

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

LEILA MC LEOD

Efeito da aplicação de Putrescina sobre aspectos bioquímicos e acúmulo de poliaminas em calos de *Handroanthus impetiginosus*

Alfenas / MG

2017

LEILA MC LEOD

**Efeito da aplicação de Putrescina sobre aspectos bioquímicos e acúmulo
de poliaminas em calos de *Handroanthus impetiginosus***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre no Programa de
Pós-Graduação em Ciências Ambientais pela
Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG.
Área de concentração: Tecnologias Ambientais.
Orientador: Prof. Dr. Plinio Rodrigues dos Santos
Filho Coorientador: Prof. Dr. Thiago Corrêa de
Souza

Alfenas / MG

2017



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas / UNIFAL-MG
Programa de Pós-graduação – Ciências Ambientais

Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714. Alfenas - MG CEP 37130-000
Fone: (35) 3299-1379(Coordenação) / (35) 3299-1392 (Secretaria)
<http://www.unifal-mg.edu.br/ppgca/>



LEILA MC LEOD

**Efeito da aplicação de Putrescina sobre aspectos bioquímicos e acúmulo
de poliaminas em calos de *Handroanthus impetiginosus***

A Banca julgadora, abaixo assinada, aprova a
Dissertação apresentada como parte dos requisitos
Para a obtenção do título de Mestre em Ciências
Ambientais pela Universidade Federal de Alfenas.

Prof. Dr. Plínio Rodrigues dos Santos Filho (Orientador)

Instituição: Unifal-MG

Prof. Dr. Breno Régis Santos

Instituição: Unifal-MG

Prof. Dr. Adriano Bortolotti da Silva

Instituição: Unifenas

Aprovada em: 31 de julho de 2017

Dedico a Deus, a minha mãe e meu pai.
E a todos os meus amigos que me ajudaram até aqui.

AGRADECIMENTOS

Nenhuma batalha é vencida sozinha. No decorrer desta luta algumas pessoas estiveram ao meu lado e percorreram este caminho como verdadeiros soldados, estimulando que eu buscasse a minha vitória e conquistasse meu sonho.

Agradeço em primeiro lugar a Deus, que me ouviu nos momentos difíceis, me confortou e me deu forças para chegar onde estou.

Agradeço também aos meus pais, que não somente neste momento, mas em toda a minha vida estiveram comigo, ao meu lado, fornecendo apoio, compreensão e estímulo em todos os momentos.

Agradeço a minha mãe, que muitas vezes foi bem mais que mãe, e que me ensinou a ser uma mulher de força e um ser humo íntegro, com caráter e dignidade para enfrentar a vida. Uma mãe que nunca mediu esforços pra fazer de tudo por mim.

Agradeço meu pai, que mesmo não estando comigo neste momento da minha vida, sempre me deu força de onde estiver pra eu continuar. Para sempre amado e lembrado.

Agradeço a minha Madrinha Lucimar, que nunca mediu esforços e palavras de carinho nos momentos que eu mais precisei.

Agradeço ao meu orientador Prof Dr Plinio, que nesses anos me auxiliou e me ajudou bem mais do que eu precisei, seja com uma palavra amiga, conselhos e orientações.

Agradeço a Deus por ter colocado um orientador tão bom no meu caminho.

A meu coorientador Prof Dr Thiago pelos conselhos e por estar sempre aberto a ajudar no que fosse preciso.

Agradeço aos técnicos George, Gabriel e Gabriela da bioquímica e Biogen por todo apoio, ensinamento e amizade.

A minha amiga Giorgia que esteve comigo em todos os momentos do mestrado.

Aos professores do Departamento de Bioquímica, pela amizade.

Ao professor Dr Breno Regis, por ter aberto as portas pra mim e sempre ter me apoiado em minhas escolhas.

Aos companheiros da caminhada do mestrado, pelo apoio e companheirismo.

A família Biogen., que me acolheu sempre de portas abertas.

Agradeço aos meus amigos do laboratório de Biologia Molecular, Fabio e Marcos pelos conselhos, amizade.

Aos meus amigos, que mesmo não estando perto sempre me apoiaram e me incentivaram nos momentos difíceis.

Sou imensamente grata por tudo que fizeram e fazem por mim!

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.
(Martin Luther King)

RESUMO

A espécie *Handroanthus impetiginosus*, popularmente conhecida como Ipê-roxo é nativa da América do Sul, ocorrendo no Brasil desde o Amazonas até o Rio Grande do Sul. Essa planta apresenta considerável potencial medicinal e madeireiro. Por essa razão, tem sido alvo de processos extrativistas. Frente à essa situação, a cultura de tecidos de plantas constitui uma ferramenta biotecnológica interessante para o estudo e conservação dessa espécie. As poliaminas são encontradas em todos os organismos e estão envolvidas em diferentes processos biológicos tais como crescimento vegetativo, regulação e duplicação de DNA, transcrição, senescência foliar e resposta a estresses ambientais. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da aplicação exógena de putrescina (PUT) sobre aspectos bioquímicos e acúmulo de poliaminas em calos de *Handroanthus impetiginosus*. Para isso, segmentos internodais foram utilizados para indução de calos utilizando 1 $\mu\text{mol/L}$ de ácido 2,4- diclorofenoxiacético (2,4 D) e diferentes concentrações (1, 10, 50 e 500 μM) de PUT. Não houve diferença estatística na massa fresca após 35 dias de cultivo, porém após 70 dias observou-se aumento na massa dos calos tratados com PUT. Ao final do cultivo, houve aumento da concentração de açúcares solúveis nos calos tratados com PUT, ao passo que aos 35 dias não houve diferença nos mesmos, mas houve acúmulo de amido, que possivelmente foi hidrolisado para formação dos açúcares solúveis. Para os aminoácidos totais houve diferença estatística apenas no tratamento com 500 μM de PUT após 70 dias de cultivo. De maneira geral, aos 35 dias, PUT e espermina (SPM) foram as poliaminas mais abundantes nos calos. Já a espermidina (SPD) apresentou os menores níveis. A suplementação com PUT não causou uma significativa variação no conteúdo de poliaminas entre os tratamentos, sendo que apenas no tratamento com 1 μM de PUT houve aumento nos níveis de SPM em relação ao controle. Já aos 70 dias de cultivo, não foi possível identificar nenhuma poliamina no controle. Nos tratamentos suplementados com 1, 10 e 50 μM de PUT a poliamina mais abundante novamente foi a SPM. A SPD não foi identificada em nenhum dos tratamentos. Pode se sugerir com bases nos resultados que a PUT aplicada de forma exógena no meio de cultura nos tratamentos tenha sido convertida em SPM, por isso detectou-se está em níveis abundantes nos tratamentos.

Palavras chave: Ipê; Poliaminas; Aminoácidos.

ABSTRACT

Handroanthus impetiginosus, popularly known as Ipê-purple is native to South America, occurring in Brazil from the Amazon to Rio Grande do Sul. This plant has considerable medicinal and wood potential. For this reason, it has been the target of extractive processes. Faced with this situation, plant tissue culture constitutes an interesting biotechnological tool for the study and conservation of this species. Polyamines are found in all organisms and are involved in different biological processes such as vegetative growth, regulation and DNA duplication, transcription, foliar senescence and response to environmental stresses. Therefore, the objective of this work was to evaluate the effect of exogenous application of putrescine (PUT) on biochemical aspects and accumulation of polyamines in callus of *Handroanthus impetiginosus*. For this, internodal segments were used for callus induction using 1 $\mu\text{mol} / \text{L}$ of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4 D) and different concentrations (1, 10, 50 and 500 μM) of PUT. The content of free polyamines was evaluated by high performance liquid chromatography and the content of starch, total soluble sugars and total amino acids by spectrophotometry. There was no statistical difference in the fresh mass after 35 days of culture, but after 70 days an increase in the mass of callus treated with PUT was observed. This result is related to the sugar content. At the end of the cultivation, there was an increase in soluble sugars concentration in callus treated with PUT, whereas at 35 days there was no difference in them, but there was accumulation of starch, which was possibly hydrolyzed to form soluble sugars. For total amino acids, there was statistical difference only in the treatment with 500 μM PUT after 70 days of culture. In general, at 35 days, PUT and spermine (SPM) were the most abundant polyamines in calluses. Spermidine (SPD) had the lowest levels. The supplementation with PUT did not cause a significant variation in the polyamine content between the treatments, and only in the treatment with 1 μM PUT there was an increase in the PMS levels in relation to the control. The other polyamines were statistically equal to the control in all treatments. Already at 70 days of cultivation, it was not possible to identify any polyamine in the control. In the treatments supplemented with 1, 10 and 50 μM PUT the most abundant polyamine again was SPM. SPD was not identified in any of the treatments. It can be suggested based on the results that the PUT applied exogenously in the culture medium in the treatments has been converted into SPM, so it has been found to be in abundant levels in the treatments.

Keywords: Ipê; Polyamines; Amino acids.

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PUT- Putrescina

SPM- Espermina

SPD- Espermidina

dSAM - S-adenosilmetionina descarboxilase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Ipê-Roxo: Aspectos gerais e ocorrência	13
1.2 Ipê-Roxo: Aplicações farmacológicas	14
1.3 Cultura de tecidos: Aspectos gerais e aplicações.....	16
1.4 Metabolismo e Biossíntese de Poliaminas	18
2 OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo geral	22
2.2 Objetivos específicos.....	22
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
SEGUNDA PARTE	33
Artigo :Exogenous Putrescine effects on the cellular growth, biochemical aspects and endogenous polyamines levels of <i>Handroanthus impetiginosus</i> callus	33
ABSTRACT	34
INTRODUCTION	36
MATERIAL E METHODS	37
Plant material and callus induction.....	37
Extraction of primary metabolites	38
Free polyamines determination.....	38
STATISTICAL ANALYSIS	40
RESULTS AND DISCUSSION.....	40
REFERENCES	45

1 INTRODUÇÃO

1.1 Ipê-Roxo: Aspectos gerais e ocorrência

A espécie *Handroanhus impetiginosus* (Mart. ex DC), pertence à família Bignoniaceae e é conhecida como ipê-roxo, ipê-rosado, ipê-roxo da casca lisa, ipeúna, ipê de minas e pau-d'arco. Há relatos de 36 gêneros desta família utilizados na medicina popular (GENTRY, 1992). É nativa da América do Sul, ocorrendo no Brasil desde o Amazonas até o Rio Grande do Sul. Pode ser encontrada também na Colômbia, Equador, Peru, Suriname, Trinidad e Tobago, Venezuela, Bolívia e Argentina (CASTELLANOS et al., 2009). Essa espécie é uma árvore caducifólia, comumente atinge de 10 a 35 m de altura e 30 a 40 cm de diâmetro. O tronco é reto, cilíndrico e, frequentemente, tortuoso. A casca externa é grisácea, levemente áspera, com sulcos longitudinais pouco profundos e fissuras horizontais curtas e irregulares, desprendendo-se em escamas retangulares e grossas. A casca interna é fibrosa, marrom clara e levemente rosada.

