Alto Vale do Rio do Peixe (UNIARP)

<sup>2</sup>Laboratório de Ensaio Químico, Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI), Estação Experimental de Caçador/SC

<sup>3</sup>Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI), Estação Experimental de Caçador/SC

cassio.geremia@uniarp.edu.br, biancaschweitzer@epagri.sc.gov.br, leyza@uniarp.edu.br, revieira@epagri.sc.gov.br

**Resumo.** A pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) é uma mirtácea nativa da Mata Atlântica e apresenta potencial na recuperação de ecossistemas degradados, na exploração de seus frutos comestíveis e como fonte de substâncias bioativas. A micropropagação desta espécie ainda requer aprimoramento em certas etapas para o estabelecimento de protocolos viáveis. Devido a isso, este trabalho teve como objetivo a introdução *in vitro* de pitangueira utilizando segmentos apicais e nodais obtidos de ramos de coloração verde e avermelhada. Os parâmetros avaliados aos 25 dias *in vitro* foram os percentuais de oxidação e estabelecimento dos explantes. Além disso, os compostos fenólicos totais de explantes verdes e avermelhados de pitangueira foram quantificados pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, utilizando uma curva padrão de quercetina, verificando a relação entre a quantidade de compostos fenólicos e as porcentagens de oxidação e estabelecimento dos explantes *in vitro*. Segmentos apicais de coloração verde de pitangueira apresentaram menor porcentagem de oxidação (25,00%) e maior porcentagem de estabelecimento *in vitro* (58,33%), se comparados aos de coloração avermelhada. Isso pode estar relacionado à quantificação de fenólicos totais, cujos valores foram de 835,22±77,27 µg EQ/g nos explantes avermelhados e 205,22±59,65 µg EQ/g nos explantes verdes, evidenciando que a maior quantidade de fenólicos totais em explantes avermelhados pode ter diminuído o seu sucesso na introdução *in vitro*. Os resultados permitiram concluir que, para o estabelecimento *in vitro* de pitangueira, deve-se utilizar explantes de coloração verde e de origem apical, devido a sua menor quantidade de compostos fenólicos totais, menor oxidação e maior estabelecimento.

**Palavras-chave:** Mata Atlântica, Myrtaceae, oxidação, estabelecimento *in vitro*, citocinina.

**Abstract.** The pitanga (*Eugenia uniflora* L.) is a native Myrtaceae from the Atlantic Forest and has potential in the recovery of degraded ecosystems, in the exploration of its edible fruit and as the source of bioactive substances. The micropropagation of this species still requires improvement in certain steps for establishing viable protocols. Due to this reason, the present work aimed the *in vitro* introduction of pitanga using apical segments and nodal obtained of branches of green and reddish coloring. The

**InterfacEHS** – Saúde, Meio Ambiente e Sustentabilidade

Vol. 13 no 2 – Dezembro de 2018, São Paulo: Centro Universitário Senac

ISSN 1980-0894

Portal da revista InterfacEHS: <http://www3.sp.senac.br/hotsites/blogs/InterfacEHS/>

E-mail: [interfacehs@sp.senac.br](mailto:interfacehs@sp.senac.br)

Esta obra está licenciada com uma Licença [Creative Commons Atribuição-Não Comercial-Sem Derivações 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/) 

parameters evaluated at the 25<sup>th</sup> day *in vitro* were the percentages of oxidation and establishment of explants. Furthermore, the total phenolic compounds of green and reddish explants of Surinam cherry were quantified by the colorimetric method of Folin-Ciocalteu, using a default curve of quercetin, verifying the relationship between the amount of phenolic compounds and oxidation percentage and establishment of the explants *in vitro*. Green apical segments of pitanga showed lower oxidation percentage (25.00%) and higher establishment percentage (58.33%) if compared to the reddish explants. This may be related to the quantification of total phenolics, with values of  $835.22 \pm 77.27 \mu\text{g EQ/g}$  in the reddish explants and  $205.22 \pm 59.65 \mu\text{g EQ/g}$  in the green explants, showing that the highest amount of phenolic totals in a reddish explant can lower its successful introduction *in vitro*. The results made us conclude that, for the *in vitro* establishment of pitanga, we should use explants of the greenish coloration and of apical origin, due to its smaller amount of total phenolic compounds, lower oxidation and higher establishment.

**Key words:** *Surinam cherry, Myrtaceae, oxidation, in vitro establishment, cytokinin.*

## 1. Introdução

A pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) é uma espécie nativa da Mata Atlântica, encontrada em remanescentes deste bioma no Brasil (VIBRANS, 2013), e em outros países da América do Sul, como Argentina, Paraguai e Uruguai (MMA, 2010). É a espécie mais representativa do gênero *Eugenia*, família Myrtaceae, e apresenta grande importância nos setores ambiental, alimentício, farmacológico e de cosméticos (ALMEIDA *et al.*, 2012). A pitangueira é um arbusto ou árvore pequena, variando de dois a dez metros de altura, cujos ramos apresentam folhagem persistente ou semidecídua de coloração verde-amarronzada à avermelhada (LORENZI, 2008).

