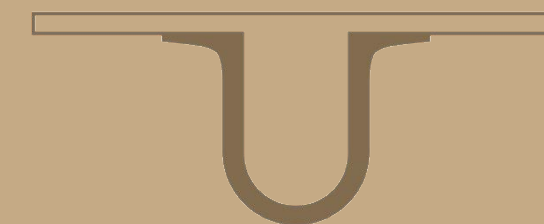




UNIVERSIDADE DE
COIMBRA



Daniela Sofia Duarte Pedrosa

**CLONAGEM *IN VITRO* DE *ANREDERA CORDIFOLIA* (TEN.)
STEENIS E ANÁLISE DE EXSUDADOS**

Dissertação de Mestrado na área científica de Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal orientada pelo Professor Doutor Jorge Manuel Pataca Leal Canhoto e pela Doutora Vanessa Isadora Tolentino Almeida Santos Pereira, apresentada ao Departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Agosto de 2018

Clonagem *in vitro* de *Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis e análise de exsudados

Daniela Sofia Duarte Pedrosa

Dissertação de Mestrado na área científica de Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal orientada pelo Professor Doutor Jorge Manuel Pataca Leal Canhoto e da Doutora Vanessa Isadora Tolentino Almeida Santos Pereira, apresentada ao Departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Agosto de 2018



UNIVERSIDADE D
COIMBRA



Agradecimentos

Concluída esta etapa, resta-me agradecer a todos aqueles que me acompanharam até aqui, ajudando-me a ultrapassar os diversos obstáculos que foram surgindo e que contribuíram, de alguma forma, para a concretização deste projeto.

Começo por agradecer ao meu orientador Prof. Doutor Jorge Canhoto por todo o apoio, pela partilha de conhecimentos, pela disponibilidade e orientação. Foi, sem dúvida alguma, fundamental para a realização deste trabalho.

Agradeço também à minha orientadora Doutora Vanessa Pereira, por todo o apoio e especialmente pela enorme oportunidade que me foi dada.

À professora Maria Graça Campos por disponibilizar o laboratório e o material necessário para a análise HPLC.

Ao André Caeiro pelo acompanhamento, nomeadamente na análise do pigmento, pela paciência e disponibilidade.

Ao João Martins por todas as dicas e sugestões relativamente à micropropagação.

A todos os meus colegas de laboratório, que, para além de ótimos colegas, se tornaram também grandes amigos e companheiros de gargalhadas. Obrigada André Caeiro, João Martins, Mariana Neves, Inês Mota e Elsa Baltazar por todos os momentos de descontração que me proporcionaram.

Às minhas companheiras de mestrado, Nádía Correia e Isabel Cardoso, pelo que passamos juntas nestes últimos 2 anos e por, de alguma forma, acompanharem todos os meus dilemas e vitórias neste processo. Grata pela amizade que ficou.

Em geral, a todos os meus amigos, pela força, motivação, companheirismo, entreatajuda e por sempre estarem presentes quando precisei.

Por fim, mas não menos importante, à minha família. Que me apoiou sempre até aqui, que me ouviu nos meus piores dias e que sempre lutou por um futuro melhor para mim. Obrigada por quererem isto tanto como eu.

Resumo

Anredera cordifolia, vinha-da-madeira, é de uma planta nativa da América do Sul que se encontra incluída na flora exótica de Portugal. Apesar de pouco conhecida no nosso país, é utilizada como planta medicinal em vários países asiáticos.

Este trabalho centrou-se em dois pontos fundamentais, nomeadamente na clonagem *in vitro* de *Anredera cordifolia* e na produção de pigmentos em meio líquido.

No que se refere à clonagem *in vitro*, foram testados seis meios MS com diferentes concentrações de BA e NAA, avaliando-se posteriormente o crescimento das plantas, o número total de plantas regeneradas, o número de entrenós, a taxa de enraizamento, a presença de calos e a presença de pigmento no meio de cultura.

Para a produção de pigmentos em meio líquido, foram utilizados calos de folhas e entrenós, em meios de cultura com diferentes concentrações de NAA, 2,4-D e BA. Neste parâmetro foi também avaliado o efeito de diferentes tamanhos de balões na cultura (20 ml e 50 ml), bem como o efeito da luz e o tempo das amostras em cultura.

Em relação ao estudo da clonagem *in vitro*, o meio onde se verificou um maior crescimento foi no meio M5 (meio MS + 0,05 mg/L BA + 1,00 mg/L NAA), com uma média de 3,14 cm. Porém, no meio M2 (Meio MS + 0,05 mg/L BA) registaram-se os melhores resultados quanto ao número de nós, com cerca de 3,72 nós por rebento.

Relativamente à indução de calo, o meio C4 (meio MS + 1,0 mg/L 2,4-D + 0,2 mg/L BA) permitiu obter o maior crescimento, com valores de 653,7 mg e 732,4 mg para calos de entrenós e folhas, respetivamente. Na ausência de BA, não se verificou pigmentação do meio.

Quanto à produção de pigmento em meio líquido, registou-se melhores resultados no meio com BA e NAA e em balões de Erlenmeyer de 50 ml.

Os resultados da análise HPLC não foram permitiram retirar conclusões sobre o tipo de pigmento em análise.

Palavras-chave: betalainas; calos; clonagem *in vitro*; pigmentos; vinha-da-madeira

Abstract

Anredera cordifolia, madeira-vine, is a native plant of South America that is included in the exotic flora of Portugal. Although this species is not widely known in our country, it is traditionally used as a medicinal plant in several Asian countries.

This work focused on two fundamental points, the *in vitro* cloning of *Anredera cordifolia* and the production of pigments in liquid medium.

Regarding *in vitro* cloning, six MS media were tested with different concentrations of BA and NAA. Several aspects of the *in vitro* culture were evaluated, such as the plant growth, the total number of regenerated shoots, the number of internodes, the rooting rate, the presence of callus as well as the presence of pigments in the culture medium.

For pigment production, leaves, calli and internodes were tested in liquid culture media with different concentrations of NAA, 2,4-D and BA. In this parameter, the surface-concentration effect was evaluated, as well as the presence of light and the duration of samples in culture.

With regard to the *in vitro* cloning study, the highest growth was achieved in M5 medium (MS medium + 0.05 mg/L BA + 1.00 mg/L NAA), with an average of 3.14 cm per shoot. However, in M2 medium (MS Medium + 0.05 mg/L BA), an increase in the number of nodes was observed, with about 3.72 nodes per shoot.

Concerning to callus induction, the best response was achieved in the C4 medium (MS medium + 1.0 mg/L 2,4-D + 0.2 mg/L BA), with values of 653.7 mg and 732,4 mg for internodes and leaves, respectively. In the absence of BA, no pigmentation of the medium was observed.

Regarding pigment production in liquid medium, the best results were observed in the medium with BA and NAA as well as in 50 ml Erlenmeyer flasks.

The results of the HPLC analysis were not conclusive with respect to the pigment type under study.

Keywords: betalains; calli; *in vitro* cloning; madeira-vine ;pigments

Índice de figuras

Figura 1 - Aspectos morfológicos de *Anredera cordifolia*: A) Hábito arbustivo e de trepadeira; B) Aspecto das folhas; C) Detalhe de uma inflorescência (<https://jb.utad.pt>); D) Tubérculos aéreos (seta)

(<http://www.capetowninvasives.org.za/project/terrestrial/species/anredera-cordifolia>). . 4

Figura 2 - Distribuição geográfica de *Anredera cordifolia* em Portugal continental..... 6

Figura 3 – Estruturas gerais do ácido betalâmico (A), betacianinas (B) e betaxantinas (C) (Strack et al., 2003)..... 15

Figura 4 - Processo de biossíntese de betalainas. Reações enzimáticas: EI, hidroxilação da tirosina; EII, DOPA-4,5-dioxigenase; EIII, oxidação da L-DOPA; EIV, glicosilação da ciclo-DOPA; EV, glicosilação da betanidina; EVI, glicosilação adicional das betacianinas; EVII, acilação das betacianinas. Reações espontâneas previstas: SI, condensação (formação de aldimina). As reações enzimáticas EII e EIII são seguidas de uma reação de ciclização espontânea, estando por isso marcada com asterisco. EV pode ser alternativamente catalisado por uma betanidina 6-O-glicosiltransferase, levando à formação de um gomphrenina em vez de betanina. As linhas a tracejado designam a via alternativa, em que a ciclo-DOPA é primeiro glicosilada e depois condensa com o ácido betalâmico, formando a betanina (Polturak et al., 2018). 17

Figura 5 - Esquema representativo do desenho experimental utilizado na cultura de calos em meio líquido, sendo 15 o número de explantes utilizados. 26

Figura 6 - Efeito dos reguladores de crescimento e suas concentrações no alongamento dos rebentos caulinares. A) Média de crescimento de cada meio dos três ensaios e respetivo desvio padrão entre as réplicas. Os valores assinalados com a mesma letra não apresentam diferenças significativas ($p > 0,05$) segundo o teste de Tukey. B) Maior tamanho registado em cada meio de cultura. Meio 0, meio MS; Meio 1, meio MS + 0,05 mg/L BA; Meio 2, meio MS + 0,1 mg/L BA; Meio 3, meio MS + 0,2 mg/L BA; Meio 4, meio MS + 0,05 mg/L BA + 0,5 mg/L NAA; Meio 5, meio MS + 0,05 mg/L BA + 1,0 mg/L NAA..... 34