As folhas são opostas digitadas, apresentando pecíolo de até 11 cm de comprimento, geralmente com cinco folíolos, com margem inteira ou levemente serreada. Os folíolos apresentam mechas de pêlos na axila da nervura principal com as secundárias. As flores são grandes, rosadas a lilás, tubulares, vistosas, reunidas em panícula terminal. O fruto é silíquo cilíndrico estreito, deiscente, com numerosas sementes. As sementes são cordiformes, tendendo à oblonga plana, apresentam superfície lisa lustrosa de cor marrom-clara, com presença de ala membranácea nas duas extremidades de cor marrom clara transparente de até 3 cm de comprimento, sendo sua dispersão anemocórica (REITZ et al., 1988; CARVALHO, 1994).

A espécie apresenta habitat característico de Floresta Estacional Semidecidual e Decidual, sendo frequente no cerradão, cerrado, caatinga e mata seca, com ocorrência desde o Piauí e Ceará, até Minas Gerais, Goiás e São Paulo. É classificada como secundária tardia a clímax e muito utilizada para recuperação de áreas degradadas (LORENZI, 1992; CARVALHO, 1994;).

Apresenta uma madeira de excelente qualidade, maleável, resistente, com massa específica aparente de 0,92 a 1,08 g/cm³ a 15% de umidade, massa específica básica de 0,79 g/cm³, cerne de coloração marrom e alburno pardo-acastanhado, sendo considerada

de lei ou de qualidade e utilizada para várias finalidades nobres, móveis e aberturas. A madeira do ipê-roxo é dura, pesada e resistente, podendo ser utilizada em obras externas, vigas e assoalhos. (LORENZI, 1992; PAULA; ALVES, 1997). Isso torna essa madeira valorizada no mercado internacional sendo exportada principalmente para América do Norte onde é empregada na construção de passarelas, calçadões e móveis domésticos (SCHULZE et al., 2008). Essa espécie foi considerada em risco de extinção já nos anos 90 (SIQUEIRA; NOGUEIRA, 1992) estando na relação das espécies para conservação *ex situ* no Instituto Florestal de São Paulo. Ainda, em meados dos anos 2000 foi verificada drástica diminuição de populações naturais de Ipê-roxo na Floresta Amazônica sem perspectiva de recuperação por um longo período (SCHULZE et al., 2008). Como a propagação da espécie é feita por meio das sementes, encontram-se na literatura trabalhos que avaliaram o padrão de germinação e conservação das sementes (OLIVEIRA et al., 2005; MARTINS et al., 2009). Contudo, pouco se sabe sobre o crescimento específico e a taxa de mortalidade de populações naturais, bem como o tempo necessário ou diâmetro do caule para que a espécie inicie a frutificação (SCHULZE et al., 2008).

1.2 Ipê-Roxo: Aplicações farmacológicas

A partir de uma perspectiva etnobotânica, verifica-se historicamente uma longa tradição na aplicação medicinal do Ipê-roxo na América do Sul. A *Handroanhus impetiginosus* tem sido usada por nativos americanos, habitantes do Brasil, norte da Argentina, Paraguai, Bolívia e Peru desde a antiguidade, inclusive com indicações de uso pela população Inca (PÉREZ SACAU et al., 2003; CASTELLANOS; HEINRICH, 2009) contra doenças como câncer, sífilis, malária, febres, tripanossomíases, infecções bacterianas, fúngicas e desordens estomacais (GONÇALVES et al., 1980; SUFFNES; DOUROS, 1980; ANESISNI; PÉREZ, 1993; GUIRAUD et al., 1994; TYLER, 1999; MANS et al., 2000; PORTILLO et al., 2001; DOS SANTOS et al., 2004; CRAGG; NEWMAN, 2005).

Em sua revisão, Castellanos et al., (2009) reportam o de uso médico do Ipê-Roxo em 1873, sendo que tradicionalmente, a preparação medicinal do ipê consiste na decocção da casca ou do cerne do caule. Foi somente a partir da década de 1960 que apareceram os primeiros relatos na imprensa sobre as propriedades “miraculosas” dessa planta e iniciaram-se os estudos farmacológicos e para obtenção de compostos bioativos.

Uma das propriedades biológicas dessa planta é atividade antitumoral. A espécie *Handroanthus impetiginosus* tem mostrado atividades contra diferentes tumores, tais como, câncer de próstata (LI et al., 1995), leucemia promielocítica (BOOTHMAN et al., 1987), tumor mamário humano (WUERZBERGER et al., 1998) e osteosarcoma (SIMAMURA et al., 2003). Mais recentemente Melo et al., (2011) fizeram um levantamento das plantas usadas com agentes antitumorais e que tenham sido alvo de pesquisas no campo da etnobotânica no Brasil. Entre as 84 espécies estudadas, *Handroanthus impetiginosus* foi a segunda mais citada na literatura etnofarmacológica e/ou para a prevenção de tumores. Além da atividade antitumoral, essa planta tem demonstrado outras aplicações farmacológicas tais como, antibacteriano (Park et al., 2005 e 2006), inibidor da agregação plaquetária (SON et al., 2006) e redutor do acúmulo pós prandial de triglicerídeos (KIAGE-MOKUA et al., 2012).

Diversos compostos são encontrados nessa planta, em particular em extratos metanólicos (PARK et al., 2004), entre os quais flavonoides (BLATT et al., 1996), ácidos benzoicos e derivados de benzaldeídos (WAGNER et al., 1989), quinonas (SHARMA et al., 1988), furanonaftoquinonas (ZANI et al., 1991; DE OLIVEIRA et al., 1993; DÍAZ; MEDINA, 1996) e os mais importante, naftoquinonas e antraquinonas (THOMSON, 1971; MANNERS; JURD, 1976).

Entre as naftoquinonas destaca-se o Lapachol, composto bioativo presente nas cascas do ipê-roxo, descrito pela primeira vez em 1882 por Paternò (THOMSON, 1971). Sua estrutura química foi definida por Hooker em 1896, como 2-hidroxi-3-(e-metil-2-butenil) -1,4-naftoquinona. É um composto encontrado naturalmente como constituinte de muitas plantas da família Bignoniaceae e foi estudado por muitos anos devido às interessantes atividades biológicas apresentadas. No uso popular, tem produzido resultados evidentes no tratamento de diabetes e úlceras gástricas, além de ser utilizado como analgésico, antiinflamatório e até como antimutagênico. Também já tem sido empregado em hospitais, na forma de extrato fluido e em pó ou em pomada (ARAÚJO et al., 2002).

O lapachol, com a ação controlada do calor, fornece a desidrolapachona (xiloidona) e os isômeros α e β -lapachona (D'ALBUQUERQUE, 1968). Estas substâncias são bastante conhecidas por possuírem propriedades antitumorais, além de antiinflamatória, analgésica, antibiótica, antimalárica, antitripanossoma e antiulcerogênica (HUSSAIN et al., 2007).

A β -lapachona, um derivado do lapachol, apesar de ainda não ser um fármaco comercializado é uma substância muito importante do ponto de vista da pesquisa científica. Também apresenta atividade antitumoral e boa atividade farmacológica contra *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas. Devido a sua citotoxicidade, a β -lapachona não pode ser utilizada no tratamento da Doença de Chagas, mas sua estrutura tem servido de modelo para o desenvolvimento de substâncias mais efetivas contra *T. cruzi*. Esta citotoxicidade é importante para o controle da proliferação de diversos tipos de células cancerosas. β -lapachona é eficaz, *in vitro*, contra linhagens de células humanas malignas de pulmão, mama, colo-retal, próstata; melanoma e leucemia (SILVA et al., 2003).

1.3 Cultura de tecidos: Aspectos gerais e aplicações

As dificuldades encontradas no processo de propagação das plantas medicinais e na busca por maior produtividade de metabólitos secundários reforçam a cultura de tecidos como uma solução que pode favorecer a obtenção de mudas e a extração de princípios ativos de interesse, tornando possível a produção destes em grande quantidade (KARUPPUSAMY, 2009). Nesse sentido, a cultura de tecidos vegetais é uma técnica vantajosa, quando aplicada em variedades que necessitam ser propagadas em curto espaço de tempo e em larga escala. A cultura de tecidos vegetais compreende um conjunto de técnicas nas quais um explante (célula, tecido ou órgão) é isolado e cultivado em condições assépticas com meio nutritivo artificial (TORRES et al., 1998).

Em vários tecidos cultivados *in vitro*, a utilização de substâncias reguladoras de crescimento apresenta importância fundamental para o estabelecimento da competência e determinação, imprescindíveis para a formação de meristemas caulinares e/ou radiculares. Os reguladores de crescimento exercem sua ação por reconhecimento de receptores específicos, presentes em células responsivas, traduzindo sinais hormonais em eventos bioquímicos e fisiológicos (TORRES et al., 1998; FEHER, et al. 2003). O cultivo *in vitro* de plantas é baseado na totipotencialidade das células vegetais (VOGEL, 2005), o que permite que a célula sofra desdiferenciação, ou seja, perca as características diferenciadas e reinicie a divisão celular quando removidas da planta e colocadas em meio de cultura específico. Em tese, qualquer célula da planta é capaz de originar um novo

indivíduo completo, porém tecidos meristemáticos costumam apresentar melhores resultados (VERDEIL et al., 2007).

O fragmento de tecido da planta de interesse utilizado no cultivo *in vitro* é denominado explante, o qual é colocado em um meio nutritivo que permita o desenvolvimento adequado do material utilizado, de acordo com o objetivo do trabalho, sempre sob condições assépticas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1999).

O meio de cultura pode ter diversas composições, dependendo do propósito final do experimento. De maneira geral, ele é composto de macro e micronutrientes, carboidratos, hormônios e vitaminas, e a variação destes componentes pode controlar o padrão de desenvolvimento do vegetal *in vitro* (TORRES et al., 1998).