Devido a grande produção de flores e frutos, a pitangueira apresenta importância ecológica em programas de recuperação de ecossistemas degradados (EMBRAPA, 2006). Esta espécie é utilizada como árvore nucleadora nestes ambientes, pois atrai insetos para a polinização de suas flores, além de disponibilizar alimento e servir de abrigo para uma vasta fauna que dispersa suas sementes, como aves (SNOW, 1981; JORDANO, 2000), mamíferos carnívoros, lagartos, macacos e morcegos (GRESSLER *et al.*, 2006, EMBRAPA, 2006). Possui potencial no setor farmacológico (DE OLIVEIRA *et al.*, 2012; COUTINHO *et al.*, 2010), pois apresenta substâncias bioativas com atividades antidiarréica, antitérmica, diurética (SANCHOTENE, 1985; ROTMAN, 1995), hipotensora (CONSOLINI *et al.*, 1999, CONSOLINI; SARUBBIO, 2002) e vassorelaxante (WAZLAWIK *et al.*, 1997). Seus frutos comestíveis apresentam alto valor nutricional (TACO, 2011) e são ingeridos *in natura* ou processados na forma de geleias e xapores (VILLACHIA *et al.*, 1996), além disso, suas folhas podem ser esmagadas e utilizadas como repelentes naturais de insetos (NEVES; DONATO, 1989).

Por ser considerada importante ecológica e economicamente (ALMEIDA *et al.*, 2012), a pitangueira é listada pelo Ministério do Meio Ambiente do Brasil como uma espécie nativa que possui potencial imediato ou futuro de utilização nos setores alimentício (KINUPP, 2011), apícola (FALKENBERG; SIMÕES, 2011) e medicinal para a região Sul brasileira (REIS; SIMINSKI, 2011). Além disso, o Ministério da Saúde lista a pitangueira como uma das plantas medicinais de interesse para utilização em programas do Sistema Único de Saúde (SUS), através do RENISUS - Relação nacional de plantas medicinais de interesse ao SUS (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014), além de constar na Farmacopeia Brasileira, como um importante medicamento fitoterápico para diferentes moléstias (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

O principal método de propagação da pitangueira é por via seminal (LORENZI, 2008), entretanto há problemas associados à produção de mudas através de sementes devido ao alto teor de umidade e o caráter recalcitrante das mesmas (SENA *et al.*, 2010). Estes fatores contribuem para que ocorra a diminuição rápida da viabilidade germinativa e a deterioração das sementes (ROBERTS, 1973). Deste modo, estudos micropropagativos da pitangueira vêm sendo desenvolvidos com o intuito de produzir um método rápido e eficaz de produção de mudas saudáveis e que facilitem a exploração sustentável desta espécie em diferentes setores (OLIVEIRA *et al.*, 2013; PASQUAL *et al.*, 2012; EMBRAPA, 2006).

Um dos principais fatores que influencia diretamente no estabelecimento de espécies nativas *in vitro*, como a pitangueira, é a alta taxa de oxidação de compostos fenólicos presentes nelas (PASQUAL *et al.*, 1998). Compostos fenólicos são substâncias bioativas, pertencentes a um grupo diverso de metabólitos secundários, que são produzidos de forma ampla pelos vegetais, significativamente em plantas arbóreas e lenhosas (SALISBURY; ROSS, 1991). Estes compostos fitoquímicos são extremamente relevantes aos vegetais, pois possuem importante papel na regulação

oxidativa do ácido indolacético (AIA), principal auxina natural das plantas (GEORGE *et al.* 2008), são precursores na síntese da lignina (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998) e atuam na defesa à micro-organismos patógenos (AGRIOS, 1997). Pode-se citar ainda, a grande propriedade dos compostos fenólicos como agentes antioxidantes (ROBARDS *et al.*, 1999), possuindo diversas potencialidades científicas nos setores alimentício, médico e farmacológico, além da importância destes compostos em processos ecológicos de relação planta-solo-micro-organismos (SIQUEIRA *et al.*, 1991a; SIQUEIRA *et al.*, 1991b).

Segundo George *et al.* (2008), nas regiões seccionadas para a formação dos explantes, há o escurecimento tecidual que, em muitos casos, espalha-se para o meio de cultura. Este escurecimento dos tecidos vegetais ocorre devido à ação de uma classe de enzimas genericamente denominadas oxidases, que são liberadas, sintetizadas ou presentes anteriormente no substrato quando os tecidos são feridos ou tornam-se senescentes (TAIZ; ZEIGER, 2013). Normalmente as enzimas encontram-se retidas e latentes em membranas e em vacúolos celulares, sendo liberadas e iniciando sua atividade quando os tecidos são injuriados ou tornam-se doentes, como ocorre na excisão do tecido para a produção de explantes (DODDS; ROBERTS, 1995). Esta classe de enzimas atua sobre compostos fenólicos, alterando-os quimicamente e ocasionando problemas fitotóxicos aos explantes que cessam parcial ou totalmente o seu desenvolvimento (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo a introdução *in vitro* de pitangueira (*E. uniflora*) utilizando explantes seccionados de diferentes gemas e que apresentavam colorações verde e avermelhada. A quantificação dos compostos fenólicos totais também foi realizada nos explantes de colorações verde e avermelhada, investigando a relação entre a concentração destas substâncias nos explantes e as porcentagens de oxidação e estabelecimento dos mesmos *in vitro*.