Figura 7 - Aspeto dos rebentos caulinares obtidos no ensaio 2. A) Amostras do meio M1; B) Amostras do meio M2; C) Amostras do meio M3; D) Amostras do meio M4; E) Amostras do meio M5; F) Amostras do meio M6.....	35
Figura 8 - Efeito dos reguladores de crescimento e suas concentrações no número de entrenós. A) Média do número de nós de cada meio e respetivo desvio padrão. Os valores assinalados com a mesma letra não apresentam diferenças significativas ($p>0,05$) segundo o teste de Tukey. B) Maior número de nós registado em cada meio. M1, meio MS; M2, meio MS + 0,05 mg/L BA; M3, meio MS + 0,1 mg/L BA; M4, meio MS + 0,2 mg/L BA; M5, meio MS + 0,05 mg/L BA + 0,5 mg/L NAA; M6, meio MS + 0,05 mg/L BA + 1,0 mg/L NAA.....	36
Figura 9 - Efeito dos reguladores de crescimento e suas concentrações no número de explantes enraizados em cada meio de cultura: M1, meio MS; M2, meio MS + 0,05 mg/L BA; M3, meio MS + 0,1 mg/L BA; M4, meio MS + 0,2 mg/L BA; M5, meio MS + 0,05 mg/L BA + 0,5 mg/L NAA; M6, meio MS + 0,05 mg/L BA + 1,0 mg/L NAA.....	37
Figura 10 - Média do número de rebentos caulinares obtidos em cada meio e respetivo desvio padrão. Os valores assinalados com a mesma letra não apresentam diferenças significativas ($p>0,05$) segundo o teste de Tukey. Meio M1, meio MS; Meio M2, meio MS + 0,05 mg/L BA; Meio M3, meio MS + 0,1 mg/L BA; Meio M4, meio MS + 0,2 mg/L BA; Meio M5, meio MS + 0,05 mg/L BA + 0,5 mg/L NAA; Meio M6, meio MS + 0,05 mg/L BA + 1,0 mg/L NAA.	38
Figura 11 – Aspeto dos calos obtidos no meio M1 (A) e no meio M6 (B). O círculo pretende indicar o calo obtido em cada uma das amostras.....	39
Figura 12 – Número de amostras obtidas com pigmento. Meio M1, meio MS; Meio M2, meio MS + 0,05 mg/L BA; Meio M3, meio MS + 0,1 mg/L BA; Meio M4, meio MS + 0,2 mg/L BA; Meio M5, meio MS + 0,05 mg/L BA + 0,5 mg/L NAA; Meio M6, meio MS + 0,05 mg/L BA + 1,0 mg/L NAA	40
Figura 13 – Média do peso dos calos obtidos para cada explante em cada meio. Os valores assinalados com a mesma letra não apresentam diferenças significativas ($p>0,05$) segundo o teste de Tukey. Meio 1, meio MS + 1,0 mg/L NAA; Meio 2, meio MS + 1,0 mg/L NAA + 0,2 mg/L BA; Meio 3, meio MS + 1,0 mg/L 2,4-D; Meio 4, meio MS + 1,0 mg/L 2,4-D + 0,2 mg/L BA.....	41
Figura 14 – Aspeto de amostra obtidas no meio C4 (A) e no meio C2 (B).	42

Figura 15 – Influência dos meios de cultura, explantes e tamanho dos balões no crescimento de calo. A) Média do peso inicial e final de calos de entrenós, mantidos no meio C2 em balões de 50 ml e 20 ml. B) Média do peso inicial e final de calos de folhas, mantidos no meio C2 em balões de 50 ml e 20 ml. C) Média do peso inicial e final de calos de entrenós, mantidos no meio C4 em balões de 50 ml e 20 ml. D) Média do peso inicial e final de calos de folhas, mantidos no meio C2 em balões de 50 ml e 20 ml. Meio C2: Meio MS + 1,0 mg/L NAA + 0,2 mg/L BA; Meio C4: Meio MS + 1,0 mg/L 2,4-D + 0,2 mg/L BA. 44

Figura 16 – Diferentes tonalidades de meios de cultura de calos registados após 10 dias em cultura. A) Amostra obtida com maior quantidade de pigmento, com calos de entrenós; B) Amostra com uma tonalidade mais alaranjada obtida com calos de folhas. 45

Figura 17 – Gráfico com as leituras de absorvância da amostra C3 (amostra mais pigmentada) após os 5 e 10 dias de cultura. 46

Figura 18 – Resultados obtidos da cultura de calos na ausência de luz. 46

Figura 19 – Cromatograma obtido com pigmento extraído do meio de cultura. 47

Abreviaturas

2,4-D - 2,4-diclorofenoxiacético

BA – 6-Benziladenina (6-Benzilaminopurina)

C1 - Meio MS com 1,0 mg/L NAA

C2 - Meio MS com 1,00 mg/L NAA e 0,2 mg/L BA

C3 - Meio MS com 1,0 mg/L 2,4-D

C4 - Meio MS com 1,0 mg/L 2,4-D e 0,2 mg/L BA

HPLC - Cromatografia líquida de alta pressão

L-DOPA - L-3,4-dihroxifenilalanina

M1 - Meio MS

M2 - Meio MS com 0,05 mg/L BA

M3 - Meio MS com 0,10 mg/L BA

M4 - Meio MS com 0,20 mg/L BA

M5 - Meio MS com 0,05 mg/L BA e 0,50 mg/L NAA

M6 - Meio MS com 0,05 mg/L BA e 1,00 mg/L NAA

MS – Meio de cultura de Murashige e Skoog (Murashige e Skoog, 1962)

NAA - Ácido 1-naftalenoacético

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

Ten. – Tenore Steenis

UC – Universidade de Coimbra

Sumário

Agradecimentos.....	i
Resumo.....	iii
Abstract.....	v
Índice de Figuras.....	vii
Abreviaturas.....	xi
1. Introdução.....	1
1.1. Contextualização do trabalho.....	1
1.2. <i>Anredera cordifolia</i>	2
1.2.1. Taxonomia.....	2
1.2.2. Caracterização da espécie.....	3
1.2.3. Distribuição geográfica.....	5
1.2.4. Propriedades nutricionais e medicinais.....	7
1.3. Cultura <i>in vitro</i>	8
1.3.1. Clonagem <i>in vitro</i>	8
1.3.2. Reguladores de crescimento.....	9
1.3.3. Indução e cultura de calos.....	10
1.4. Pigmentos.....	12
1.4.1. Pigmentos nas plantas.....	12
1.4.2. Betalaínas.....	14
1.4.3. Biossíntese das betaínas.....	16
1.4.4. Fontes de betalaínas.....	18
1.4.5. Propriedades das betalaínas.....	19
1.5. Objetivos.....	20
2. Materiais e Métodos.....	21

2.1. Material Vegetal.....	23
2.2. Clonagem <i>in vitro</i>	23
2.3. Indução e cultura de calos	24
2.4.5. Indução de calos	24
2.3.1. Cultura de calos em meio líquido.....	25
2.4. Análise HPLC	28
2.5. Análise estatística.....	29
3. Resultados	31
3.1. Clonagem <i>in vitro</i>	33
3.1.1. Comprimento dos rebentos caulinares	33
3.1.2. Nós.....	36
3.1.3. Número de rebentos enraizados	37
3.1.4. Número de rebentos caulinares	38
3.1.5. Formação de calo e produção de pigmento	39
3.2. Indução e multiplicação de calos	40
3.2.1. Indução de calos	40
3.2.2. Cultura de calos em meio líquido.....	43
3.3. Análise do pigmento por HPLC.....	47
4. Discussão.....	49
4.1. Clonagem <i>in vitro</i>	51
4.2. Indução e cultura de calos	53
4.3. Análise HPLC	55
5. Conclusão e perspectivas futuras	57
6. Bibliografia.....	61



1. Introdução

1.1. Contextualização do trabalho

A vinha-da-madeira - *Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis - é uma planta nativa da América do Sul, mais concretamente do Paraguai, sul do Brasil e norte da Argentina (Wagner *et al.*, 1999). Embora seja considerada uma planta tropical e subtropical, encontra-se mundialmente distribuída, especialmente em climas temperados suaves (Vivian-Smith *et al.*, 2007). Segundo Silva e Smith (2015), esta planta encontra-se já naturalizada em Portugal, desde a região norte ao centro do país, nomeadamente em Coimbra. Trata-se de uma planta perene, considerada uma trepadeira, mas que na ausência de um suporte físico, se pode apresentar com um hábito arbustivo ou mesmo rasteiro (Sperling, 1987).

Esta planta é utilizada com intuito ornamental, contudo, as suas folhas, também podem ser consumidas como um vegetal (Chuang *et al.*, 2007). Para além disso, a vinha-da-madeira é uma potencial planta medicinal, principalmente as suas folhas que possuem vários compostos de interesse, tais como flavonóides, terpenóides, óleos essenciais, taninos e ácido ascórbico (Singh *et al.*, 2014). Estes compostos conferem à planta propriedades antioxidantes, antibacterianas, anti-inflamatórias, entre outras (Uchida, 2003; Hammond *et al.*, 2006; Ferri, 2009). Apesar de pouco conhecida em Portugal, a vinha-da-madeira tem sido alvo de vários estudos graças às suas propriedades medicinais (Astuti *et al.*, 2011). No entanto, no que diz respeito à cultura *in vitro*, pouca informação existe (Schaller, 2016).

Desta forma, um dos principais objetivos deste projeto é a clonagem *in vitro* de *Anredera cordifolia*, testando o seu potencial de micropropagação em meio MS com diferentes concentrações de BA e NAA.

Estudos preliminares realizados no Laboratório de Biotecnologia do Centre for Functional Ecology do Departamento de Ciências da Vida da FCTUC mostraram que, em determinadas condições de cultura, os explantes estabelecidos *in vitro* libertavam para o meio de cultura um pigmento avermelhado, em particular quando ocorria a formação de um calo. Desta forma, os objetivos deste trabalho, incluem também a indução de calos em meios de cultura com diferentes concentrações de hormonas e a produção de pigmento em meio líquido, com o intuito de analisar e identificar o pigmento libertado.

1.2. *Anredera cordifolia*

1.2.1. Taxonomia

Anredera cordifolia possui diversas denominações comumente utilizadas, sendo essencialmente conhecida por “Binahong” na Indonésia, “Dhen San Chi” na China e vinha-da-madeira na América do Sul (Wagner *et al.*, 1999). Ao longo do tempo, *Anredera cordifolia*, teve vários nomes científicos devido a confusões na interpretação da sua taxonomia (Vivian-Smith *et al.*, 2007).