A propagação vegetativa *in vitro*, mais conhecida como micropropagação, pode ser feita por meio de explantes de diversos fragmentos vegetais, e a escolha deles define como a propagação será conduzida. Segundo Grattapaglia e Machado (1998), a multiplicação celular pode ser conduzida de 3 formas: pela proliferação de gemas axilares; mediante indução de gemas adventícias por organogênese direta ou indireta; ou via embriogênese somática. Contudo a micropropagação não se restringe a esses três tipos, sendo viável também com explantes foliares, por exemplo.

Dentre as técnicas de cultura de tecidos vegetais, destaca-se a indução de organogênese (PASQUAL et al., 2002). A organogênese é definida como a formação de estruturas a partir de tecidos e células, podendo ocorrer por via direta por meio da regeneração de plantas provenientes de tecidos não meristemáticos, sem passar pela fase de calo, apresentando alta fidelidade genética e, por via indireta, quando o processo de regeneração é precedido pela formação de calo.

O processo de formação de calo, também conhecido como calogênese, é uma etapa básica para o desenvolvimento de sistemas de propagação vegetativa em massa. As células dos calos também podem ser úteis quando se deseja realizar manipulações genéticas, como poliploidizações, transformações ou hibridizações, bem como obtenção de metabólitos secundários (VENTURIERI; VENTURIERI, 2004).

Quando o explante é cortado e colocado sob condições apropriadas para seu crescimento, é iniciada a formação de um tecido de cicatrização, em que as células da superfície do corte começam um processo de divisão e, então, o calo é formado. Nesta situação, o calo começará a crescer sem uma diferenciação nem organização definida, porém, quando transferido para um meio nutritivo sob condições hormonais adequadas,

pode começar uma diferenciação dessa massa celular em raízes adventícias, partes aéreas ou mesmo embriões (NEUMANN, 2009).

Alguns fatores são primordiais para a formação de calo, como intensidade luminosa, temperatura, composição do meio nutritivo e a parte vegetal escolhida como explante. A eficiência desse último depende da determinação do tecido e sua especificidade. Os tecidos mais jovens, por possuírem maior potencial de crescimento, divisão e diferenciação celular, são mais indicados para serem utilizados como explantes, uma vez que a calogênese se torna mais eficiente pelo menor índice de oxidação (WERNER et al., 2009). Nesse sentido, a determinação da viabilidade celular durante o desenvolvimento do calo contribui para o estabelecimento de um protocolo eficiente e posterior otimização para obtenção de calos embriogênicos (SILVA et al., 2012).

Outro aspecto relevante da cultura de calos é seu potencial uso para a obtenção de metabólitos secundários bioativos, em alternativa ao extrativismo de plantas com propriedades medicinais (KARUPPUSAMY, 2009). Além disso, extratos de massas calogênicas também têm sido avaliados em diferentes sistemas biológicos a fim de se conhecer sua atividade e potencial aplicação (SOKMEN et al., 2004). Segundo Mesquita et al. (2002), é importante avaliar as mudanças bioquímicas e fisiológicas que ocorrem durante o crescimento *in vitro* de tecidos vegetais de espécies lenhosas, pois isso pode fornecer importantes informações relacionadas ao processo de estabelecimento e, conseqüentemente, propiciar a otimização das condições para seu cultivo *in vitro*.

Ainda nesse sentido, de acordo com Phan et al. (1987), os calos podem apresentar composição bioquímica e exigências nutricionais específicas, muitas vezes diferentes do explante a partir do qual foram originados. Nesse sentido, o conhecimento dos níveis de carboidratos, proteínas, aminoácidos e poliaminas, contribui potencialmente para o conhecimento dos aspectos bioquímicos e das exigências nutricionais dos calos, bem como para a manipulação da cultura no sentido da obtenção de células mais viáveis e/ou com maior potencial biotecnológico.

1.4 Metabolismo e Biossíntese de Poliaminas

As poliaminas são aminas alifáticas, que podem ser encontradas em todos os organismos vivos, envolvendo diversos processos biológicos, como o crescimento vegetativo, a regulação da duplicação do DNA, a transcrição de genes, a divisão celular,

o desenvolvimento de órgãos, o amadurecimento de frutos, a senescência de folhas, as respostas as mudanças ambientais (LIMA et al., 2003), a participação no metabolismo do nitrogênio (AZIZ et al., 1998), e a morfogênese (GALSTON; KAURSAWHNEY, 1995). Entretanto, apenas na década de 80, o papel das poliaminas na atividade metabólica das células vegetais passou a ser pesquisado, apesar de essas substâncias serem um dos mais antigos compostos orgânicos conhecidos (KERBAUY, 2008).

Putrescina (PUT), espermidina (SPD) e espermina (SPM) são poliaminas mais abundantes em todos os organismos, principalmente na atividade dos tecidos (MINGUET et al., 2008) e quando adicionadas ao meio de cultura tem estimulado o crescimento em várias plantas (TASSONI et al., 2000). Embora as poliaminas estejam envolvidas em um grande número de processos do desenvolvimento vegetal, participando direta ou indiretamente de várias vias metabólicas essenciais para o funcionamento celular, essas substâncias são requeridas em concentrações maiores do que os hormônios convencionais para a produção de um mesmo efeito. Desta maneira, considerá-las como hormônio vegetal ainda é controverso (KERBAUY, 2008).

As poliaminas podem ser encontradas livres ou conjugadas com ácidos fenólicos, compostos de baixo peso molecular ou macromoléculas tais como proteínas e ácidos nucleicos (GALSTON et al., 1997; BAIS; RAVISHANKAR, 2002)

A biossíntese de poliaminas compreende vias semelhantes em bactérias, animais e plantas (TABOR; TABOR 1984). São sintetizadas a partir dos aminoácidos arginina e ornitina, pelas enzimas arginina descarboxilase (ADC) e ornitina descarboxilase (ODC), respectivamente (KAUR et al., 2003). A via da ornitina descarboxilase está usualmente relacionada a tecidos meristemáticos e divisão celular enquanto a via da arginina descarboxilase associa-se à tecidos maduros e em resposta a estresse ambiental (FLORES, 1991).

A primeira poliamina sintetizada é a putrescina (Figura 1) que, posteriormente a será convertida em espermidina e espermina pela transferência de grupos aminopropil pela S-adenosilmetionina descarboxilase (dSAM) catalisadas pelas enzima espermidina sintase e espermina sintase, respectivamente (KAUR et al., 2003).

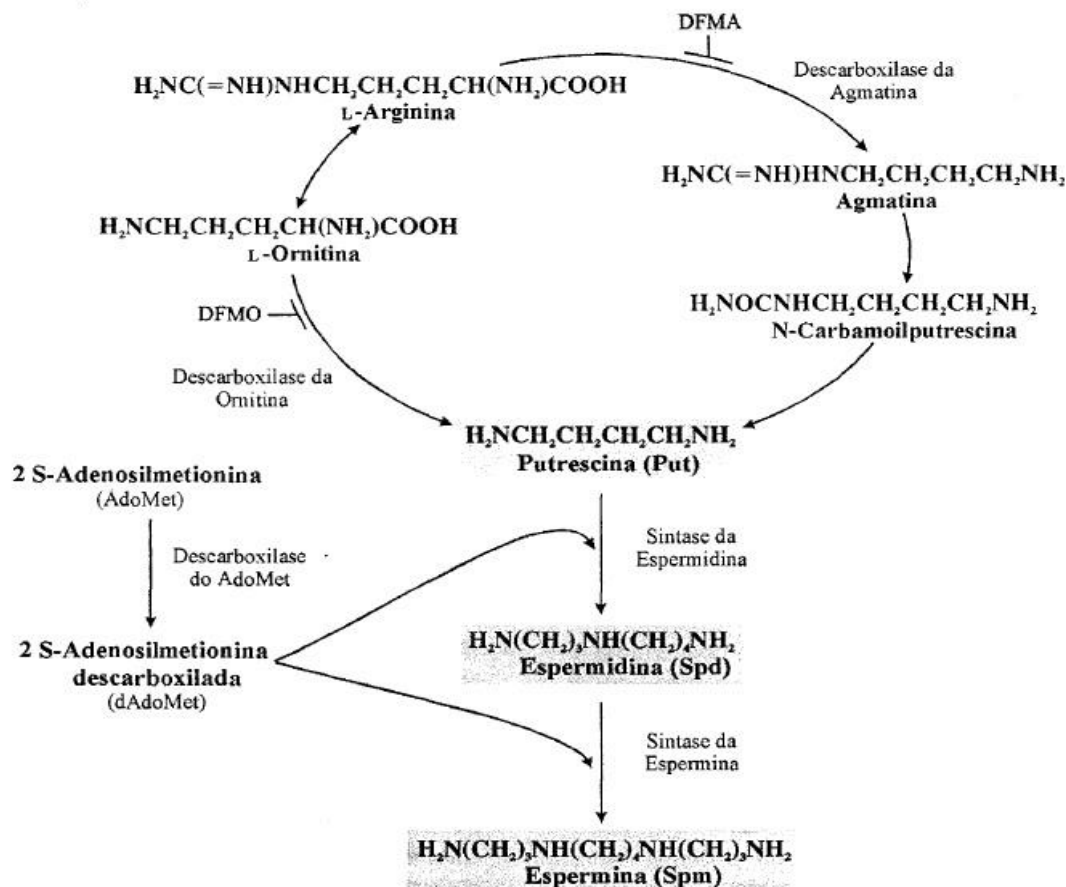


Figura 1: Via esquemática da Biossíntese de Poliaminas (KERBAUY, 2008).

A suplementação de poliaminas exógenas pode melhorar a morfogênese, por indução a divisão celular e aumentar a regeneração em cultura celular (KAKKAR et al., 2002). Estudo recente mostrou que a adição de poliaminas foi eficiente na indução do crescimento de brotos em *E. angustifolia*, ressaltando que entre elas putrescina foi mais eficiente que a espermina e espermidina (CHAE, 2016).

Na organogênese em *Bixa orellana* L. a suplementação com putrescina resultou um número superior de brotação e alongamento de brotos (PARIMALAN; GIRIDHAR; RAVISHANKAR, 2010). Já em *Hemerocallis* sp, ocorreu participação direta das poliaminas não só na indução e no controle da morfogênese, como também nos padrões oxidativos de células e tecidos (DEBIASI; FRÁGUAS; LIMA, 2007).