## 2. Material e Métodos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, pertencente à Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI), Estação Experimental de Caçador/SC e no Laboratório de Pesquisa Farmacêutica, pertencente à Universidade Alto Vale do Rio do Peixe (UNIARP), Campus de Caçador/SC.

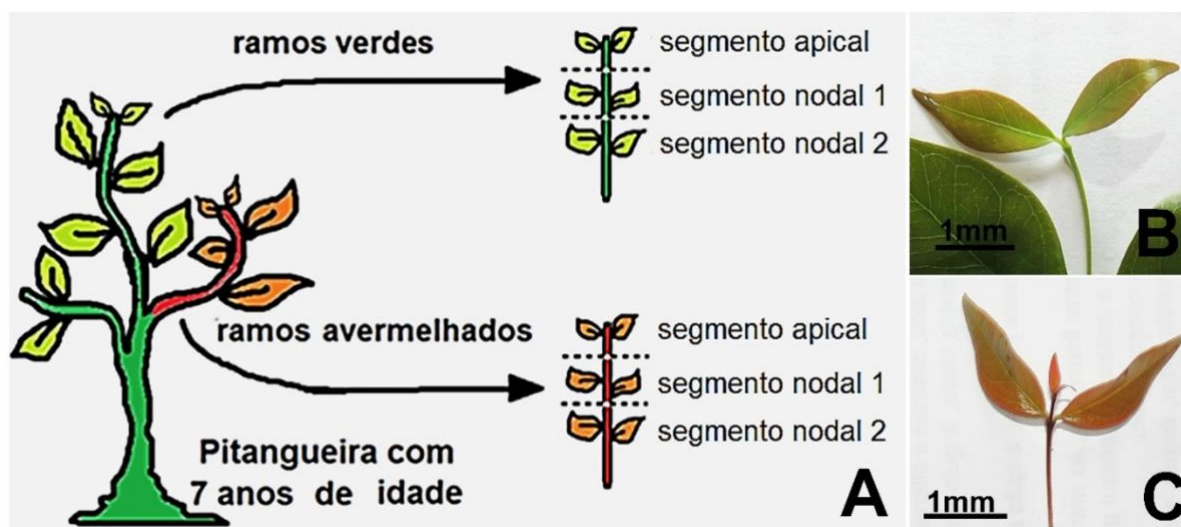
### 2.1 Obtenção dos explantes

Para os experimentos de introdução *in vitro* e de quantificação de compostos fenólicos, foi utilizada uma planta matriz de pitangueira com aproximadamente sete anos de idade, localizada na Estação Experimental da EPAGRI de Caçador/SC (latitude 26°46'S, longitude 51° W, altitude 960 metros). A árvore estudada encontra-se exposta as condições naturais sem qualquer tipo de irrigação adicional, interferência de sombreamento ou tratamentos com fungicida, bactericida ou outros. Segundo classificação de Köppen, o clima na região de cultivo é classificado como Cfb – temperado constantemente úmido, com verão ameno. A média da precipitação pluvial anual é de 1653,2 mm e a umidade relativa do ar média é de 77,9%.

Ramos herbáceos em processo de crescimento e que apresentavam coloração verde e avermelhada foram utilizados para a obtenção dos explantes (Figura 1). Estes foram seccionados da mesma região da árvore e imediatamente levados ao

laboratório para a execução dos experimentos. Os diferentes explantes utilizados foram compostos por segmentos apicais e nodais, como demonstrado na Figura 1.

**FIGURA 1. Diferentes tipos de explantes utilizados na introdução *in vitro* de pitangueira**



Legenda: A, esquema representativo da obtenção dos ramos de diferentes colorações. B, ramos de coloração verde. C, ramos de coloração avermelhada.

**Fonte: os autores.**

## 2.2 Quantificação de compostos fenólicos totais

Com o intuito de averiguar a relação entre as porcentagens de oxidação e estabelecimento *in vitro* com os níveis de compostos fenólicos de ramos herbáceos de pitangueira (*E. uniflora*), foi realizada a quantificação de compostos fenólicos totais em explantes de colorações verde e avermelhada (Figura 1), sendo todas as análises realizadas em triplicata. Para isso, todas as folhas dos explantes foram retiradas e realizou-se a pesagem das amostras. Após maceração, as amostras foram cobertas com água destilada e armazenadas por seis dias em ausência de luz.

As concentrações de compostos fenólicos totais presentes nos explantes foram determinadas de acordo com o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (Folin-C) (SINGLETON; ROSSI, 1965), utilizando quercetina como substância de referência (IVANOVA *et al.*, 2005). As amostras foram diluídas em água destilada na proporção 1:9. Foi pipetado 0,5 mL da amostra diluída e adicionados 5 mL do reagente Folin-C. Em seguida, foram adicionados 4,5 mL de solução saturada de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,707 mol  $\text{L}^{-1}$ ). As amostras permaneceram no escuro por 90 minutos e a leitura foi realizada em espectrofotômetro UV (Spectrum SP-2000UV) em 765 nm. Os resultados obtidos foram expressos como micrograma equivalente em quercetina por grama de explante ( $\mu\text{g EQ/g}$ ).