Em 1853, Tenore Steenis descreveu esta planta como *Boussingaultia cordifolia* a partir de amostras recolhidas em Buenos Aires. Contudo, em 1837, Hooker tinha já designado erradamente esta planta como *B. baselloides* tendo como base material vegetal introduzido em Inglaterra, proveniente de Buenos Aires (Guarino *et al.*, 1992). Posteriormente a Steenis, Miers (1864) criou uma nova designação, *B. gracilis*, baseando-se em plantas selvagens recolhidas em São Paulo. Miers foi o primeiro taxonomista a descrever os frutos da vinha-da-madeira.

Em 1957, Steenis corrigiu a nomenclatura para *Anredera cordifolia* a partir de material recolhido na Malásia, onde verificou diferenças na morfologia dos pistilos e na variabilidade de caracteres. Contudo, ao contrário de Miers, Steenis sustentou a ausência de fruto e sementes, afirmando que se tratava de uma planta estéril (Bailey, 1949; Van Steenis, 1957; Villa Carengo, 1966; Reitz, 1968; Hatschbach, 1974; Troncoso, 1987; Zapater, 1991). Mais tarde, Sperling (1987), clarificou esta situação, tendo mostrado que a espécie é capaz de produzir fruto com semente, todavia é um fenómeno que ocorre raramente, uma vez que esta planta se propaga sobretudo por via vegetativa. Mais recentemente Xifreda *et al.* (2000), publicaram estudos de análise cromossómica revelando a existência de duas subespécies: a subespécie *cordifolia* ($3n = 36$) e a subespécie *gracilis* ($2n = 24$). A subespécie *gracilis* tem a capacidade de produzir frutos com semente e encontra-se com uma maior facilidade nos seus países de origem. Já a subespécie *cordifolia* encontra-se mundialmente dispersa e, como se trata de um triplóide, propaga-se por via vegetativa, não produzindo nem frutos nem sementes (Vivian-Smith *et al.* 2007; Xifreda *et al.*, 2000). Isto explica a confusão gerada relativamente à frutificação e formação de sementes.

Atualmente, existe alguma incerteza quanto à denominação correta a aplicar, sendo o *taxon* ainda referido, erroneamente, como *Boussingaultia cordifolia* Ten. ou *Boussingaultia gracilis* Miers (Souza, 2014).

1.2.2. Caracterização da espécie

A vinha-da-madeira é uma planta perene, pertencente à família *Basellaceae*, do género *Anredera* e espécie *Anredera cordifolia* Tenore Stennis (Vivian-Smith *et al.*, 2007).

É considerada uma trepadeira, no entanto, na ausência de um suporte físico, pode apresentar-se como um arbusto ou com um hábito rasteiro (Fig. 1A). Os seus caules são finos, retorcidos e podem chegar aos 30 metros de comprimento. Quando jovens, são herbáceos com uma coloração avermelhada ou rosada, tornando-se posteriormente lenhosos e acastanhados (Sperling, 1987).

As folhas são alternadas, curto-pecioladas, largo-ovadas ou, por vezes, lanceoladas (Van Steenis, 1957). O nome *cordifolia* faz referência ao formato em coração das folhas, característico da espécie (Fig. 1B). Apresentam uma coloração verde escura, brilhante, com uma consistência carnosa e mucilaginosa e podem alcançar 15 cm de comprimento e 11 cm de largura (Van Steenis, 1957; Sperling, 1987; Martinevski, 2013).

As inflorescências apresentam-se em cacho simples ou ramificado, com inúmeras flores brancas, de 4 a 30 cm de comprimento (Fig. 1C). Os estames e estilete são também brancos, sendo o estilete mais curto que os estames e com 3 estigmas resultantes de ramificações a meio do estilete. Os filetes são triangulares, finos e curvados para fora. Cada flor é subtendida por uma pequena bráctea e o recetáculo é em forma de taça composto por duas bractéolas. As bractéolas superiores são esbranquiçadas, achatadas, com cerca de 1 a 2 mm e mais curtas do que o perianto (Van-Steenis, 1957; Sperling, 1987). Quanto ao fruto, tal como referido, apenas a subespécie *gracilis* é capaz de o formar. Neste caso, trata-se de uma cápsula globosa indeiscente que envolve uma única semente com perisperma farináceo e com dois cotilédones anulares (Xifreda *et al.*, 2000).

A vinha-da-madeira propaga-se normalmente por via vegetativa através de tubérculos aéreos ou presentes na raiz (Fig. 1D; Sperling, 1987). Para além dos

tubérculos, a reprodução pode também ocorrer a partir dos caules e rizomas (Christopher, 2008).

Devido a semelhanças morfológicas, a vinha-da-madeira pode ser confundida com a espécie *Basella alba* (Vivian-Smith *et al.*, 2007).

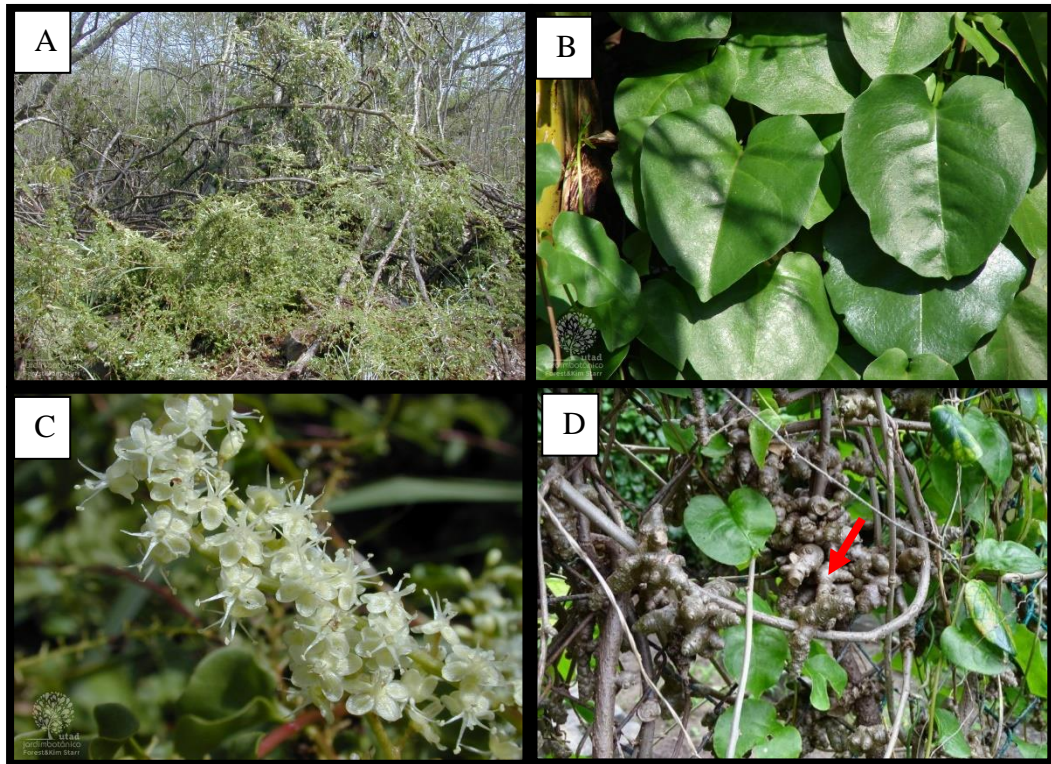


Figura 1 - Aspectos morfológicos de *Anredera cordifolia*: A) Hábito arbustivo e de trepadeira; B) Aspecto das folhas; C) Detalhe de uma inflorescência (<https://jb.utad.pt>); D) Tubérculos aéreos (seta) (<http://www.capetowninvasives.org.za/project/terrestrial/species/anredera-cordifolia>).

1.2.3. Distribuição geográfica

Como referido, a vinha-da-madeira é uma planta nativa do Paraguai, sul do Brasil e norte da Argentina (Wagner *et al.*, 1999). Apesar de ser considerada uma planta tropical e subtropical, encontra-se presente em todos os continentes, exceto na Antártida, sugerindo que capacidade de propagação da vinha-da-madeira se estende também a climas temperados suaves (Vivian-Smith, 2007; Lawson, 1999).

Inicialmente, a vinha-da-madeira foi introduzida em muitas regiões do mundo como uma planta ornamental, devido às suas folhas suculentas e flores perfumadas (Bailey, 1975; Floyd, 1989). Segundo Xifreda *et al.* (2000), os descobridores espanhóis e portugueses estão na base desta dispersão global.

Esta espécie possui várias características que a facilmente a qualificam como uma planta invasora, incluindo o seu rápido crescimento vegetativo que lhe permite competir de forma vantajosa com a vegetação nativa. Além disso, quando cortada, pode voltar a desenvolver-se rapidamente a partir da base dos ramos e dos tubérculos aéreos, tornando difícil a sua eliminação. É também muito competitiva do ponto de vista ecológico, sendo bastante tolerante ao stresse hídrico e a baixas temperaturas, assim como a doenças e pragas (Kinupp, 2007). Como consequência, a vinha-da-madeira é considerada uma planta invasora em vários países, tais como, Austrália, África do Sul, Havai, Nova Zelândia e outras ilhas do Pacífico (Vivian-Smith, 2007).

Em Portugal, pensa-se que esta planta já se encontra naturalizada sendo frequente, em muros e afloramentos rochosos nitrofilizados (Franco, 1971; Rainha e Silva, 1972). Apesar das suas características invasoras, em Portugal ainda não é considerada uma planta deste tipo. (Silva e Smith, 2015). É possível encontrar esta espécie vegetal desde a região norte ao centro de Portugal, preferencialmente no litoral, nomeadamente em Cascais, Coimbra, Ericeira, Sintra e Viana do Castelo (Fig. 2; Silva e Smith, 2015; Lourenço *et al.*, 2018).