Maior número de perfilhos, assim como aumento no teor de putrescina e flavonoides ocorreu com a aplicação exógena de espermina e espermidina, afirmando que

a ação conjunta das poliaminas mostrou-se benéfica para o perfilhamento. Neste mesmo trabalho, constatou-se que a putrescina por apresentar alterações significativas, pode ser utilizada como marcadora da morfogênese em *Aloe vera* micropropagada (MORGOR, 2007).

A suplementação de poliaminas favoreceu a formação de calos, raízes e folhas, comprovando ser um fator determinante na organogênese indireta de *Curcuma longa* L., e a putrescina pode ser considerada um marcador no processo de diferenciação desta espécie (VIU et al., 2009).

A aplicação de putrescina exógena em *Coffea canefora* ocasionou o aumento da embriogênese somática. Ainda neste estudo a estimativa de poliaminas totais demonstrou diferença nos níveis endógenos de espermina nos calos embriogênicos e não embriogênicos. Os calos embriogênicos apresentavam 11 vezes mais espermina e 3,3 vezes mais espermidina quando comparados aos calos não embriogênicos (KUMAR et al., 2008)

Estudos realizados em *Momordica charantia* L. mostrou que poliaminas exógenas PUT (0.1, 0.5, 1 mM), SPD (0.1, 0.5, 1mM) e SPM (0.1, 0.5, 1 mM) adicionadas individualmente ao meio de indução a embriogênese aumentou tanto o peso fresco como o número de embriões nos calos. Os autores ressaltaram que entre as três poliaminas a PUT, na concentração de 1 mM, foi a mais efetiva no aumento de peso fresco e indução de calos embriogênicos (PAUL; MITTER; RAYCHAUDHURI, 2009).

Em *Saccharum officinarum* entre as poliaminas concluiu-se que a adição de 500 μ M de putrescina promoveu o maior número de embriões somáticos, porém não foram observadas diferenças na quantidade de matéria fresca entre os tratamentos e o controle (REIS et al., 2016). Na embriogênese somática de *Citrus sinensis*, a quantificação de poliaminas livres mostrou que em calos cultivados em meio de cultura para indução de embrião houve menor quantidade de PUT do que os calos em meio de cultura para indução a calogênese. Porém, o aumento SPD e SPM foi relatado nos calos cultivados em meio de cultura para indução de embriões, resultando numa maior embriogênese somática (WU et al., 2009).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da aplicação exógena de putrescina sobre aspectos bioquímicos e acúmulo de poliaminas em calos de *Handroanthus impetiginosus*.

2.2 Objetivos específicos

- Induzir calos em segmentos nodais;
- Cultivar os calos de ipê na presença de putrescina;
- Determinar os teores de aminoácidos totais, açúcares totais, amido e poliaminas livres nos calos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMIN, A. A. et al. Physiological response of onion plants to foliar application of putrescine and glutamine. **Scientia horticultrae**, v. 129, n. 3, p. 353-360, 2011.
- ANESISNI, C.; PÉREZ, C. Screening of plants used in Argentine folk medicine for antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 39, p. 119–128, 1993.
- ARAÚJO, E. L.; ALENCAR, J. R. B.; NETO, P. J. R. Lapachol: segurança e eficácia na terapêutica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. V. 12, p. 57– 59, 2002.
- AZIZ, A.; MARTIN-TANGUY J. and LARHER F. Stress-induced changes in polyamine and tyramine levels can regulate proline accumulation in tomato leaf discs treated with sodium chloride. **Physiologia Plantarum**, v. 104, p. 195-202, 1998.
- BATES, L. S.; WALDREN, R. P.; TEARE, I. D. Rapid determination of free proline for water stress studies. **Plant Soil**, v. 39, p. 205-207, 1973.
- BLATT, C. T. T.; SALATINO, A.; SALATINO, M. F. Flavonoids of *Tabebuia caraiba* (Bignoniaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 24, p. 89, 1996.
- BOOTHMAN, D. A.; GREER, S.; PARDEE, A. B. 1987. Potentiation of halogenated pyrimidine radiosensitizers in human carcinoma cells by beta-lapachone (3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-naphthol[1,2-b]pyran-5,6-dione), a novel DNA repair inhibitor. **Cancer Research**, v. 47, p. 5361-5366, 1987.
- CARDOSO, F. L.; MURAKAMI, C.; MAYWORM, M. A. S.; MARQUES, L. M. Análise sazonal do potencial antimicrobiano e teores de flavonóides e quinonas de extratos foliares de *Aloe arborescens* Mill., *Xanthorrhoeaceae*. . **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 20, p. 35-40, 2010.
- CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Brasília: Embrapa/CNPQ, 1994. 640 p.
- CASTELLANOS, J. R.; PRIETO, J. M.; HEINRICH, M. “RED LAPACHO (*Tabebuia impetiginosa*)-a global ethnopharmacological commodity?”. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 121, p. 1–13, 2009.

CHAE, Soo Cheon. Shoot organogenesis of *Echinacea angustifolia* DC as influenced by polyamines. **Life Science Journal**, v. 13, n. 1, 2016.

CLSI/NCCLS. Norma M7-A6. **Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico**: Norma Aprovada. 6. ed. Wayne, PA. v. 23, n. 2, 2005

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D.J. Plants as a source of anticancer agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 72–79, 2005.

D'ALBUQUERQUE, I. L. Termorreação da 2-hidróxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona. **Revista do Instituto de Antibióticos**. Recife/UFPE. v. 8, p. 73–87, 1968.

DE OLIVEIRA, A. B.; RASLAN, D. S.; DE OLIVEIRA, G. G.; MAIA, J. G. S. Lignans and naphthoquinones from *Tabebuia incana*. **Phytochemistry**, v. 34, p. 1409–1412, 1993.

DEBIASI, Clayton; FRÁGUAS, Chrystiane Borges; LIMA, Giuseppina Pace Pereira. Estudo das poliaminas na morfogênese in vitro de *Hemerocallis* sp. **Ciencia Rural**, [s.l.], v. 37, n. 4, p.1014-1020, ago. 2007

DÍAZ, F.; MEDINA, J. D. Furanonaphthoquinones from *Tabebuia Ochracea* ssp. *neochrysa*. **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 423–424, 1996.

DOS SANTOS, E. V. M.; CARNEIRO, J. W. M.; FERREIRA, V. F. Quantitative structureactivity relationship in aziridiny-1,4-naphthoquinone antimalarials: study of theoretical correlations by the PM3 method. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 87–93, 2004.

DUTRA, N.; SILVEIRA, V.; DE AZEVEDO, I. G.; GOMES-NETO, L. R.; F. A. C.; FAÇANHA, A. R.; STEINER, N.; GUERRA, M. P.; FLOH, E. I. S.; SANTA-CATARINA, C. Polyamines affect the cellular growth and structure of proembryogenic masses in *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures through the modulation of proton pump activities and endogenous levels of polyamines. **Physiologia Plantarum**, v. 148, p. 121–132, 2013.

FRÁGUAS, Chrystiane Borges; VILLA, Fabíola; LIMA, Giuseppina Pace Pereira. Evaluation of exogenous application of polyamines on callus growth of mangaba tree (*Hancornia speciosa* Gomes). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 4, p. 1206-1210, 2009.

FDA. Economic characterization of the dietary supplement industry, Final Report. Center for Food Safety and Applied Nutrition, United States Food and Drug Administration, 1999.

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T. P.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell Tiss Org Cult.** v. 74, p. 201-228, 2003.

FLORES, H.E.. Changes in polyamine metabolism in response to abiotic stress. In: Slocum, R.D., Flores, H.E. (Eds.), *Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants*. CRC Press, **Boca Raton**, p. 213–226, 1991.

GALSTON AW, KAUR-SAWHNEY R, ALTABELLA T AND TIBURCIO AF. Plant polyamines in reproductive activity and response to abiotic stress. **Bot Acta.** p.110:197-207, 1997.

GALSTON, A.W.; KAUR-SAWHNEY, R. Polyamines as endogenous growth regulators. In: DAVIES, P.J. (Ed.). **Plant hormones physiology, biochemistry and molecular biology**. Dordrecht: Kluwer, 1995. p.158-178.

GENTRY, A. H. Flora Neotropica: Bignoniaceae - Part II (tribe Tecomeae). **Flora Neotropica Monograph**, v.25, n.2, p.1-130. 1992.

GONÇALVES, A. M.; VASCONCELLOS, M. E.; DOCAMPO, R.; CRUZ, F. S.; DE SOUZA, W.; LEON, W. Evaluation of the toxicity of 3-allyl-_-lapachone against *Trypanosoma cruzi* bloodstream forms. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 1, p. 167–176, 1980.

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: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq**, v. 1, p. 183-260. 1999.

GUIRAUD, P.; STEIMAN, R.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; SEIGLE-MURANDI, F.; BOUCHBERG, M. Comparison of antibacterial and antifungal activities of lapachol and lapachone. **Planta Medica**, v. 6, p. 373–374, 1994.

HUSSAIN, H.; KROHN, K.; UDDIN AHMAD, V. U.; MIANA, G. A.; GREEND, I. R. Lapachol: An overview. **Arkivoc**, v. 2, p. 145–171, 2007.

KAKKAR RK, NAGAR PK, AHUJA PS, RAI VK. Polyamines and plant morphogenesis. **Biol Plantarum** 43:1–11, 2000.

KAUR-SAWHNEY R, TIBURCIO AF, ATABELLA T, GALSTIN AW. Polyamines in plants: Na overview. **Journal of Cell and Molecular Biology** 2, 1-12, 2003.

KARUPPUSAMY S. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ and cell cultures. *J Med Plants Res.* v. 3 p. 1222–1239, 2009.

KERBAUY, G.B. **Fisiologia Vegetal**. 2 Ed. Guanabara Koogan, 2008. 472p.

KIAGE-MOKUA, B. N.; ROOS, N.; SCHREZENMEIR, J. (2012) Lapacho tea (*Tabebuia impetiginosa*) extract inhibits pancreatic lipase and delays postprandial triglyceride increase in rats. **Phytother Res**, v. 26, p.1878–1883, 2012.

KUSANO, T.; BERBERICH, T.; TATEDA, C.; TAKAHASHI, Y. Polyamines: essential factors for growth and survival. **Planta**, v. 228, p. 367–381, 2008.

KUMAR, Vinod et al. Polyamines influence morphogenesis and caffeine biosynthesis in in vitro cultures of *Coffea canephora* P. ex Fr. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 30, n. 2, p. 217-223, 2008.