## 2.3 Introdução *in vitro*

Os diferentes tipos de explantes foram imersos em etanol 70% v/v por 50 segundos e em seguida imersos por 15 minutos em  $\text{NaClO}$  1,5% com adição de solução detergente Tween® 20 (10 gotas  $\text{L}^{-1}$ ). Posteriormente os explantes foram lavados três vezes em água destilada estéril. Foi utilizado o meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com a metade da concentração salina (MS/2), 30 g  $\text{L}^{-1}$

de sacarose e acrescido de 0,2 mg L<sup>-1</sup> de 6-benzilaminopurina (BAP), em pH ajustado de 5,8±0,05 (a 25±0,5°C). Solidificou-se o meio pela adição de 6 g L<sup>-1</sup> de ágar e a esterilização do mesmo foi feita por autoclavagem pelo tempo de 16 minutos a 121°C e 1,5 atm. Após a introdução dos explantes, os frascos foram mantidos em câmara de crescimento e expostos a um fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 75 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, à 25±2°C.

Foi utilizado delineamento experimental inteiramente casualizado. A diferença dos tratamentos deu-se unicamente pela distinção dos ramos verdes e avermelhados e de qual segmento foi constituído o explante (apical ou nodais), totalizando 6 tratamentos distintos (Figura 1). Cada tratamento foi constituído por seis repetições, onde cada repetição foi composta por um frasco contendo quatro explantes.

Os parâmetros avaliados aos 25 dias após a introdução *in vitro* foram os percentuais de oxidação e de estabelecimento dos explantes. Foi considerado oxidado o explante parcial ou totalmente escurecido por processos oxidativos, e estabelecido o explante que manteve a coloração inicial e que apresentava formação de pelo menos uma brotação, mesmo que este estivesse parcialmente oxidado ou contaminado.

## 2.4 Análises estatísticas

A normalidade dos resultados obtidos foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk ( $p < 0,05$ ), seguida de análise de variância (ANOVA). Posteriormente as médias dos tratamentos foram comparadas estatisticamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,01$ , no experimento de quantificação de compostos fenólicos) e ( $p < 0,05$ , no experimento de introdução *in vitro*), através dos softwares Microsoft Excel® 2013 e Assistat® 7.7 beta (SILVA; AZEVEDO, 2009).

## 3. Resultados

### 3.1 Quantificação de compostos fenólicos totais

Foi verificado que explantes obtidos de ramos de coloração verde e avermelhada diferem significativamente ( $p < 0,01$ ) quanto a quantidade endógena de compostos fenólicos totais, como pode ser observado na Tabela 1. Mesmo sendo obtidos da mesma região da árvore e expostos às mesmas condições ambientais (Figura 1), os explantes de coloração avermelhada apresentaram cerca de quatro vezes mais compostos fenólicos em comparação aos explantes de coloração verde (Tabela 1). Tais resultados são inéditos na literatura científica e podem servir como base de estudo para a introdução *in vitro* de outras mirtáceas que também apresentam ramos de diferentes colorações, como o araçazeiro (*Psidium cattleianum* Sabine) e a uvaieira (*Eugenia pyriformis* Cambess), por exemplo.

**TABELA 1.** Quantificação de fenólicos totais em explantes de pitangueira (*Eugenia uniflora*) excisados de brotações verdes e avermelhadas.

<b>Tipo de explante</b>	<b>Fenólicos totais (μg EQ/g) ± σ*</b>
Verdes	205,22 ± 59,65 b
Avermelhados	835,22 ± 77,27 a

\*Micrograma equivalente em quercetina por grama de explante ± desvio padrão. Médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,01$ ).

### 3.2 Introdução *in vitro*

Após 25 dias *in vitro* foi observado que as menores taxas de oxidação foram obtidas nos explantes de coloração verde, com 25,00% e 37,50% para o segmento apical e o primeiro segmento nodal, respectivamente (Tabela 2). O segundo segmento nodal verde e os segmentos de coloração avermelhada apresentaram porcentagens de oxidação duas a três vezes maiores se comparadas com os demais segmentos verdes (Tabela 2).

Verificou-se que a porcentagem de estabelecimento dos explantes de coloração verde (média de 33,33%) foi maior que a dos explantes de coloração avermelhada (média de 0%) (Tabela 2). Além disso, também foi verificado que não houve diferença entre a utilização dos diferentes segmentos avermelhados, já que todos apresentaram porcentagens de oxidação acima de 87% e nenhum estabelecimento *in vitro* (Tabela 2).

**TABELA 2.** Porcentagem de oxidação e estabelecimento de explantes de pitangueira (*Eugenia uniflora*) excisados de brotações verdes e avermelhadas, após 25 dias *in vitro*, e a partir de diferentes gemas.