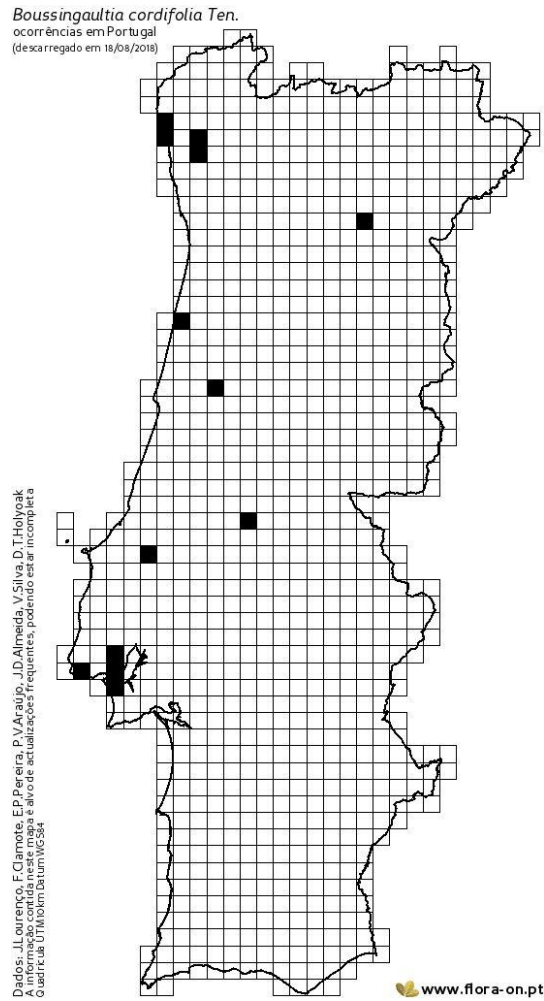


Figura 2 - Distribuição geográfica de *Anredera cordifolia* em Portugal continental. (<http://flora-on.pt/#/1boussingaultia>)

1.2.4. Propriedades nutricionais e medicinais

Apesar de pouco familiar em Portugal, a vinha-da-madeira faz parte dos hábitos alimentares de algumas sociedades, incluindo no Vietname, Taiwan, China e Coreias (Chuang *et al.*, 2007; Ferri, 2009).

Tanto as folhas como os seus ramos mais jovens, podem ser consumidos da mesma forma que o espinafre, apresentando um paladar semelhante a este vegetal (Kinup *et al.*, 2007; Martinesvki *et al.*, 2013). Martinesvki *et al.* (2013) determinaram a composição bromatológica de *Anredera cordifolia*, registando uma percentagem de 21,66% de proteína, 2,28% de lípidos, 19,81% de cinzas, 27,55% de fibras e 24,80% de carboidratos. Segundo Paiva (1997), a vinha-da-madeira é uma excelente fonte de vitaminas A e C, cálcio e iodo, podendo contribuir para a satisfação das necessidades básicas nutricionais da população. Para além disso, o teor de α -caroteno e β -caroteno nesta planta é também assinalável (Batista *et al.*, 2006).

Anredera cordifolia destaca-se também pelas suas propriedades medicinais. Quase todas as partes da planta podem ser utilizadas como fonte terapêutica, porém são as folhas o órgão mais usado (Manoi, 2009). A vinha-da-madeira possui vários compostos bioativos, como flavonóides, saponinas, polifenóis, terpenóides e mono e polissacarídeos que conferem à planta várias propriedades de interesse (Rachmawati, 2008; Djamil *et al.*, 2012). O extrato das folhas, em particular, apresenta uma boa atividade antimicrobiana, inclusivamente contra *Escherichia coli*, *Aspergillus niger*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhi* (Sen *et al.*, 2010). Esta atividade pode ser relevante para a produção de novos antibióticos (Deshmukh e Gaikwad, 2014). Para além das suas propriedades antimicrobianas, as folhas também apresentam uma boa capacidade antioxidante, e têm na sua composição ácido oleanólico, que atua como um anti-inflamatório e analgésico (Uchida, 2003; Hammond, 2006). De referir ainda que, nos tubérculos, foi detetada a proteína ancordina, capaz de estimular a formação de anticorpos (Netwall *et al.*, 1996).

Na medicina tradicional, esta planta é comumente utilizada no tratamento de doenças de pele, hipertensão, inflamações e gota (Djamil *et al.*, 2012; Sukandar *et al.*, 2013). Para além disso, a planta também tem sido usada no tratamento de diabetes

mellitus e de doenças sexualmente transmissíveis (Lin *et al.*,1988; Tshikalange *et al.*, 2005).

1.3. Cultura *in vitro*

1.3.1. Clonagem *in vitro*

A cultura *in vitro* consiste no estabelecimento e manutenção de células, tecidos, órgãos vegetais, plantas ou massas de células (calos), em condições laboratoriais assépticas. As técnicas de cultura *in vitro* têm sido cada vez mais aplicadas, com importante destaque na agricultura, floricultura, silvicultura e na transformação genética de plantas. Porém, apesar da sua importância, a cultura *in vitro* deve ser vista como uma alternativa ou um complemento a métodos tradicionais de multiplicação vegetativa e não como uma alternativa (Canhoto, 2010).

Existem ainda alguns problemas associados à micropropagação, tais como, frequentes contaminações, a necessidade de equipamentos dispendiosos e de mão-de-obra experiente, a pouca variabilidade genética e a observação de efeitos negativos do fenómeno de vitrificação após ciclos repetitivos de multiplicação como, por exemplo, a obtenção de folhas vitrificadas e o declínio na taxa de crescimento (Chawla, 2009). Entre os principais objetivos da cultura *in vitro*, destacam-se a clonagem de plantas, a produção de metabolitos secundários, a transformação genética, a fusão de protoplastos e a obtenção de plantas haplóides (Canhoto, 2010).

Na clonagem *in vitro* a principal vantagem em relação aos métodos convencionais, é a obtenção de um largo número de plantas num curto período de tempo e num espaço reduzido, tendo como origem uma única planta. Adicionalmente, esta metodologia garante a qualidade fitossanitária das plantas e representa um papel fundamental para o estabelecimento de bancos de germoplasma (Dodds e Roberts, 1985; Jha e Ghosh, 2005).

Uma das técnicas utilizadas baseia-se na proliferação de meristemas caulinares, onde são cultivados ápices caulinares ou segmentos nodais *in vitro*. Cada meristema pode assim formar um ou vários rebentos caulinares, cada um com vários fitómeros que podem

voltar a ser propagados, obtendo-se uma taxa de multiplicação exponencial (Chawla, 2009).

1.3.2. Reguladores de crescimento

Os sucessos obtidos na regeneração de plantas são devidos, em grande parte, à incorporação de hormonas vegetais nos meios de cultura (Canhoto, 2010). Apesar das plantas produzirem hormonas naturais, têm sido desenvolvidas hormonas sintéticas correspondentes a estas, designadas por reguladores de crescimento (Chawla, 2009). O tipo e a concentração de reguladores de crescimento usados, variam de acordo com o tipo de cultura de células ou tecidos e com a técnica de cultura *in vitro* utilizado (Smith, 2013). De entre os diferentes tipos de reguladores de crescimento que são conhecidos, existem dois grupos principais que são particularmente importantes na cultura *in vitro*, nomeadamente as auxinas e as citocininas (Trigiano e Gray, 2016).

As auxinas são utilizadas comumente pela sua capacidade de indução da divisão celular e para formação de raízes adventícias e de calos. Para além disso, são capazes de inibir o desenvolvimento de gomos axilares. Uma das auxinas mais utilizada em cultura *in vitro* é o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) que, tal como o ácido naftalenoacético (NAA), consegue reprogramar geneticamente as células, promover a desdiferenciação celular e, conseqüentemente, induzir a formação de calos (Chawla, 2009; Trigiano e Gray, 2016).

As citocininas, por sua vez, são promotores da divisão celular e controlam genes envolvidos na regulação do funcionamento dos meristemas. Para além disso, estão envolvidas na dominância apical e no retardamento da senescência, bem como na indução de embriogénese somática (Canhoto, 2010). Algumas das citocininas mais utilizadas na cultura *in vitro* são a cinetina (KIN), zeatina (citocinina natural) e 6-benzilaminopurina (BAP; Carvalho e Vidal, 2003).

1.3.3. Indução e cultura de calos

Calos são massas de células sem uma forma bem definida, com grande capacidade de crescimento formadas por células do tipo parenquimatoso, de paredes finas e que, frequentemente, são totipotentes. Quando a planta é ferida, formam-se calos na área do corte com o objetivo de proteger a planta, selando os tecidos danificados. A formação de calos tem sido verificada em quase todos os grupos de plantas (Evans *et al.*, 2003).

Em cultura *in vitro*, os calos têm como origem fragmentos de tecidos da planta (explante) colocados em meio sólido sob condições assépticas, vulgarmente designados explantes (Evans *et al.*, 2003).

As características gerais para o crescimento de calos envolvem relações entre o meio de cultura, sendo fundamental a presença de auxinas; o tipo de material vegetal utilizado e as condições ambientais durante o período de incubação. O estabelecimento de calos pode-se dividir em três estágios de desenvolvimento: indução, divisão celular e diferenciação (Dodds e Roberts, 1985).

Os calos obtidos podem apresentar diversas cores, como branco, verde ou altamente pigmentados devido à presença de pigmentos, como antocianinas. Para além da cor, os calos também variam quanto à sua consistência, podendo apresentar-se como calos friáveis ou mais compactos (Evans *et al.*, 2003). Uma característica muito importante dos calos, em termos funcionais, é o seu potencial em desenvolver raízes, gemas caulinares e embriões somáticos que possam gerar uma planta (Dodds e Roberts, 1985).

Após a obtenção de calos, estes podem ser transferidos para um meio líquido, criando uma cultura de células em suspensão, onde os calos exibem, por norma, um maior crescimento em comparação com o meio sólido (Evans *et al.*, 2003; Chawla, 2017).