LI, C. J.; WANG, C.; PARDEE, A. B.; Induction of apoptosis by beta-lapachone in human prostate cancer cells. **Cancer Research**, v. 55, p. 3712–3715, 1995.

LI, ZHOU ET AL. Exogenous spermidine improves seed germination of white clover under water stress via involvement in starch metabolism, antioxidant defenses and relevant gene expression. **Molecules**, v. 19, n. 11, p. 18003-18024, 2014.

LIU, J. H.; MORIGUCHI, T. Changes in free polyamine titers and expression of polyamine biosynthetic genes during growth of peach in vitro callus. **Plant cell reports**, v. 26, n. 2, p. 125-131, 2007.

LIMA, G.P.P., PIZA, I.M.T., HENRIQUE, A., TAKAKI, M. Polyamines as salinity biochemical marker in callus of *Eucalyptus urograndis*. **Ciência Florestal** v. 13, p.43–48, 2003.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. São Paulo: **Plantarum**, 352p, 1992.

MANNERS, G. D.; JURD, L. A new naphthoquinone from *Tabebuia guayacan*. **Phytochemistry**, v. 15, p. 225–226, 1976.

MANS, D. R. A.; DA ROCHA, A. B.; SCHWARTSMANN, G. Anti-cancer drug discovery and development in Brazil: targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anticancer compounds. **The Oncologist**, v. 5, p. 185–198, 2000.

MARTINS, L.; LAGO, A. A. D.; ANDRADE, A. C. S. D.; SALES, W. R. M. Conservação de sementes de ipê-roxo *Tabebuia Impetiginosa* (mart. ex dc.) standl.) em nitrogênio líquido. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, p. 71-76, 2009.

MCCREADY, R. M.; GUGGOLS, J.; SILVEIRA, V.; OWENS, H. S. Determination of starch and amylase in vegetables; application to peas. **Anal Chem**, v. 22, p.1156–1158, 1950.

MELO, J. G.; SANTOS, A. G.; AMORIM, E. L. C.; NASCIMENTO, S. C. D.; ALBUQUERQUE, U. P., “Medicinal plants used as antitumor agents in Brazil: an ethnobotanical approach,” **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, Article ID 365359, 14p, 2011.

MESQUITA, A. C.; PAIVA, R.; SANTIAGO, E. J. A.; PAIVA, P. D. O.; PAIVA, L. V.; GOMES, G. A. C. Análises bioquímicas de calos obtidos de segmentos foliares de lechieira (*Litchi chinesis* Sonn.). **Magistra**, v.14, p. 1-6, 2002.

MINGUET, E.G., VERA-SIRERA, F., MARINA, A., CARBONELL, J., BLÁZQUEZ, M.A. Evolutionary diversification in polyamine biosynthesis. **Mol. Biol. Evol.**v. 25, p.2119–2128, 2008.

MÓGOR, G.; LIMA, G. P P; MÓGOR, A. F.. Efeito de poliaminas exógenas no crescimento inicial in vitro e nos teores de fenóis, poliaminas e atividade da peroxidase em *Aloe vera* (L.) Burm.**Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 3, p. 37-47, 2007.

MHRA, 2005. **Safety of Herbal Medicines**. Documento on line disponível em: <http://www.mhra.gov.uk/home/groups/is-pol/documents/websiteresources/con009277.pdf>. 2005.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-479, 1962.

NEUMANN, K.; KUMAR, A.; IMANI, J: *Plant Cell and Tissue Culture - A Tool in Biotechnology: Basics and Application (Principles and Practice)*. Germany. **Springer**, v. 333, p. 6, 2009.

OLIVEIRA, L. M.; CARVALHO, M. L. M. SILVA, T. T. A.; BORGES, D. I. Temperatura e regime de luz na germinação de sementes de *Tabebuia impetiginosa* (Martius ex A. P. de Candolle) Standley e *T. serratifolia* Vahl Nich. – Bignoniaceae. **Ciênc. Agrotecnologia**, v. 29, p. 642-648, 2005.

PAUL, MITTER, RAYCHAUDHURI, Effect of polyamines on in vitro somatic embryogenesis in *Momordica charantia* L, **Plant Cell Tissue Organ Cult.**v. 97 p.303–311, 2009

PARK, B. S.; KIM, J. R.; LEE, S. E.; KIM, K. S.; TAKEOKA, G. R.; AHN, Y. J.; KIM, J. H. Selective growth-inhibiting effects of compounds identified in *Tabebuia impetiginosa* inner bark on human intestinal bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1152–1157, 2005.

PARK, B. S.; LEE, H. K.; LEE, S. E.; PIAO, X. L.; TAKEOKA, G. R.; WONG, R. Y.; AHN, Y. J.; KIM, J. H. Antibacterial activity of *Tabebuia impetiginosa* Martius ex DC (Taheebo) against *Helicobacter pylori*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, p. 255–262, 2006.

PARK, B. S.; LEE, K. W.; TAKEOKA, G. R. Comparison of three sample preparation methods on the recovery of volatile from Taheebo (*Tabebuia impetiginosa* Martius ex DC). **Flavour and Fragrance Journal**, v. 19, p. 287–292, 2004.

PARIMALAN, R.; GIRIDHAR, P.; RAVISHANKAR, G. A.. Enhanced shoot organogenesis in *Bixa orellana* L. in the presence of putrescine and silver nitrate. **Plant Cell, Tissue And Organ Culture** (pctoc), [s.l.], v. 105, n. 3, p.285-290, 27 out. 2010.

PASQUAL, G.; MANES, F.; MONACELLI, B.; NATALE, L.; ANSEMI, S. Effects of the culture medium pH and ion uptake in vitro vegetative organogenesis in thin cell layers of tobacco. **Plant Science**, v. 162, p. 947-955, 2002.

PAULA, J. E.; ALVES, J. L. H. Madeiras nativas: anatomia, dendrologia, dendrometria, produção, uso. Brasília; Fundação Mokiti Okada, 541p, 1997.

PAUL, Ananya; MITTER, Kalyan; RAYCHAUDHURI, Sarmistha Sen. Effect of polyamines on in vitro somatic embryogenesis in *Momordica charantia* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 97, n. 3, p. 303-311, 2009.

PÉREZ SACAU, E.; ESTÉVEZ-BRAUN, A.; RAVELO, A. G.; FERRO, E. A.; TOKUDA, H.; MUKAINAKA, T.; NISHINO, H. Inhibitory effects of lapachol

derivatives on Epstein-Barr virus activation. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 483–488, 2003.

PHAN, C.T.; DO, C.B.; HEGEDUS, P. Metabolic aspects of "in vitro" culture of plants; PORTILLO, A.; VILA, R.; FREIXA, B.; ADZET, T.; CÃNIGUERAL, S. Antifungal activity of Paraguayan plants used in traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 93–98, 2001.

PUIATTI, M.; SODEK, L. Waterlogging affects nitrogen transport in the xylem of soybean. **Plant Physiol Biochem**, v. 37, p. 767-773, 1999.

REIS, Ricardo Souza et al. Putrescine induces somatic embryo development and proteomic changes in embryogenic callus of sugarcane. **Journal of proteomics**, v. 130, p. 170-179, 2016.

REITZ, R.; KLEIN, R. M.; REIS, A. Projeto madeira do Rio Grande do Sul. Porto Alegre: Secretaria de Agricultura e Abastecimento, p.524, 1988.

ROSCH, D.; BERGMANN, M.; KNORR, D.; KROH, L. W. Structure antioxidant efficiency relationships of phenolic compounds and their contribution to the antioxidant activity of sea buckthorn juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 4233-4239, 2003.

SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V.; SCHERER, G. F. E.; FLOH, E. I. S. Polyamine and nitric oxide levels correlate with morphogenetic evolution in somatic embryogenesis of *Ocotea catharinensis*. **Plant Cell Tissue Org Cult** 90: 93–101, 2007

SANTOS, ANDRÉ LUIS WENDT DOS et al. Biochemical and morphological changes during the growth kinetics of *Araucaria angustifolia* suspension cultures. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 3, p. 497-504, 2010.

SCHULZE, M.; GROGAN, J.; UHL, C.; LENTINI, M.; VIDAL, E. Evaluating ipê (*Tabebuia*, Bignoniaceae) logging in Amazonia: Sustainable management or catalyst for forest degradation? **Biological Conservation**, v. 141, p. 2071–2085, 2008.

SHARMA, P. K.; KHANNA, R. N.; ROHATGI, B. K.; THOMSON, R. H. Tecomaquinone-III: a new naphthoquinone from *Tabebuia pentaphylla*. **Phytochemistry**, v. 27, p. 632-633, 1988.

SILVA, M. N.; FERREIRA, V. F.; SOUZA, M. C. B. V. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β -lapachona e derivados. **Revista Química Nova**, vol. 26, No3, 407-416, 2003.

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.

SILVEIRA, Vanildo et al. Polyamine effects on the endogenous polyamine contents, nitric oxide release, growth and differentiation of embryogenic suspension cultures of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Plant Science**, v. 171, n. 1, p. 91-98, 2006.

SIMAMURA, E.; HIRAI, K. I.; SHIMADA, H.; PAN, J.; KOYAMA, J. Mitochondrial damage prior to apoptosis in furanonaphthoquinone treated lung cancer cells. **Cancer Detection and Prevention**, v. 27, p. 5-13, 2003.

SIQUEIRA, A. C. M. F.; NOGUEIRA, J. C. B. Essências brasileiras e sua conservação genética no Instituto Florestal de São Paulo. **Revista do Instituto Florestal**, Edição dos Anais do CONGRESSO NACIONAL SOBRE ESSÊNCIAS NATIVAS, São Paulo, 1992. Edição especial v.4, n.4, p.1187, 1992.

SOKMEN, M.; SERKEDJIEVA, J.; DAFERERA, D.; GULLUCE, M.; POLISSIOU, M.; TEPE, B.; AKPULAT, A.; SAHIN, F.; SOKMEN, A. In vitro antioxidant, antimicrobial and antiviral activities of the essential oil and various extracts from herbal parts and callus cultures of *Origanum acutidens*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 3309-3312, 2004.

SON, D. J.; LIM, Y.; PARK, Y. H.; CHANG, S. K.; YUN, Y. P.; HONG, J. T.; TAKEOKA, G. R.; LEE, K. G.; LEE, S. E.; KIM, M. R.; KIM, J. H.; PARK, B. S. Inhibitory effects of *Tabebuia impetiginosa* inner bark extract on platelet aggregation and vascular smooth muscle cell proliferation through suppressions of arachidonic acid liberation and ERK1/2 MAPK activation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, p. 148–151, 2006.