	<b>Explantes</b>	<b>Oxidação (%)</b>	<b>Estabelecimento (%)</b>
<b>Verdes</b>	Segmento apical	25,00 b	58,33 a
	Segmento nodal 1	37,50 b	37,50 a
	Segmento nodal 2	70,83 a	4,17 b
<b>Avermelhados</b>	Segmento apical	95,83 a	0,00 b
	Segmento nodal 1	95,83 a	0,00 b
	Segmento nodal 2	87,50 a	0,00 b

Médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

## 4. Discussão

Não foram encontrados registros de determinação de compostos fenólicos totais nos explantes de pitangueira como realizado no presente trabalho, mas a quantificação foliar destes compostos já foi determinado através da utilização de diferentes padrões. Garmus *et al.* (2013), por exemplo, quantificaram um valor médio aproximado de 110 mg CE/g (mg equivalente de catequina por g de extrato seco) em extratos aquosos. Já Santo *et al.* (2011) estudaram a influência sazonal e das condições climáticas (pluviosidade, umidade, nebulosidade e temperatura média) sobre a quantificação de compostos fenólicos totais em extratos acetoaquosos (acetona:água a 7:3 v/v). Estes autores verificaram uma variação de  $96,50 \pm 0,79$  em maio de um ano à  $63,60 \pm 0,69$  mg/g de extrato<sup>-1</sup> em abril do ano subsequente.

As diferentes concentrações de compostos fenólicos em explantes verdes e avermelhados, observado no presente trabalho, podem estar relacionados a diferentes fatores. Sabe-se que diferentes classes de compostos fenólicos são importantes aos vegetais, pois atuam na síntese de lignina e oxidação de auxinas, por exemplo (TAIZ; ZEIGER, 2013). Além disso, tais compostos podem ainda ser convertidos

quimicamente em moléculas muito reativas, como radicais de oxigênio, que apresentam alta toxicidade (HARTLEB *et al.* 1997) e podem atuar na defesa da planta contra patógenos (AGRIOS, 1997). Acredita-se, deste modo, que ramos avermelhados de pitangueira contenham maior quantidade de compostos fenólicos que os de coloração verde, pois podem apresentar processos metabólicos mais intensos ou possuir maior defesa contra micro-organismos patógenos. Tais informações não estão bem definidas na literatura para a pitangueira ou outras mirtáceas e fatores envolvidos nestes processos necessitam de maiores estudos em diferentes áreas para uma maior compreensão dos mesmos.

Ainda de acordo com o observado no presente trabalho, a maior quantidade de compostos fenólicos totais presentes em explantes avermelhados (Tabela 1) pode ter sido um fator determinante na maior porcentagem de oxidação *in vitro* (média de 93%) destes explantes em relação aos explantes verdes (Tabela 2). A presença de compostos fenólicos também pode ter diminuído a porcentagem de estabelecimento *in vitro*, pois o escurecimento dos tecidos vegetais é derivado da alteração de moléculas (TAIZ; ZEIGER, 2013) e ocasiona problemas fitotóxicos como a inibição do crescimento e a morte dos explantes (MONACO *et al.*, 1977).

Sabe-se que os compostos fenólicos presentes nos tecidos entram em contato com enzimas oxidases e com o ar quando estes são excisados para a produção dos explantes. O escurecimento tecidual observado *in vitro*, característico do processo de oxidação, é derivado da ação enzimática de peroxidases e polifenoloxidases sobre compostos fenólicos exsudados pelos explantes, ocorrendo a formação oxidativa de quinonas (MACHEIX *et al.*, 1986; BINDSCHEDLER *et al.*, 2002) e compostos reativos de oxigênio (HARTLEB *et al.*, 1997). Estes últimos compostos são extremamente tóxicos e podem atuar na morte de patógenos, mecanismo utilizado como defesa pelo vegetal, ou mesmo na degradação de substâncias dos próprios explantes (HARTLEB *et al.*, 1997), o que ocasiona a redução ou ausência de resposta morfogênica *in vitro* (YU; MEREDITH, 1986).

Estudos de Herman e Hess (1963) e Junior *et al.* (1999) corroboram com o observado no presente trabalho. Para estes autores, a maior taxa de compostos fenólicos presente em determinado tipo de explantes também aumentou sua oxidação e diminuiu o estabelecimento *in vitro* dos mesmos.

Associada à quantificação de compostos fenólicos totais, a coloração dos explantes também evidenciou ser determinante na introdução *in vitro* de pitangueira. Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que a introdução de segmentos apicais de ramos verdes diminui a ocorrência de processos oxidativos, possibilitando maior porcentagem de estabelecimento quando comparadas aos explantes obtidos a partir do segundo segmento apical de coloração verde ou explantes de coloração avermelhada. Diferentemente disso, Golle *et al.* (2012), ao estabelecer segmentos apicais e nodais de cerejeira-do-mato (*Eugenia involucreta*, Myrtaceae) em distintos meios de cultura (MS, ½MS e WPM), evidenciaram que os segmentos nodais apresentaram menor oxidação fenólica (15,74%) se comparados aos segmentos apicais (38,33%). Os referidos autores citam que a maior oxidação observada nos segmentos apicais pode ter ocorrido devido às injúrias sofridas durante os mecanismos de desinfestação, pois estes explantes são mais frágeis que os nodais.