A cultura de células ou de massas de células em suspensão tem grande potencial como método de estudo da biossíntese de metabolitos secundários (Seigler, 2012). Os metabolitos secundários não desempenham papéis vitais para o funcionamento fisiológico da planta, todavia são uma defesa importante contra predadores, atraem polinizadores e são capazes de combater doenças e infeções (Crozier *et al.*, 2008). Desta forma, a cultura de células em suspensão apresenta várias vantagens relativamente a

métodos convencionais utilizados para a produção destes compostos. Assim, a produção de compostos é independente de fatores ambientais, como o clima ou da presença de pestes e microrganismos causadores de doenças. Para além disso, os compostos de interesse podem ser produzidos em condições controladas, a produção de substâncias em meio quimicamente controlado facilita posteriormente as etapas de processamento e recuperação do produto, a cultura de células pode ser muito mais apropriada em casos em que as plantas são difíceis ou dispendiosas de crescer em campo devido aos seus longos ciclos de vida e algumas culturas de células apresentam a capacidade de biotransformar substratos específicos em produtos mais vantajosos através da sua atividade enzimática (Chawla, 2009).

1.4. Pigmentos

1.4.1. Pigmentos nas plantas

As plantas produzem mais de 200000 tipos de compostos diferentes, incluindo uma grande diversidade de pigmentos (Fiehn, 2002). A pigmentação das plantas é gerada pela interação da estrutura eletrônica do pigmento com a luz, que altera os comprimentos de onda que são refletidos ou transmitidos pelos tecidos. A coloração específica dos pigmentos depende das capacidades do observador (Davies, 2009). Por exemplo, os humanos reconhecem a cor de um composto através de comprimentos de onda refletidos ou transmitidos entre os 380 nm aos 730 nm, enquanto os insetos reconhecem comprimentos de onda inferiores (Davies, 2009). A cor é um dos atributos mais importantes a considerar nos alimentos, sendo por vezes necessário adicionar corantes para restaurar a cor perdida durante o seu processamento. Cada vez mais, os corantes alimentares sintéticos têm sido alvo de preocupação por parte da população, havendo uma procura maior por corantes naturais que são considerados inofensivos e até mesmo saudáveis, apesar de se tratarem de compostos menos estáveis e que envolvem maiores custos (Downham e Collins, 2000). Existem vários tipos de pigmentos nas plantas, sendo as clorofilas, carotenóides, flavonóides e betalaínas os mais comuns (Davies, 2009).

As clorofilas conferem a cor verde às plantas, apresentando os seus picos máximos de absorção aos 430 nm e 680 nm. São, naturalmente, o tipo de pigmento mais difundido nas plantas, dada a sua importância na fotossíntese, nomeadamente na captura de energia luminosa e como dadores primários de eletrões (Davies, 2009).

Os carotenóides são muito comuns nas flores (pétalas) e nos frutos (Sandmann *et al.*, 2006) e podem apresentar uma coloração que vai desde o amarelo ao vermelho (Fontana *et al.*, 2000; Ernst, 2002). Fora já identificadas mais de 700 espécies (Britton *et al.*, 1995), havendo duas classes principais de carotenóides: as xantofilas e os carotenos. À semelhança das clorofilas, estes compostos são também bastante importantes no processo de fotossíntese, desempenhando uma importante função protetora contra a foto-oxidação (Green e Durnford, 1996; Niyogi, 2000). Relativamente à nutrição e saúde humana, os carotenóides são uma boa fonte de provitamina A e possuem adicionalmente atividades anticancerígenas (Mayne, 1996). Alguns carotenóides são utilizados na

indústria alimentar como corantes, em cosméticos e também na indústria farmacêutica (Tanaka *et al.*, 2008).

Os flavonóides estão entre os metabolitos secundários das plantas melhor caracterizados tanto em termos químicos, como no que diz respeito às suas funções (Harborne, 1988, 1994; Stafford, 1990; Grotewold, 2006). Os flavonóides encontram-se praticamente em todos os órgãos da planta e acumulam-se nos vacúolos (Tanaka *et al.*, 2008; Davies, 2009;). Uma das suas principais funções passa por proteger as plantas dos stresses bióticos e abióticos. Para além disso, os flavonóides, desempenham outras funções auxiliares, por exemplo na defesa de primeira linha contra os raios UV (Day *et al.*, 1994; Harborne e Williams, 2000; Mazza *et al.*, 2000; Havaux e Kloppstech, 2001; Liakoura *et al.*, 2003; Kolb e Pfündel, 2005; Agati *et al.*, 2013). Do ponto de vista prático, os flavonóides são também importantes como fonte de antioxidantes (Tournaire *et al.*, 1993; Rice-Evans *et al.*, 1997; Russo *et al.*, 2000), que são fundamentais para a proteção da saúde humana contra doenças cardiovasculares e oncológicas (Van der Sluis *et al.*, 1997; Williamson *et al.*, 2000).

Relativamente às betalaínas, são compostos restritos da ordem *Caryophyllales*, com exceção das famílias *Caryophyllaceae* e *Molluginaceae* (Clement e Mabry, 1996). De acordo com a sua estrutura química, as betalaínas podem ser subdivididas em betacianinas, que apresentam uma cor avermelhada, ou em betaxantinas, sendo estas últimas amarelas (Strack *et al.*, 2003). Curiosamente, as betalaínas nunca coexistem com as antocianinas na mesma planta, uma observação que originou um aceso debate taxonómico (Clement e Mabry, 1996). Tal como as antocianinas, as betalaínas possuem também uma forte atividade antioxidante (Escribano, 1998; Gandía-Herrero *et al.*, 2012). Para além disso, destacam-se as suas atividades anticancerígenas, anti-lipídicas e antimicrobianas (Gengatharan *et al.*, 2015).

As antocianinas são os pigmentos naturais mais utilizados na gama dos vermelho e violeta, porém são muito instáveis a um pH acima de 3 (Stintzing e Carle, 2004). Como alternativa, as betacianinas são uma boa opção a usar em alimentos com pH mais elevado (Shenoy, 1993). Já na gama dos amarelos e laranjas, os carotenoides são o pigmento mais comum, contudo são pouco solúveis em água. Embora as fontes de betaxantinas sejam limitadas, estes compostos podem ser uma boa alternativa aos carotenoides, tendo em conta a sua solubilidade em água (Azeredo, 2009).

1.4.2. Betalaínas

As betalaínas são pigmentos hidrofílicos responsáveis não só pela coloração dos frutos e flores, mas também das raízes e folhas das plantas da ordem *Caryophyllales* (Wang *et al.*, 2007; Castellanos-Santiago e Yahia, 2008; Svenson *et al.*, 2008; Gandía-Herrero *et al.*, 2009). Apenas as espécies *Caryophyllaceae* e *Molluginaceae*, pertencentes a esta ordem, possuem antocianinas e não betalaínas. Estes dois tipos de pigmentos pertencem a famílias diferentes, e, como já referido anteriormente, nunca existem simultaneamente na mesma planta. Este fenómeno ainda não foi devidamente esclarecido, contudo, a nível bioquímico, foi demonstrado que enzimas relevantes para a produção de antocianinas não são expressas em plantas produtoras de betalaínas (Shimada *et al.*, 2007; Brockington *et al.*, 2011).

As betalaínas são pigmentos nitrogenados, sintetizados a partir do aminoácido tirosina e são divididos em dois grupos estruturais: as betacianinas, de cor avermelhada, e betaxantinas, de cor amarela. O ácido betalâmico (Fig. 3A) é o cromóforo comum a todos os pigmentos da família das betalaínas (Strack *et al.*, 2003). O grupo adicionado ao ácido betalâmico vai determinar se se trata de uma betacianina (Fig. 3B) ou de uma betaxantina (Fig. 3C). Enquanto as betacianinas resultam da condensação entre o ácido betalâmico com ciclo-3,4-dihidroxifenilalanina (ciclo-DOPA), as betaxantinas resultam da combinação entre o ácido betalâmico e cadeias de aminoácidos ou aminas. Estas conjugações resultam em picos máximos de absorção nos 540 nm para as betacianinas e 480 nm para as betaxantinas (Jackman e Smith, 1996; Strack *et al.*, 2003).

Foram já identificadas cerca de 75 estruturas de betalaínas a partir de 17 famílias diferentes (Khan e Giridhar, 2015). O número de betalaínas reportadas está a aumentar constantemente com a introdução de novas tecnologias analíticas e com o desenvolvimento de melhores metodologias em cromatografia líquida e espectrofotometria de massa (Sekiguchi *et al.*, 2013).

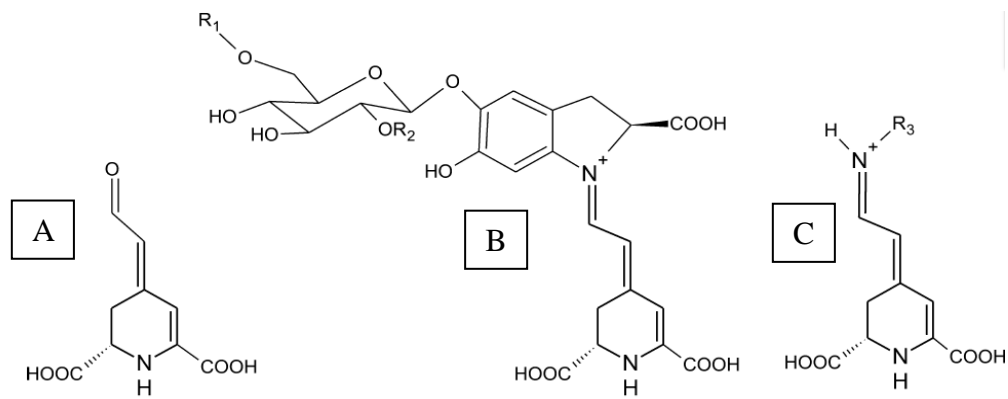


Figura 3 – Estruturas gerais do ácido betalâmico (A), betacianinas (B) e betaxantinas (C) (Strack *et al.*, 2003)

1.4.3. Biossíntese das betaínas

As betalaínas são um tipo de metabolito secundário que deriva do aminoácido L-tirosina (Fischer e Dreiding, 1972). A via envolvida na biossíntese das betalaínas começa com a hidroxilação deste aminoácido para L-DOPA por um ou mais citocromos P450 (Sunnadeniya *et al.*, 2016; Polturak e Aharoni, 2017). Posteriormente, a L-DOPA é convertida em ácido betalâmico a partir de uma reação, de duas etapas, iniciada por DOPA 4,5-dioxigenase (DOD) (Christinet *et al.*, 2004) ou, como alternativa, é convertida em ciclo-DOPA pelo citocromo P450 (Hatlestad *et al.*, 2012). De seguida, o ácido betalâmico pode condensar espontaneamente com a ciclo-DOPA, formando a betanidinas, ou pode ligar-se a aminoácido ou aminas, dando origem às betaxantinas (Strack *et al.*, 2003). As betanidinas são ainda glicosiladas por uma betanidina glicosiltransferase, formando betacianinas básicas, a betanina e a gomphrenina (Vogt *et al.*, 1999).