SUFFNES, M.; DOUROS, J.D. Miscellaneous natural products with antitumor activity. In: Cassady, J.M., Douros, J.D. (Eds.), *Anticancer Agents Based on Natural Product Models*. **Academic Press**, New York, p. 474, 1980.

TABOR CW, TABOR H. Polyamines. *Annu Rev Biochem* 53:749–790, 1984 .

TASSONI, A. et al. Polyamine content and metabolism in *Arabidopsis thaliana* and effect of spermidine on plant development. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.38, n.5, p.383-393, 2000.

TAYLOR, L. The Healing Power of Rainforest Herbs. Square One Publishers, Garden City Park, 2005

THOMSON, R. H. Naphtaquinones. **Naturally Occurring Quinones**. Academic Press, London, p. 203, 1971.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas. 1ª ed. **Brasília: Embrapa-SPI**, 1998.

TYLER, V. E. Tyler's Honest Herbal. The Haworth. Herbal Press, **Binghamton**, p. 287–291, 1999.

VENTURIERI, G. A.; VENTURIERI, G. C. Calogênese do híbrido *Theobroma grandiflorum* x *T.obovatum* (Sterculiaceae). **Acta Amazônica**, v. 34, n. 4, p. 507-511, 2004.

VERDEIL, J.-L.; ALEMANN, L.; NIEMENAK, N.; TRANBARGER, T. J. Pluripotent versus totipotent plant stem cells: Dependence versus autonomy? **Trends Plant Sci.** v. 12, p. 245-252, 2007.

VIU, Alessandra FM et al. Endogenous and exogenous polyamines in the organogenesis in *Curcuma longa* L. **Scientia horticultrae**, v. 121, n. 4, p. 501-504, 2009.

VOGEL, G. How does a single somatic cell become a whole plant? **Science** v. 309, p. 86, 2005.

WAGNER, H.; KREHER, B.; LOTTER, H.; HAMBURGER, M. O.; CORDELL, G. A. Structure determination of new isomeric naphtho[2,3-b]furan-4,9-diones from *Tabebuia avellaneda* by the selective-INEPT technique. **Helvetica Chimica Acta**, v. 72, p. 659–667, 1989.

WERNER, E. T.; CUZZUOL, G. R. F.; PESSOTTI, K. V.; LOPES, F. P.; ROGER, J. A. Controle da calogênese do Pau-Brasil *in vitro*. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v. 33, n. 6, p. 987-996, 2009.

WUERZBERGER, S.; PINK, J. J.; PLANCHON, S. M. Induction of apoptosis in MCF-7: WS8 breast cancer cells by beta-lapachone. **Cancer Research**, v. 58, p. 1876-1885, 1998.

WU, Guoyao. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. **Amino acids**, v. 37, n. 1, p. 1-17, 2009.

WU, Xiao-Ba et al. Involvement of polyamine biosynthesis in somatic embryogenesis of Valencia sweet orange (*Citrus sinensis*) induced by glycerol. **Journal of plant physiology**, v. 166, n. 1, p. 52-62, 2009.

YEMM, E. W.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **Biochem. J.**, v. 57, p. 508-514, 1954.

ZANI, C. L.; DE OLIVEIRA, A. B.; DE OLIVEIRA, G. G. Furanonaphthoquinones from *Tabebuia ochracea*. **Phytochemistry**, v. 30, p. 2379-2381, 1991.

SEGUNDA PARTE**Artigo**

Exogenous Putrescine effects on the cellular growth, biochemical aspects and endogenous polyamines levels of *Handroanthus impetiginosus* callus

Efeito da putrescina exógena sobre o crescimento celular, aspectos bioquímicos e níveis endógenos de poliaminas em calos de *Handroanthus impetiginosus*.

Formatado de acordo com as normas do periódico Ciência e Agrotecnologia

Exogenous Putrescine effects on the cellular growth, biochemical aspects and endogenous polyamines levels of *Handroanthus impetiginosus* callus

Efeito da putrescina exógena sobre o crescimento celular, aspectos bioquímicos e níveis endógenos de poliaminas em calos de *Handroanthus impetiginosus*.

Leila Mc Leod¹

Thiago Corrêa de Souza²

Breno Régis Santos²

Plinio Rodrigues dos Santos Filho¹

¹Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Alfenas;

²Instituto de Ciências da Natureza, Universidade Federal de Alfenas

ABSTRACT

Handroanthus impetiginosus, popularly known as Ipê Roxo is native to South America, occurring in Brazil from the Amazon to Rio Grande do Sul. This plant has considerable medicinal and wood potential. Polyamines are found in all organisms and are involved in different biological processes such as vegetative growth, regulation and DNA duplication, transcription, foliar senescence and response to environmental stresses. Therefore, the objective of this work was to evaluate the effect of exogenous application of putrescine (PUT) on biochemical aspects and accumulation of polyamines in callus of *Handroanthus impetiginosus*. For this, internodal segments were used for callus induction using 1 μmol / L of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4 D) and different concentrations (1, 10, 50 and 500 μM) of PUT. There was no statistical difference in the fresh mass after 35 days of culture, but after 70 days an increase in the mass of callus treated with PUT was observed. This result is related to the sugar content. At the end of the cultivation, there was an increase in soluble sugars concentration in callus treated with PUT, whereas at 35 days there was no difference in them, but there was accumulation of starch, which was possibly hydrolyzed to form soluble sugars. For total amino acids, there was statistical difference only in the treatment with 500 μM PUT after 70 days of culture. In general, at 35 days, PUT and spermine (SPM) were the most abundant polyamines in calluses. Spermidine (SPD) had the lowest levels. The supplementation with PUT did not cause a significant variation in the polyamine content between the treatments, and only in the treatment with 1 μM PUT there was an increase in the PMS levels in relation to the control. The other polyamines were statistically equal to the control in all treatments. Already at 70 days of cultivation, it was not possible to identify any polyamine in the control. In the treatments supplemented with 1, 10 and 50 μM PUT the most abundant polyamine again was SPM.

SPD was not identified in any of the treatments. It can be suggested based on the results that the PUT applied exogenously in the culture medium in the treatments has been converted into SPM, so it has been found to be in abundant levels in the treatments.

Keywords: Ipê; polyamines; Amino acids

INTRODUCTION

Polyamines are aliphatic amines, which can be found in different living organisms, including animals, bacteria and plants (LIU et al., 2015). Putrescine, spermidine and spermine are the most abundant polyamines in plants, and they have been associated with the regulation of different physiological processes such as, vegetative growth, DNA duplication, gene transcription, cell division, organ development, fruit ripening, leaf senescence, responses to environmental changes (LIMA et al., 2003), participation in nitrogen metabolism (AZIZ et al., 1998), and morphogenesis (GALSTON and KAURSAWHNEY, 1995) and somatic embryogenesis (PAUL; MITTER; RAYCHAUDHURI, 2009)

These molecules are synthesized from the amino acids arginine and ornithine, by the enzymes arginine decarboxylase (ADC) and ornithine decarboxylase (ODC). Putrescine is the first polyamine to be synthesized, which is subsequently converted to spermidine and sperminated by the transfer of aminopropyl groups by s-adenosylmethionine decarboxylase (dSAM) catalyzed by the enzyme spermidine synthase and spermine synthase, respectively (KAUR et al., 2003).

Handroanthus impetiginosus, belongs to the Bignoniaceae family and is commonly known as ipê-roxo (GENTRY, 1992). It is native to the America continent and occur in Brazil from the Amazon to the Rio Grande do Sul (CASTELLANOS et al.,

2009). This plant has remarkable wood and medicinal potential as well as being ornamental due to the beauty of its flowers. Although produced in large numbers, the seeds have low viability, which may limit the acquisition of new seedlings (LIU et al., 2015). In this way, the tissue culture technology can be useful for the vegetative propagation of this plant (THORPE, 2007). In addition, there are no papers addressing the role of polyamines in the *in vitro* development of this plant. So, the aim of this work was to evaluate the effect of putrescine exogenous application on the biochemical aspects and in the homeostasis of polyamines in *Handroanthus impetiginosus* callus induction and growth.

MATERIAL E METHODS

Plant material and callus induction

Ipê-roxo seeds were collected in Alfenas-MG and stored at room temperature. In the moment of the use, the seeds were disinfested with ethanol (70°GL) for 1 minute and sodium hypochlorite for 5 minutes. They were washed three times with distilled and autoclaved water and were inoculated in WPM medium (LOYD; MCCOWN, 1980) for establishing *in vitro* plants. After 4 weeks of cultivation, stem segments (1 cm) were obtained from the plants and inoculated in MS medium (MURASHIGE; SKOOG, 1962) supplemented with sucrose (30 g L⁻¹), citric acid (10 mg L⁻¹) agar (6 g L⁻¹), 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid 1 µmol L⁻¹) and different concentrations of putrescine (1, 10, 50 and 500 µM) and a control with absence of putrescina. Putrescine was added to the

medium after autoclaving using a sterile disposable filter membrane (MILIPORE) containing 0.22 μm pores. Tissue flasks were kept at $25 \pm 1^\circ\text{C}$, photoperiod of 12 hours and irradiance of $36 \mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$. The evaluations were done after 35 and 70 days, when the calli were collected, weighed and stored at -80°C until the moment of the analysis.

Extraction of primary metabolites

Samples of Callus (200 mg) were ground in 2 mL of an MCW solution (methanol:chloroform:water, 12:5:3 v:v:v) and incubated at room temperature for 24 h. After this period, the samples were centrifuged for 30 min at 1,500g, and the supernatant was mixed with chloroform and water (4:1:1.5 v:v:v). The aqueous phase was collected after 24 h and used for the analysis of amino acids, and soluble sugars. Starch was extracted from the pellet after centrifugation by incubating with 30 % PCA (MCCREADY et al., 1950).

Total soluble sugars and starch were determined colorimetrically after reaction anthrone (YEMM; Willis, 1954). Briefly, samples were mixed with water in a final volume of 1 ml and mixed with 2 ml of anthrone reagent (20 mg anthrone, 500 μl water and 10 ml concentrated H_2SO_4). The samples were shaken and subsequently heated at 100°C for 5 min. Absorbance was determined at 620 nm and quantification based on standard curve of glucose.