Já Lattuada (2010) evidenciou, após 50 dias de cultivo, altos valores de oxidação fenólica (média de 60%) ao utilizar microestacas de pitangueira desinfestadas com soluções de tetraciclina diluída em ácido ascórbico ou etanol e introduzidas *in vitro* em meio MS. Este autor verificou ainda que nos tratamentos em que houve oxidação acima de 65% não foi observada sobrevivência dos explantes. Esta mesma porcentagem de oxidação foi observada por Paim (2011) após 60 dias de cultivo, utilizando segmentos apicais caulinares obtidos a partir de plântulas germinadas *in vitro* de cerejeira-do-mato e introduzidos em meio de cultura MS.



Segundo estes autores, a alta porcentagem de oxidação tanto na cerejeira-do-mato quanto na pitangueira foi um dos principais fatores relacionados a não sobrevivência *in vitro* dos explantes.

De modo semelhante, no presente trabalho foi possível observar que com o aumento da porcentagem de oxidação dos explantes de pitangueira *in vitro* houve uma redução do estabelecimento (Tabela 2). Nos tratamentos em que foram obtidos valores acima de 87% de oxidação fenólica não houve estabelecimento de nenhum dos explantes, o que pode ter ocorrido pela fitotoxicidade das reações oxidativas e ao completo escurecimento dos tecidos, fatores inibitórios de respostas morfogênicas *in vitro* (GEORGE *et al.*, 2008). Verificou-se ainda uma correlação fortemente negativa ( $r^2 = -0,927$ ) entre a oxidação e o estabelecimento *in vitro* dos explantes de pitangueira, o que sugere a importância do controle da oxidação fenólica como um dos principais fatores no desenvolvimento de processos micropropagativos desta espécie.

A utilização de segmentos apicais e nodais também é conhecida como um fator que influencia diretamente no desenvolvimento de explantes *in vitro* (PEREIRA; FORTES, 1999). No presente trabalho, por exemplo, em ramos de coloração verde foi observada uma redução do estabelecimento e um aumento da oxidação do segmento apical aos mais basais. Este fenômeno também observado por Murashige (1974) para o tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), mas difere dos determinados por Nicoloso & Erig (2002) para o ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*) e por San Jose *et al.* (1988) para o carvalho-vermelho (*Quercus robur* L.), por exemplo. Para estes últimos dois autores, segmentos nodais mais basais produziram melhores respostas *in vitro* como estabelecimento, produção de brotos e rizogênese, se comparados aos apicais.

## 5. Conclusões

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram concluir que para o estabelecimento *in vitro* de pitangueira (*Eugenia uniflora*), deve-se utilizar explantes de coloração verde e seccionados da primeira gema, devido a sua menor quantidade de compostos fenólicos totais, menor oxidação e maior estabelecimento.

## Agradecimentos

À M.Sc. Talize Foppa, coordenadora do curso de Farmácia da Universidade Alto Vale do Rio do Peixe, pela disponibilização de reagentes para a técnica de quantificação de compostos fenólicos totais.

## Referências

- AGRIOS, G.N. Plant pathology. San Diego: Academic Press, 1997. 635p.
- ALMEIDA, D.J., FARIA, M.V.; SILVA, P.R. Biologia experimental em pitangueira: uma revisão de cinco décadas de publicações científicas. *Âmbiência Guarapuava* (PR), Guarapuava, 8(1):177-193, jan./abr., 2012.
- BINDSCHEDLER, L.F., BLEE, K.A., BUTT, V.S., DAVIES, D.R., GARDNER, S.L., GERRISH, C., MINIBAYEVA, F. The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a threecomponent system. **Journal of Experimental Botany**, 53:1357-1376, 2002.

CONSOLINI, A.E., BALDINI, O.A.N.; AMAT, A.G. Pharmacological basis for the the empirical use of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) as antihypertensive. **Journal of Ethnopharmacology**, 66: 33-39, 1999.

CONSOLINI, A.E.; SARUBBIO, M.G. Pharmacological effects of *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) aqueous crude extract on rats heart. **Journal of Ethnopharmacology**, 81:57-63, 2002.

COUTINHO, H.D., COSTA, J.G.M., JUNIOR, J.P.S.; LIMA, E.O. *In vitro* screening by phototoxic properties of *Eugenia uniflora* L., *Momordica charantia* L., *Mentha arvensis* L. and *Turnera ulmifolia* L. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, 8(3): 299-301, jul./set. 2010.

DE OLIVEIRA, A.P., RIBEIRO, E.A.N., ALMEIDA, J.R.G.S., QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; SANTOS, M.R.V. Plantas medicinais da flora brasileira utilizadas para o tratamento de doenças vasculares. In: **Farmacognosia: coletânea científica**. DE SOUZA, G.H.B., DE MELLO, J.C.P., LOPES, N.P. (organ.). Ouro Preto: UFOP, 2012. p.251-269.

DODDS, J.H.; ROBERTS, L.W. **Experiments in plant tissue culture**. 3. ed. Cambridge University Press, Nova York, 1995. 256 p.