Foi encontrada uma ligeira alteração nesta via, em que a ciclo-DOPA é primeiro glicosilada por uma ciclo-DOPA-5-O-glicosiltransferase originando a cDOPA-5-O-glicosídeo, que se liga espontaneamente com o ácido betalâmico, formando diretamente uma betanina (Sasaki *et al.*, 2004).

A betanina e gonfrenina podem posteriormente sofrer reações de glicosilação e acilação adicionais catalizadas por enzimas, formando uma ampla gama de betacianinas modificadas (Strack *et al.*, 2003).

Na figura 4 encontra-se esquematizado este processo de biossíntese das betalaínas.

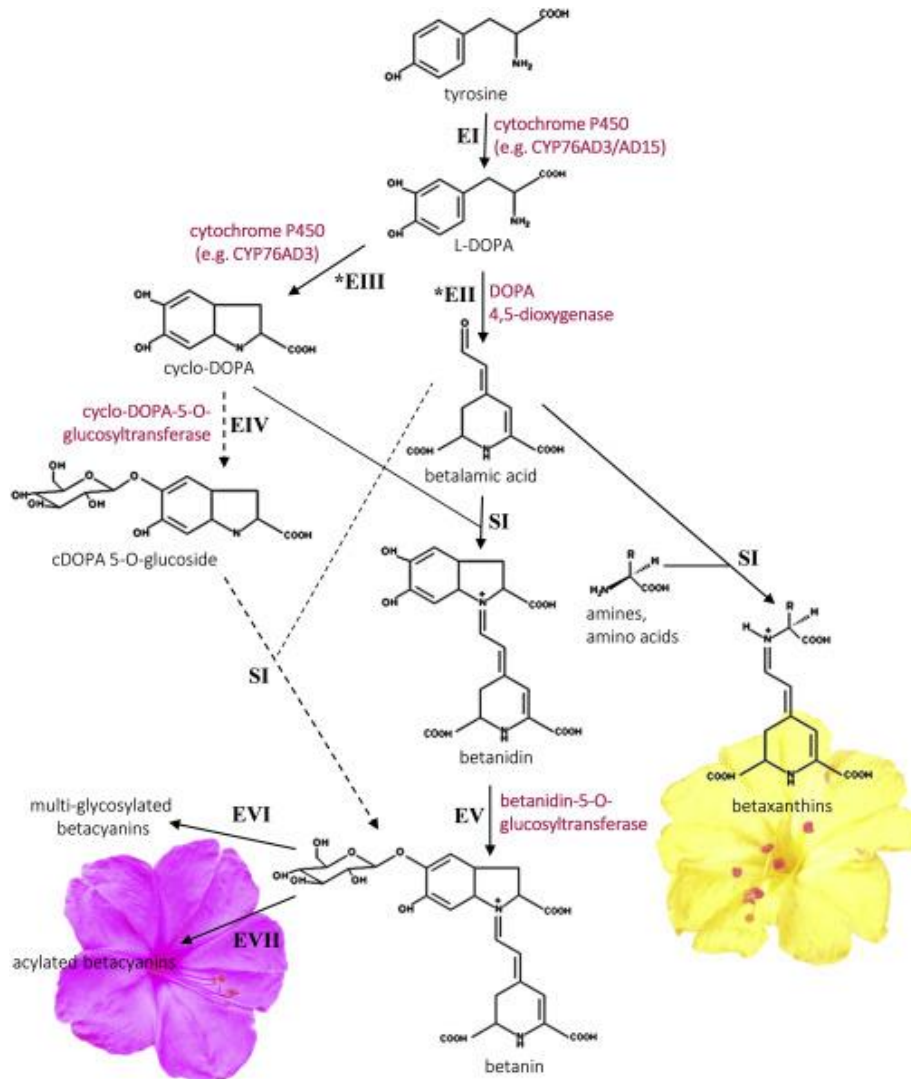


Figura 4 - Processo de biosíntese de betalínas. Reações enzimáticas: EI, hidroxilação da tirosina; EII, DOPA-4,5-dioxigenase; EIII, oxidação da L-DOPA; EIV, glicosilação da ciclo-DOPA; EV, glicosilação da betanidina; EVI, glicosilação adicional das betacianinas; EVII, acilação das betacianinas. Reações espontâneas previstas: SI, condensação (formação de aldimina). As reações enzimáticas EII e EIII são seguidas de uma reação de ciclização espontânea, estando por isso marcada com asterisco. EV pode ser alternativamente catalisado por uma betanidina 6-O-glicosiltransferase, levando à formação de um gomphrenina em vez de betanina. As linhas a tracejado designam a via alternativa, em que a ciclo-DOPA é primeiro glicosilada e depois condensa com o ácido betalâmico, formando a betanina (Polturak et al., 2018).

1.4.4. Fontes de betalaínas

A principal fonte de betalaínas comercialmente explorada é a beterraba vermelha (*Beta vulgaris*) (Strack *et al.*, 2003), que contém os dois principais pigmentos desta família, nomeadamente a betanina (betacianina) e a vulgaxantina (betaxantina). A beterraba vermelha é cultivada principalmente na América do Norte, América Central e na Grã-Bretanha. Também algumas espécies de *Amaranthus*, nomeadamente *Amaranthus cruentus*, *Amaranthus coudatus* e *Amaranthus hybridus* contêm um elevado teor em betacianinas (Cai *et al.*, 1998). Plantas da família *Cactaceae*, principalmente dos géneros *Opuntia* e *Stenocereus* (pitaias), têm sido exploradas com o objetivo de aumentar a gama de cores de betalaínas de modo a viabilizar a sua aplicação comercial (Stintzing e Carle, 2007).

Gasztonyi *et al.* (2001) analisaram cinco variedades de beterrabas vermelhas relativamente à sua composição em pigmentos. Em todas estas 5 variedades, o maior pigmento vermelho-violeta detetados foram a betanina, isobetanina, betanidina e isobetanidina, e os maiores componentes na gama dos amarelos foram a vulgaxantina I e a vulgaxantina II. Contudo, a variabilidade de cor na beterraba vermelha é muito restrita, e para além disso, possui na sua composição geosmina e algumas pirazinas que lhe conferem o sabor característico a terra. Este é um fator indesejável, por exemplo, para a aplicação de extratos de beterraba a produtos lácteos (Stintzing e Carle, 2004). Neste sentido, as plantas da família *Cactaceae*, têm-se mostrado bastante promissoras dada a ausência de sabor nos seus extratos e o amplo espectro de cores que abrange (Moßhammer *et al.*, 2005). Curiosamente, foram também identificadas betalaínas em fungos basidiomicetes dos géneros *Amanita*, *Hygrocybe* e *Hygrosporus* (Bowden *et al.*, 1965; Musso, 1979).

Apesar de ter sido já mencionada a presença de betalaínas em *Anredera cordifolia* (Kusumanti & Sugiharto, 2017) a base desta informação referia-se à planta *Basella alba*, que, como já referida, é ainda bastante confundida com a *Anredera cordifolia* devido às suas semelhanças morfológicas.

1.4.5. Propriedades das betalaínas

A atividade antioxidante das betalaínas foi já demonstrada em vários modelos químicos e biológicos (Borkowski *et al.*, 2005). Betalaínas extraídas da beterraba vermelha mostraram uma capacidade de eliminação de radicais livres 1,5 - 2,0 vezes superior a algumas antocianinas, como a cianidina (Borkowski *et al.*, 2005). A ingestão humana de uma dose de sumo de beterraba resulta num aumento de antioxidantes no sistema urinário (Netzel *et al.*, 2005), e a administração oral de betacianinas em ratos levou a um aumento significativo de enzimas antioxidantes a superóxido dismutase e a glutathione peroxidase (Wroblewska *et al.*, 2011). As betalaínas podem gerar um equilíbrio intrínseco entre as espécies oxidantes e o sistema de defesa antioxidante e podem criar um ambiente celular favorável para combater o stress oxidativo (Esatbeyoglu *et al.*, 2014). Estes pigmentos participam também ativamente na eliminação de radicais livres e, conseqüentemente, na prevenção do aparecimento de doenças oncológicas e cardiovasculares. A suplementação de células Huh7 com betalaínas resultou num aumento significativo de glutathione celular (GSH), um importante antioxidante citosólico que induz a interrupção do ciclo celular e a apoptose da célula, sugerindo potenciais propriedades quimiopreventivas (Esatbeyoglu *et al.*, 2014).

A administração de betalaínas a ratos diabéticos, reduziu claramente os níveis séricos de colesterol, triglicerídeos e LDL, e aumentou o nível de HDL (Clemente e Desai, 2011), realçando as suas propriedades anti-lipidémicas.

Para além destas propriedades, as betalaínas também possuem atividade antimicrobiana, por exemplo contra *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (Canadanovic-Brunet *et al.*, 2011; Velićanski *et al.*, 2011). Esta atividade antimicrobiana das betalaínas pode ser devida a efeitos adversos na estrutura, função e na permeabilidade da membrana celular dos microrganismos, levando eventualmente à sua morte celular (Canadanovic-Brunet *et al.*, 2011).

1.5. Objetivos

Anredera cordifolia é uma planta reconhecida especialmente pelas suas propriedades medicinais, tendo sido alvo de vários estudos nesta área. Porém, relativamente à clonagem *in vitro*, são relativamente poucos os trabalhos divulgados. Desta forma, um dos principais objetivos deste projeto, foi testar o efeito de diferentes combinações hormonais na micropropagação de *Anredera cordifolia*.