Free polyamines determination

Samples of Callus (500 mg) were macerated in 3 mL of 5% perchloric acid (v/v) and kept at 4 °C for 1 hour. After that, the samples were centrifuged at 15000g for 20 min at 4 °C and supernatants were collected. Free polyamines were derivatized by dansyl chloride diluted in acetone at the concentration of 5mg ml⁻¹. An aliquot of 40 µl of the samples were added to 100 µl of dansyl chloride and 50 µl of saturated sodium carbonate. This mixture were incubated in the dark for 50 minutes at 70 °C.

After that, the excess of dansyl chloride was converted to dansyl proline by the addition of 25 µl of proline (100mg ml⁻¹). After 30 minutes incubation the dansylated polyamines were extracted by the addition of 200 µl of toluene. The toluene phase was collected and dried in nitrogen and the dansylated polyamines were solubilized in 200 µl of acetonitrile. The polyamines were separated and analyzed from the by reverse phase HPLC using a 5 µm, 250 mm x 4.60 mm C-18 column. The mobile phase was composed of absolute acetonitrile (solvent A) and 10% acetonitrile in water (pH 3.5; solvent B) in a flow rate of 1 ml/min at 40 °C. The gradient of solvent A were as follows: 65% over the first 10 minutes, 65 to 100% between 10 and 13 min and 100% between 13 and 21 min. (SILVEIRA et al., 2004).

The concentration of the polyamines will be monitored with a fluorescence detector operating at excitation wavelength of 340 nm and emission of 510 nm. Free polyamines were derivatized by dansyl chloride diluted in acetone at the concentration of 5mg ml⁻¹. An aliquot of 40 µl of the sample was added to 100 µl of dansyl chloride, 50 µl of saturated sodium carbonate. The sample was incubated in the dark for 50 minutes at 70 °C. The excess of dansyl chloride was converted to dansyl proline by the addition of 25 µl of proline (100mg ml⁻¹). After 30 minutes of incubation the dansylated polyamines will be extracted by the addition of 200 µl of toluene. The toluene phase was collected and dried

in nitrogen, the dansylated polyamines were solubilized in 200 μ l of acetonitrile. As standards, the commercial compounds putrescine, spermidine and spermine

STATISTICAL ANALYSIS

The experimental design was thoroughly randomized including 5 treatments and 5 repetitions per treatment. The data were submitted to analysis of variance and the means were compared by the Tukey test at 5% of significance.

RESULTS AND DISCUSSION

There was not statistical difference between the treatments after 35 days of cultivation for callus fresh mass (figure 1). However, after 70 days of cultivation the fresh mass varied considerably between the treatments (Figure 1). The callus treated with PUT showed an increase in the fresh mass when compared to control. According to Morgor, G (2007) the contents of polyamines are related to the active growth of tissues. In *Momordica dioica* the application of exogenous PUT at 1 μ M concentration significantly increased the fresh mass of the embryogenic calli (THIRUVENGADAM, M. et al., 2013).

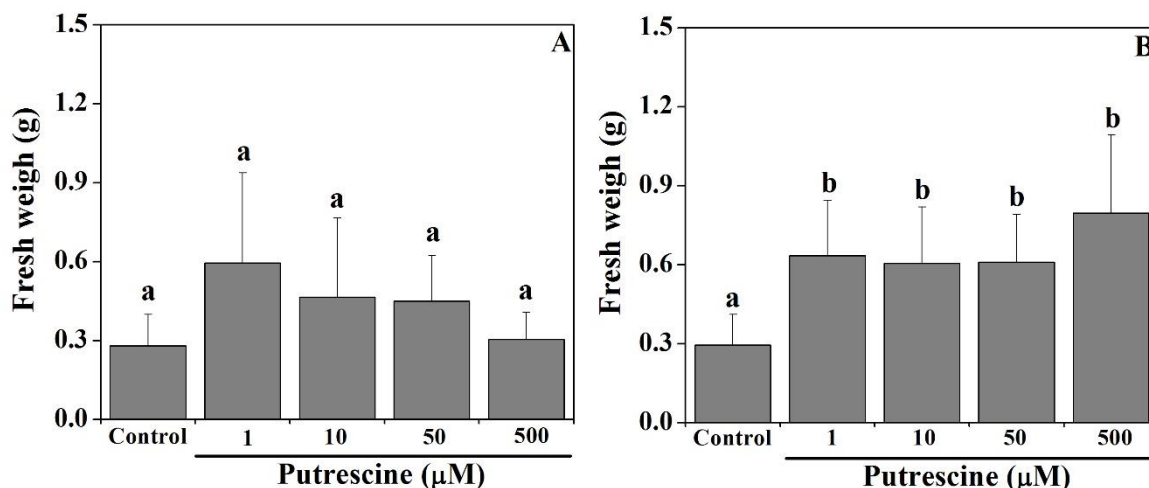


Figure 1: Callus fresh mass (A) 35 days; (B) 70 days in callus of *Handroanthus impetiginosus* supplemented with different concentrations of Putrescine. Same letters indicate that the data do not differ according to the Tukey test at 5% significance

In the same way, total soluble sugars did not differ after 35 days of cultivation (figure 2C). Additionally, after 70 days the higher levels were observed with 500 μM of PUT while the other treatments were statistically equal (Figure 2D). In contrast, the starch content varied at 35 days of culture (Figure 2A), being the higher concentration noted with 10 μM of PUT. Control and 1 μM of PUT treatments presented the lowest levels, while 50 and 100 μM of PUT were statistically equal to the other treatments. Thus, the exogenous application of putrescine induced the accumulation of starch at 35 days and soluble sugars at 70 days cultivation.

Starch content and soluble sugars are directly associated since the starch is a polysaccharide used as an energy reserve and when hydrolyzed it is transformed into glucose for immediate use of the cell. According to these results it is possible that the starch has been hydrolyzed after 70 days resulting in an increase in soluble sugars (Figure 2B). The relationship between polyamines and sugars in callus formation is not well known, nevertheless Handa and Mattoo (2010) found a positive correlation between endogenous levels of PUT and occurrence of sucrose, glucose and fructose, while

spermidine and spermina presented negative correlation. In addition, Peng et al. (2014) verified increased α -amylase activity, reducing sugar, fructose and glucose content and transcript level of β -amylase gene but not transcript level of α -amylase gene. In this work the highest concentrations of sugars in the presence of 500 μ M PUT may be associated both to the higher carbon uptake of the culture medium and to the cellular processes that have led to such levels.

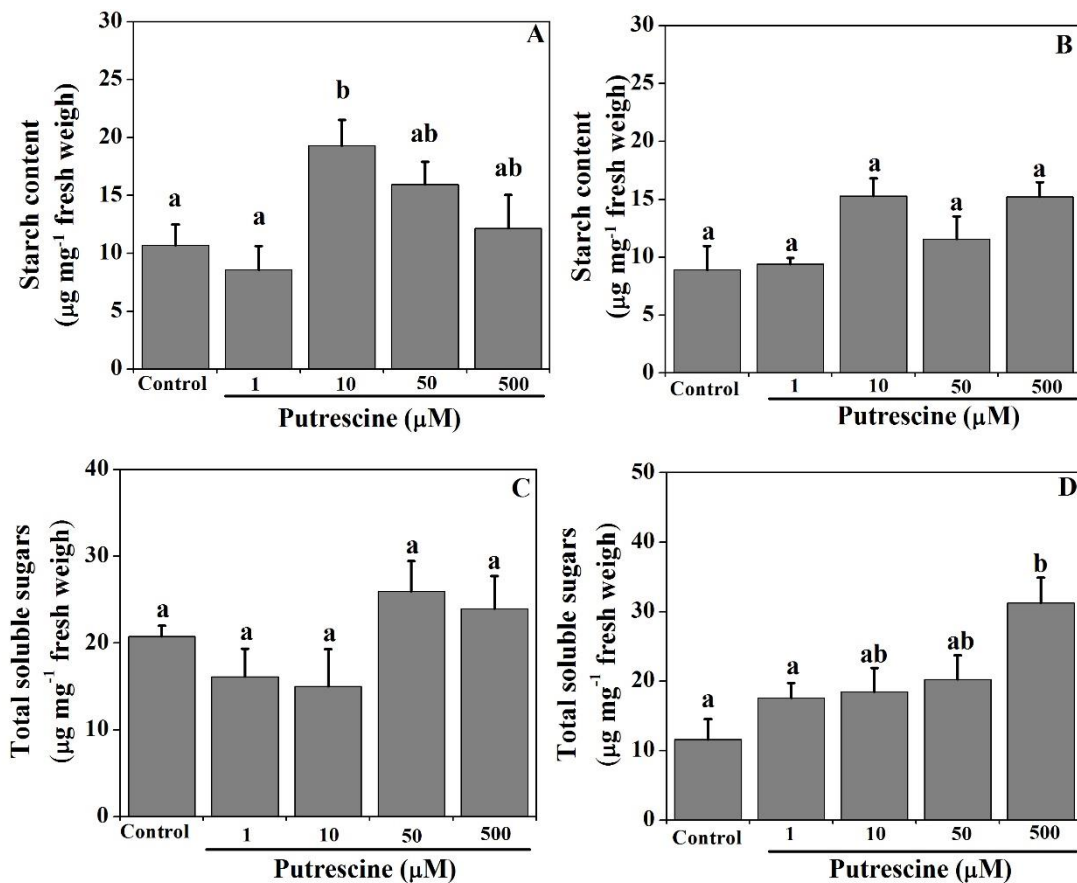


Figure 2: Starch content (A) 35 days; (B) 70 days; And Total sugars (C) 35 days; (D) 70 days in callus of *Handroanthus impetiginosus* supplemented with different concentrations of Putrescine. Same letters indicate that the data do not differ from each other according to the Tukey test at 5% significance.

With regard to total amino acids content, in the same way of total soluble sugars and fresh mass, there was no statistical difference after 35 days of cultivation. But after 70 days of

culture, callus treated with 500 μM PUT showed higher levels of amino acids (Figure 3), with other treatments being statistically equal. In *Allium cepa* foliar application of PUT increased the content of total sugars and amino acids (AMINS et al., 2011). However, SPM and PUT increased the total sugars content, but decreased total free amino acids in leaves of *Matricaria chamomilla*.