EMBRAPA. **Espécies nativas recomendadas para recuperação ambiental no estado do Paraná, em solos não degradados**. Antonio Aparecido Carpanezi, Odete T. Bertol Carpanezi. – dados eletrônicos. - Colombo: Embrapa Florestas, 2006. 57 p.

FALKENBERG, D.B.; SIMÕES, T. Espécies de interesse apícola e sua fenologia de floração. In: CORADIN, L., SIMINSKI, A., REIS, A. **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro - região Sul**. Brasília: MMA, 2011. 934 p.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. **Pitangueira: *Eugeniae folium***. v. 2 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010. 904 p.

GARMUS, T.T., PAVIANI, L.C.; CABRAL, F.A. Extracts from Pitanga leaves (*Eugenia uniflora* L.) with sequential extraction in fixed bed using supercritical CO<sub>2</sub>, ethanol and water as solvents. **III Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids Cartagena de Indias (Colombia)**, 2013.

GEORGE, E.F., HALL, M.A.; DE KLERK, G. (Eds.). **Plant propagation of tissue culture**. vol.1: The background. 3th ed. Springer, 2008. 502p.

GOLLE, D.P., REINIGER, L.R.S., CURTI, A.R.; LEÓN, E.A.B. Estabelecimento e desenvolvimento *in vitro* de *Eugenia involucrata* DC.: influência do tipo de explante e do meio nutritivo. **Ciência Florestal**, Santa Maria, 22(1): 207-214, 2012.

GOVAERTS, R., SOBRAL, M., ASHTON, P., BARRIE, F., HOLST, B.K., LANDRUM, L.L., MATSUMOTO, K., MAZINE, F.F., NIC LUGHADHA, E., PROENCA, C., SOARES-SILVA, L.H., WILSON, P.G.; LUCAS, E. **World Checklist of Myrtaceae**. London: Kew Publishing. 2008.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A. C., CALDAS, L.S. & BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: SPI/Embrapa – CNPH. 1:183-260, 1998.

GRESSLER, E.; PIZO, M. A.; MORELLATO, P. C. Polinização e dispersão de sementes em Myrtaceae do Brasil. **Revista Brasil. Bot.**, v.29, n.4, p.509-530, out./dez., 2006.

HERMAN, D.E.; HESS, C.E. The effect of etiolation upon the rooting of cuttings. **Proceedings of International Plant Propagation Society**, 13:42-62, 1963.

IVANOVA, D., GEROVA, D., CHERVENKOV, T., YANKOVA, T. Polyphenols and antioxidant capacity of bulgarian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, 96:145-150, 2005. DOI:10.1016/j.jep.2004.08.033.

JORDANO, P. Fruits and frugivory. In: Fenner, M. (ed.). **Seeds: the ecology of regeneration in plant communities**. 2nd ed. CABI. Publ., Wallingford, UK. p. 125-166, 2000.

JUNIOR, J.G.C., BIANCHI, V.J., STRELOW, E.Z., BACARIN, M.A.; FACHINELLO, J.C. Influência do sombreamento sobre os teores de carboidratos e fenóis em estacas semilenhosas de araçazeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, 34(12):2219-2223, 1999.

KINUPP, V.F. Espécies alimentícias nativas da região Sul do Brasil. In: CORADIN, L., SIMINSKI, A.; REIS, A. **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro - região Sul**. Brasília: MMA, 2011. 934 p.

LATTUADA, D.S. **Micropropagação e miniestaquia de pitangueira (*Eugenia uniflora*)**. 2010. 75 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. v.1. 5. ed. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, 2008. 368 p.

MACHEIX, J.J., FLEURIET, A.; QUESSADA, M.P. Involvement of phenols and peroxidases in wound healing and grafting. In: GREPPIN, H., PENEL, C. & GASPAR, T. (Ed.). **Molecular and physiological aspects of plant peroxidases**. Geneva: University of Geneva, 1986. p. 267-286.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (Rennis)**. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/07/renisus.pdf>>. Acessado em jan. 2019.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE – MMA. **Mata Atlântica: Patrimônio Nacional dos Brasileiros**. Secretaria de Biodiversidade e Florestas. Núcleo Mata Atlântica e Pampa, organizadores Maura Campanilli & Wigold Bertoldo Schaffer. – Brasília: MMA, 2010. 408 p.

MONACO, L.C., SÖNDAHL, M.R.; CARVALHO, A. *et al.* Applications of tissue culture in the improvement of coffee. In: REINERT, J., BAJAJ, Y.P.S. **Applied**

**and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture**, Berlin: Springer-Verlag, p. 109-126, 1977.

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

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, 25: 135-166, 1974.

NEVES, L.J.; DONATO, A.M. Contribuição ao estudo de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae). **Bradea**, Rio de Janeiro. 5(25):273-286, 1989.

NICOLOSO, F.T.; ERIG, A.C. Efeito do tipo de segmento nodal e tamanho do recipiente no crescimento de plantas de *Pfaffia glomerata in vitro*. **Ciência agrotecnológica**, Lavras. Edição Especial, p. 1499-1506, dez., 2002.