Como já referido, durante a propagação desta planta, verificou-se que em determinadas situações, nomeadamente na presença de calos, libertava-se um pigmento avermelhado/rosado para o meio de cultura. Desta forma, um novo objetivo foi adicionado a este projeto. Este objetivo refere-se à produção e identificação do pigmento, que inclui diferentes etapas. A primeira etapa diz respeito à indução do crescimento de calos, em meio MS sólido com diferentes concentrações de BA, NAA e 2,4-D e utilizando diferentes explantes (folhas e entrenós). Após a obtenção de calos, selecionaram-se as linhas celulares com maior produção de pigmento, passando-as para meios líquidos. Neste parâmetro foram avaliados quatro fatores: o tipo de explante, a razão superfície-concentração, a combinação de diferentes reguladores de crescimento (NAA, 2,4-D e BA) e a influência da luz. Por último, tendo conseguido obter o pigmento em boas concentrações, foram realizadas análises de HPLC com vista à sua caracterização.



2. Materiais e Métodos

2.1. Material Vegetal

O material vegetal utilizado neste trabalho, encontrava-se já estabelecido *in vitro* no laboratório de Biotecnologia Vegetal, do Centro de Ecologia Funcional do Departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia pertencente à Universidade de Coimbra.

O material encontrava-se estabelecido em meio MS com 3% de sacarose e mantido numa câmara de crescimento com um fotoperíodo de 16h luz/8h escuro, a uma temperatura de 25 °C.

2.2. Clonagem *in vitro*

Nesta etapa foram testados seis meios constituídos pelos nutrientes do meio MS (Murashige & Skoog, 1962) com 3% de sacarose e com 7 g/L de agar Duchefa-Biochemie. Estes meios variavam entre si pelo tipo e concentrações reguladores de crescimento utilizados, nomeadamente, BA e NAA, conforme se indica na tabela 1. O pH dos diferentes meios foi ajustado para 5,7 com soluções diluídas de NaOH ou HCl. O meio de cultura foi distribuído para tubos de ensaio, com cerca de 15 ml cada e por fim foi autoclavado a 121 °C durante 20 minutos. As culturas foram mantidas numa câmara de crescimento com um fotoperíodo de 16h luz/8h escuro, a uma temperatura de 25 °C.

Foram realizadas 3 repetições com 10 amostras por repetição, tendo o segmento nodal inicial cerca de 1 cm de comprimento. A determinação dos resultados foi realizada após 4 semanas de cultura, tendo sido avaliados os seguintes parâmetros: 1) comprimento dos rebentos caulinares, 2) maior tamanho registado, 3) número de nós, 4) número de amostras com raiz, 5) número de rebentos caulinares obtidos, 6) número de amostras com calo e o 7) o número de amostras com pigmento.

Tabela 1 – Meios de cultura e respetivas concentrações de reguladores de crescimento.

M1	Meio MS
M2	Meio MS + 0,05 mg/L BA
M3	Meio MS + 0,10 mg/L BA
M4	Meio MS + 0,20 mg/L BA
M5	Meio MS + 0,05 mg/L BA + 0,50 mg/L NAA
M6	Meio MS + 0,05 mg/L BA + 1,00 mg/L NAA

2.3. Indução e cultura de calos

2.3.1. Indução de calos

Para a indução de calos foram utilizados dois tipos de explantes: folhas e entrenós (com cerca de 1 cm). Nesta etapa foram avaliados quatro meios MS (3% sacarose e 7 g/L de agar) com diferentes reguladores de crescimento e concentrações (Tabela 2), tendo sido realizados 2 ensaios, cada um com 15 amostras para cada tipo de explante.

Tal como referido na secção anterior, o pH dos meios foi ajustado para 5,7 e, após a autoclavagem, estes foram distribuídos por tubos de ensaio, cada um com 15 ml de meio. As amostras foram mantidas numa câmara de crescimento com um fotoperíodo de 16h luz/8h escuro, a uma temperatura de 25 °C.

Passadas 6 semanas, os calos obtidos foram pesados e os meios de cultura quantificados de acordo com a presença de pigmento.

Tabela 2 – Meios de cultura com as respectivas concentrações de reguladores de crescimento.

C1	Meio MS + 1,0 mg/L NAA
C2	Meio MS + 1,00 mg/L NAA + 0,2 mg/L BA
C3	Meio MS + 1,0 mg/L 2,4-D
C4	Meio MS + 1,0 mg/L 2,4-D + 0,2 mg/L BA

2.3.1. Cultura de calos em meio líquido

Obtidos os calos e analisados os resultados com base nos meios de cultura utilizados, optou-se por restringir a cultura de calos aos meios C2 (Meio MS + 1,00 mg/L NAA + 0,2 mg/L BA) e C4 (Meio MS + 1,0 mg/L 2,4-D + 0,2 mg/L BA). Os meios foram preparados como indicado na secção 2.3.1. com exceção da adição de agar. Os meios foram colocados em balões de Erlenmeyer de duas dimensões diferentes: 20 ml e 50 ml. As culturas foram mantidas numa câmara de crescimento, sob agitação (100 rpm), com um fotoperíodo de 16h luz/8h escuro, a uma temperatura de 25 °C. Neste ensaio foram realizadas duas réplicas, cada uma com 15 explantes de cada segmento.

Na figura 5 encontra-se esquematizado o procedimento adotado.

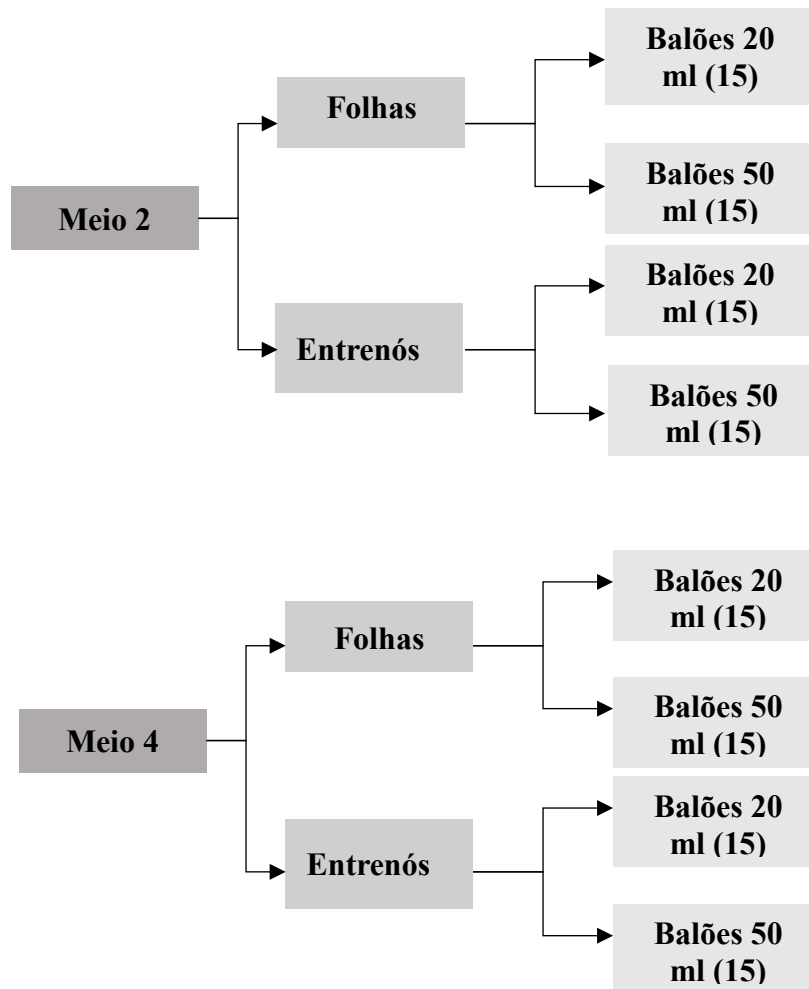


Figura 5 - Esquema representativo do desenho experimental utilizado na cultura de calos em meio líquido, sendo 15 o número de explantes utilizados.

Após 5 e 10 dias de cultura, foram retirados 2 ml do meio líquido de cada amostra e realizadas leituras de espectrometria de absorção utilizando comprimentos de onda de 400 nm, 500 nm e 600 nm no espectrofotômetro SECTRAmax PLUS 384, de forma a avaliar a produção de pigmento. Para além disso, ao fim de 10 dias de cultura, as massas de calos foram pesadas e comparadas com a sua massa inicial.

Os seis calos produtores de maior quantidade de pigmento foram repicados para meios com a mesma composição, em balões de 50 ml, com o intuito de verificar se a sua capacidade de produção de pigmento era mantida. Para isso, foram realizadas, de igual forma, leituras de absorvância do meio de cultura com os comprimentos de onda 400 nm, 500 nm e 600 nm, após 5 e 10 dias de cultura. Para além disso, os calos foram também pesados no fim dos 10 dias de cultura.

Por último, foram colocados seis calos, que aparentavam serem bons produtores de pigmento, em meios líquidos mantidos na ausência de luz. Os calos foram distribuídos por meios C2 (Meio MS + 1,00 mg/L NAA + 0,2 mg/L BA) e C4 (Meio MS + 1,0 mg/L 2,4-D + 0,2 mg/L BA) em balões de 50 ml. Após 5 e 10 dias de cultura, foram retirados 2 ml dos meios de cada amostra, posteriormente submetidos a leituras de absorvância a 400 nm, 500 nm e 600 nm.

2.4. Análise HPLC

Antes de proceder às análises por HPLC (cromatografia líquida de alta pressão), o pigmento foi extraído do meio de cultura com a adição de acetato de etilo e posteriormente decantado num balão de decantação. Após a extração do pigmento para o acetato de etilo, o solvente foi submetido ao rotavapor, a uma temperatura de 80 °C durante 1h.