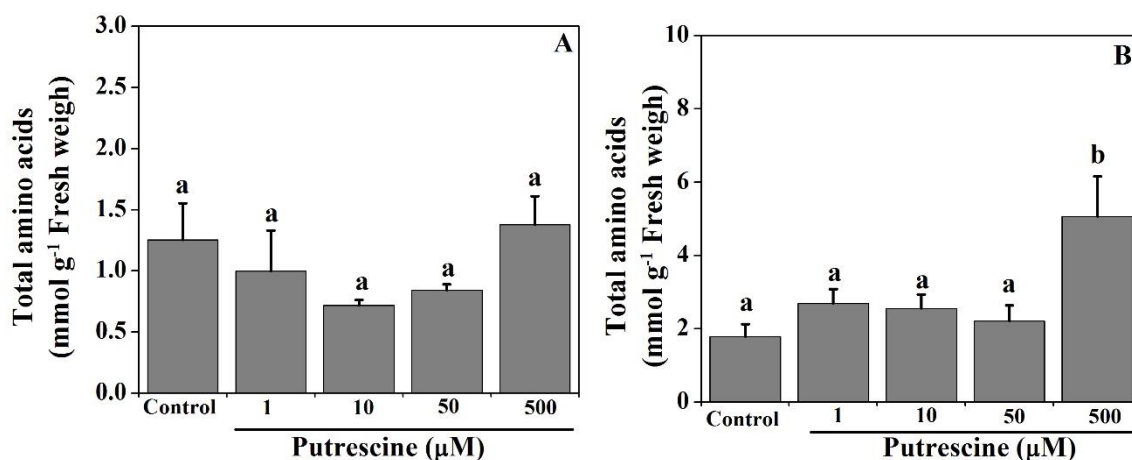


Figure 3: Total amino acids content in callus of *Handroanthus impetiginosus* supplemented with different concentrations of Putrescina. (A) 35 days; (B) 70 days. Same letters indicate that the data do not differ from each other according to the Tukey test at 5% significance.

As can be seen in figure 4A, generally at 35 days, PUT and SPM were the most abundant polyamines in the callus. The SPD presented the lowest levels. Note that the supplementation with PUT did not cause significant variation in the polyamine content between treatments, and only in the treatment with 1 μM PUT there was an increase in SPM levels in relation to the control. The other polyamines were statistically equal to the control in all treatments. At 70 days of culture, as shown in figure 4B, it was not possible to identify any polyamine in the control. In treatments supplemented with 1, 10 and 50 μM PUT the most abundant polyamine was also SPM. SPD was not identified in the

treatments. It can be suggested that the PUT applied exogenously in the culture medium in the treatments has been converted to PMS, because of this, it has been detected in abundant levels in the treatments. In the somatic embryogenesis of *Ocotea catharinensis* the addition of PUT at 1 mM had no effect on endogenous polyamine concentrations, however the addition of SPM at the same concentration increased the endogenous levels of SPM and PUT and the addition of SPD in the same concentration increased SPD levels relative to the other polyamines (SANTA CATARINA et al., 2007). The exogenous application of PUT in *Coffea canefora* in addition to causing an increase in somatic embryogenesis increased endogenous SPM levels (KUMAR et al., 2008).

In *Momordica charantia* L the exogenous application of PUTs in embryogenic callus at 1 mM concentration, which showed an increase in somatic embryogenesis, resulted in a decrease in the endogenous content of the free polyamines when compared to the control (PAUL; MITTER; RAYCHAUDHURI, 2009). Thus, it is clear that polyamines are important compounds for the development of plants, especially under *in vitro* culture conditions, but their effects should be evaluated in each case.

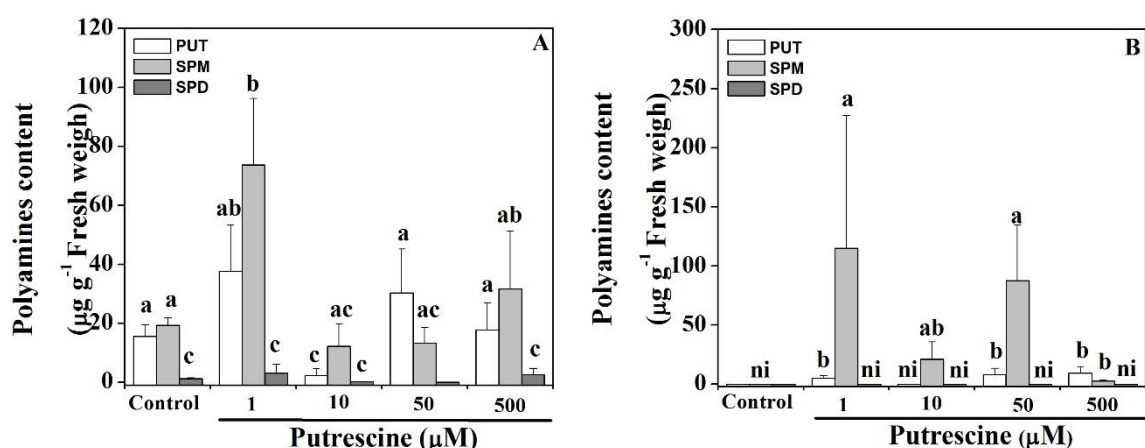


Figure 4: Polyamines content in callus of *Handroanthus impetiginosus* supplemented with different concentrations of Putrescine. (A) 35 days; (B) 70 days. Same letters indicate that the data do not differ according to the Tukey test at 5% significance

REFERENCES

ABD EL-WAHED, M.S., GAMAL EL-DIN, K.M. Effect of putrescine and Atonik on growth and some biochemical constituents as well as essential oil composition of chamomile plant (*Chamomilla recutita* L., Rausch). **Journal Agriculture Science**. Mansoura Univ.30,(869–882), 2005.

AMIN, A. A. et al. Physiological response of onion plants to foliar application of putrescine and glutamine. **Scientia horticulturae**, v. 129, n. 3, p. (353-360), 2011.

AZIZ, A.; MARTIN-TANGUY J. and LARHER F. Stress-induced changes in polyamine and tyramine levels can regulate proline accumulation in tomato leaf discs treated with sodium chloride. **Physiologia Plantarum**, v. 104, p. (195-202), 1998.

CASTELLANOS, J. R.; PRIETO, J. M.; HEINRICH, M. “RED LAPACHO (*Tabebuia impetiginosa*)-a global ethnopharmacological commodity?”. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 121, p. (1–13), 2009.

GALSTON, A.W.; KAUR-SAWHNEY, R. Polyamines as endogenous growth regulators. In: DAVIES, P.J. (Ed.), **Plant hormones physiology, biochemistry and molecular biology**. Dordrecht: Kluwer, 1995. p.(158-178).

GENTRY, A. H. Flora Neotropica: Bignoniaceae - Part II (tribe Tecomeae). **Flora Neotropica Monograph**, v.25, n.2, p.(1-130). 1992.

HANDA, A K.; MATTOO, A K. Differential and functional interactions emphasize the multiple roles of polyamines in plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 7, p. (540-546), 2010.

KARUPPUSAMY S. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ and cell cultures. **Journal Med Plants Res**. v. 3 p. (1222–1239), 2009.

KAUR-SAWHNEY R, TIBURCIO AF, ATABELLA T, GALSTIN AW. Polyamines in plants: Na overview. **Journal of Cell and Molecular Biology** 2, (1-12), 2003.

KUMAR, Vinod et al. Polyamines influence morphogenesis and caffeine biosynthesis in in vitro cultures of *Coffea canephora* P. ex Fr. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 30, n. 2, p.(217-223), 2008.

LIU, J. H., WANG, W., WU, H., GONG, X., & MORIGUCHI, T. (2015). Polyamines function in stress tolerance: from synthesis to regulation. **Frontiers in plant science**, 6.

LIMA, G.P.P., PIZA, I.M.T., HENRIQUE, A., TAKAKI, M. Polyamines as salinity biochemical marker in callus of *Eucalyptus urograndis*. **Ciência Florestal** 13, 43–48, 2003.

LI, Z., PENG, Y., ZHANG, X. Q., MA, X., HUANG, L. K., & YAN, Y. H. (2014). Exogenous spermidine improves seed germination of white clover under water stress via involvement in starch metabolism, antioxidant defenses and relevant gene expression. **Molecules**, 19(11), 18003-18024.

LLOYD, G.; Mc COWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* spp. **HortScience**, v. 15, p.416, 1980.

MINGUET, E.G., VERA-SIRERA, F., MARINA, A., CARBONELL, J., BLÁZQUEZ, M.A. Evolutionary diversification in polyamine biosynthesis. **Molecular Biology**. *Evol.* 25, (2119–2128), 2008.

MÓGOR, G.; LIMA, G. P P; MÓGOR, A. F. Efeito de poliaminas exógenas no crescimento inicial in vitro e nos teores de fenóis, poliaminas e atividade da peroxidase em *Aloe vera* (L.) Burm. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 3, p. (37-47), 2007.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**, v. 15, n. 3, p.(473-479), 1962.

MCCREADY, R. M.; GUGGOLS, J.; SILVEIRA, V.; OWENS, H. S. Determination of starch and amylase in vegetables; application to peas. **Analytical Chemistry**, v. 22, p.(1156–1158), 1950.

PAUL, A; MITTER, K; RAYCHAUDHURI, S Effect of polyamines on in vitro somatic embryogenesis in *Momordica charantia* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 97, n. 3, p. (303-311), 2009.

SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V.; SCHERER, G. F. E.; FLOH, E. I. S. Polyamine and nitric oxide levels correlate with morphogenetic evolution in somatic embryogenesis of *Ocotea catharinensis*. **Plant Cell Tissue Org Cult** 90: (93–101), 2007

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 embryonic suspension cultures of *Pinus taeda*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 76, p. (53-60), 2004.

TASSONI, A., VAN BUUREN, M., FRANCESCHETTI, M., FORNALÈ, S., & BAGNI, N. (2000). Polyamine content and metabolism in *Arabidopsis thaliana* and effect of spermidine on plant development. **Plant Physiology and Biochemistry**, 38(5), 383-393.

THIRUVENGADAM, M., REKHA, K. T., JAYABALAN, N., PRAVEEN, N., KIM, E. H., & CHUNG, I. M. (2013). Effect of exogenous polyamines enhances somatic embryogenesis via suspension cultures of spine gourd (*Momordica dioica* Roxb. ex. Willd.). **Australian Journal of Crop Science**, 7(3), 446.

THORPE, Trevor A. History of plant tissue culture. **Molecular biotechnology**, v. 37, n. 2, p. (169-180), 2007.

YEMM, E. W.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **Biochemical Journal**, v. 57, p. (508-514), 1954.