OLIVEIRA, L.S., DIAS, P.C.; BRONDANI, G.E. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, 33(76): 439-453, out./dez. 2013.

PAIM, A.F. **Contribuições para a micropropagação de *Eugenia involucrata* Dc. e *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. Ex Dc.) Mattos**. 2011. 81p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

PASQUAL, M., CHAGAS, E.A., SOARES, J.D.R.; RODRIGUES, F.A. Tissue culture techniques for native Amazonian fruit trees. In: LEVA, A. & RINALDI, L.M.R. **Recent advances in plant in vitro culture**. Intech, 2012. 220 p. DOI: 10.5772/52760.

PASQUAL, M., HOFFMANN, A.; RAMOS, J.D. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações** – introdução: fundamentos básicos. Lavras: UFLA/FAEPE, 1998. 159 p.

PEREIRA, J.E.S.; FORTES, G.R. de L. Efeito do uso de segmentos basais e apicais na multiplicação in vitro da macieira. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 7, 1999, Brasília. **Resumos...** Brasília, SBFS, 1999. p. 90.

REIS, M.S.; SIMINSKI, A. Espécies medicinais nativas da região Sul do Brasil. In: CORADIN, L., SIMINSKI, A.; REIS, A. **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro - região Sul**. Brasília: MMA, 2011. 934 p.

ROBARDS, K., PRENZLER, P.D., TUCKER, G., SWATSITANG, P.; GLOVER, W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. **Food Chemistry**, 66: 401-436, 1999.

ROBERTS, E.H. Predicting the storage life of seed. **Seed Science and Technology**, 1(3): 499-514, 1973.

ROTMAN, A.D. Las species argentinas del género *Eugenia* (Myrtaceae). In: **Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica, Córdoba**, 31(1-2): 69-93, 1995.

SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. **Plant physiology**. 3. ed. Belmont: Wadsworth, 1991. 692p.

SANCHOTENE, M.C.C. **Frutíferas nativas úteis à fauna na arborização urbana**. Porto Alegre: FEPAM, 1985. 71p.

SAN JOSE, M.C., BALLESTER, A.; VIEITEZ, A.M. Factors affecting in vitro propagation of *Quercus robur* L. **Tree Physiology**, Victoria, 4: 281-290, 1988.

SANTOS, R.M., OLIVEIRA, M.S., FERRI, P.H.; SANTOS, S.C. Seasonal variation in the phenol content of *Eugenia uniflora* L. leaves. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, 13(1): 85-89, 2011.

SENA, L.H.M., MATOS, V.P.M., SALES, A.G.F. A., FERREIRA, E.G.B.S.; PACHECO, M.V. Qualidade fisiológica de sementes de pitangueira submetidas a diferentes procedimentos de secagem e substratos - Parte 2. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, 14(4): 412-417, 2010.

SILVA, F. de A.S.; AZEVEDO, C.A.V. de. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, Reno-NV-USA: **American Society of Agricultural and Biological Engineers**, 2009.

SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, 16: 144-158, 1965.

SIQUEIRA, J.O., NAIR, M.G., HAMMERSCHIMIDT, R.; SAFIR, G.R. Significance of phenolic compounds in plant-soil-microbial systems. **Critical Review in Plant Science**, 10(1): 63-121, 1991a.

SIQUEIRA, J.O., SAFIR, G.R.; NAIR, M. G. Stimulation of vesicular- arbuscular mycorrhiza formation and growth of white clover by flavonoid compounds. **New Phytologist**, 118(1):87-93,1991b.

SNOW, D.W. Tropical frugivorous birds and their food plants: a world survey. **Biotropica**, 13:1-14, 1981.

TACO. **Tabela brasileira de composição de alimentos**. NEPA – UNICAMP.- 4 ed. rev. e ampl. – Campinas: NEPA- UNICAMP, 2011. 164 p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Armando Molina Divan Junior, et al.(trad.). Paulo Luiz de Oliveira (rev. tecn.). 5th ed., Porto Alegre: Artmed, 2013. 918p.

VIBRANS, A.C. Floresta ombrófila mista. In: **Inventário florístico florestal de Santa Catarina**. Editores Alexander Christian Vibrans ... [et al.]. v. 3, Blumenau, Edifurb. 2013. 440 p.

VILLACHIA, H., CARVALHO, J.E.U., MÜLLER, C.H., DIAZ, S.C.; ALMANZA, M. **Frutales y hortalizas promissórios de La Amazônia**. Tratado de Cooperacion Amazônica. Lima: Secretaria-Pro-tempore.1996. 367 p.

WAZLAWIK, E., DA SILVA, M.A., PETERS, R.R., CORREIA, J.F., FARIAS, M.R., CALIXTO, J.B.; RIBEIRO-DO-VALE, R. M. Analysis of the role of nitric oxide in

the relaxant effect of the crude extract and fractions from *Eugenia uniflora* in the rat thoracic aorta. **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics**, 49(4):433-437, 1997.

YU, D.; MEREDITH, C.P. The influence of explant origin on tissue browning and shoot production in shoot tip cultures of grapevine. **Journal of the American society for Horticultural Science**, 111: 972-975, 1986.