Ao produto resultante, foram adicionados 300 µL de metanol. Este extrato foi microfiltrado (filtro de seringa com 0,2 µm) e analisado seguindo o método de cromatografia líquida de alta pressão descrito por Campos *et al* (1990) e Campos (1997), com uma mistura de água acidificada (ácido ortofosfórico; pH = 2,5) (A) e acetonitrilo (B) num gradiente linear começando com 100% de A, decrescendo para 91% até aos 12 minutos, para 87% nos 8 minutos seguintes e para 67% nos 10 minutos seguintes. Esta concentração de solvente manteve-se durante 2 minutos, descendo progressivamente para 57% ao longo dos 10 minutos seguintes e permanecendo nesta concentração até final dos 60 minutos da análise. A eluição foi realizada a 0,8 ml /min a 24 °C. O sistema cromatográfico era composto por um injetor Gilson 234, por bombas Gilson 305 e por uma coluna Waters Spherisorb® C18 (4,6 x 0,250 cm, 5 µm). O detetor usado era composto por um diode array Gilson 170. Os dados espectrais de todos os picos capturados estão entre os 200 e 600 nm.

O cromatograma obtido foi analisado no software Unipro da Gilson.

2.5. Análise estatística

Para proceder ao tratamento estatístico dos dados obtidos, recorreu-se ao programa GraphPad, onde foi realizada a análise de variância (ANOVA). Os parâmetros avaliados onde ocorreram diferenças significativas ($p < 0,05$) foram sujeitos ao teste de comparação múltipla de médias de Tukey.



3. Resultados

3.1. Clonagem *in vitro*

Nesta fase do trabalho, o objetivo foi testar diferentes meios de cultura na multiplicação de *A. cordifolia*, tendo sido testados os reguladores de crescimento BA e NAA. Como descrito nos materiais e métodos, os parâmetros avaliados foram: 1) comprimento dos rebentos caulinares, 2) o maior tamanho registado, 3) o número de nós, 4) o número de amostras com raiz, 5) o número de rebentos obtidos, 6) a formação de calos e 7) o número de explantes em que ocorreu formação de pigmento.

3.1.1. Comprimento dos rebentos caulinares

Relativamente à média de crescimento, verificaram-se algumas diferenças, entre os meios M5 e M6, e os meios M5 e M4 (Fig.6).

O meio M5 (Meio MS + 0,05 mg/L BA + 0,50 mg/L NAA) foi aquele que apresentou um maior valor, com cerca de 3,14 cm. O meio m6 (Meio MS + 0,05 mg/L BA + 1,00 mg/L NAA), por sua vez, foi o que apresentou uma média de crescimento menor, com 2,04 cm. Para além do crescimento, analisou-se também o maior tamanho registado. O rebento caulinar com maior comprimento foi obtido no meio M3, com 13,50 cm.

Apesar do meio M1 (Meio MS) apresentar valores menores, as suas folhas mostraram-se mais expandidas (Fig. 7), sendo também importante referir, que o ensaio 3, em geral, apresentou rebentos caulinares de maiores dimensões comparativamente aos obtidos nos ensaios anteriores.

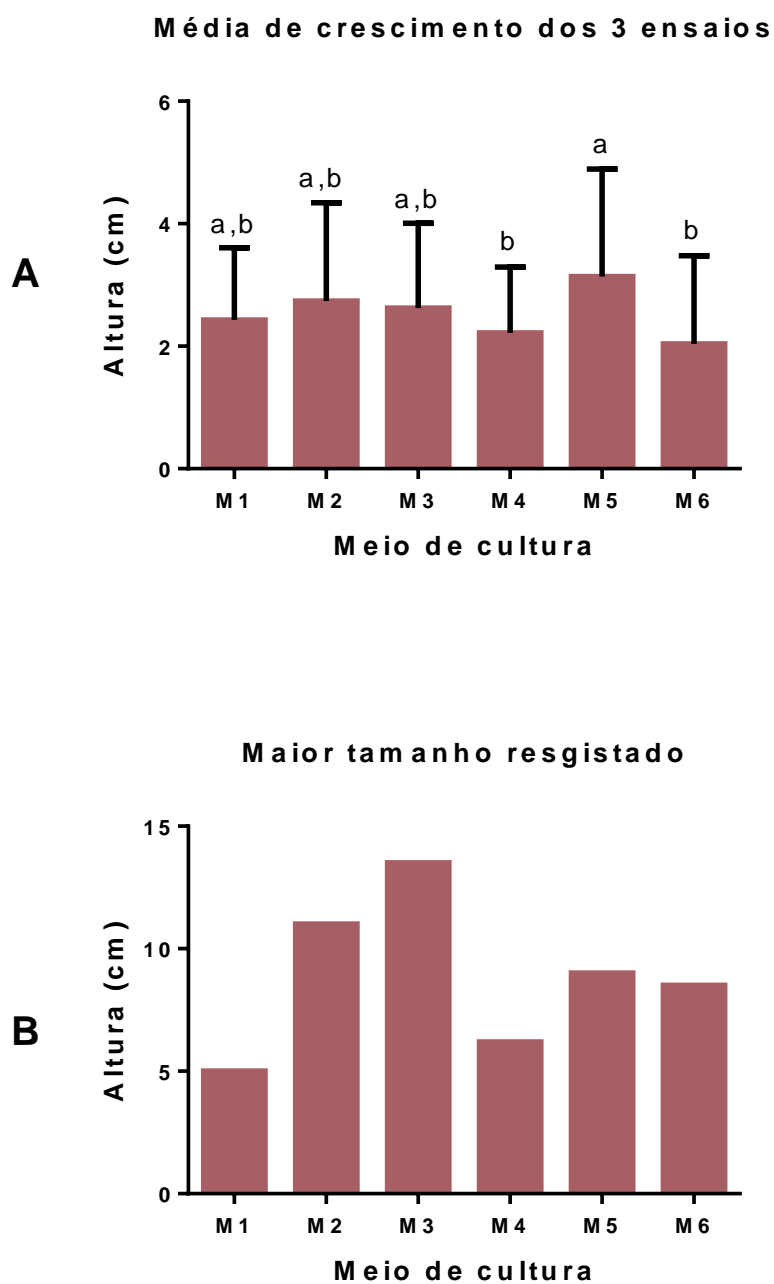


Figura 6 - Efeito dos reguladores de crescimento e suas concentrações no alongamento dos rebentos caulinares. A) Média de crescimento de cada meio dos três ensaios e respetivo desvio padrão entre as réplicas. Os valores assinalados com a mesma letra não apresentam diferenças significativas ($p > 0,05$) segundo o teste de Tukey. B) Maior tamanho registado em cada meio de cultura. Meio 0, meio MS; Meio 1, meio MS + 0,05 mg/L BA; Meio 2, meio MS + 0,1 mg/L BA; Meio 3, meio MS + 0,2 mg/L BA; Meio 4, meio MS + 0,05 mg/L BA + 0,5 mg/L NAA; Meio 5, meio MS + 0,05 mg/L BA + 1,0 mg/L NAA.

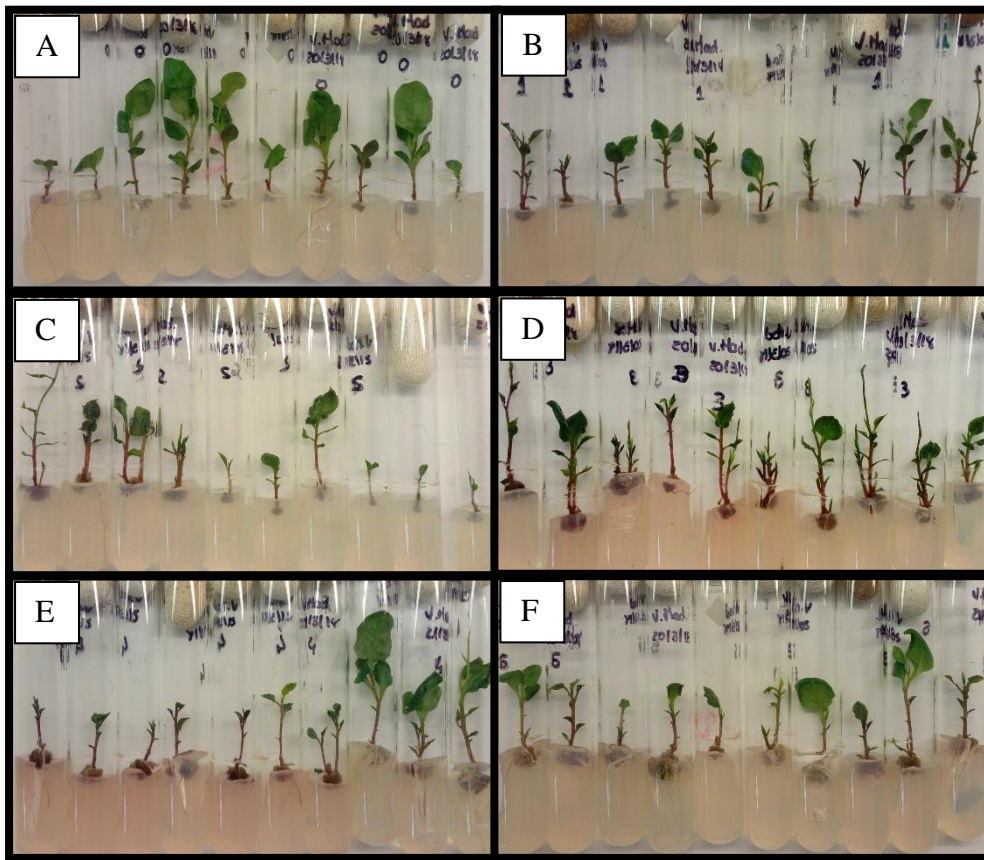


Figura 7 - Aspetto dos rebentos caulinares obtidos no ensaio 2. A) Amostras do meio M1; B) Amostras do meio M2; C) Amostras do meio M3; D) Amostras do meio M4; E) Amostras do meio M5; F) Amostras do meio M6.

3.1.2. Nós

Quanto ao número de nós (Fig. 8), o meio em que se observaram os melhores resultados foi o meio M2 (Meio MS + 0,05 mg/L BA) com um valor de 3,72 nós por explante inoculado. O maior número de entrenós registado foi de 10 nos meios M3 (Meio MS + 0,10 mg/L BA) e M4 (Meio MS + 0,20 mg/L BA).

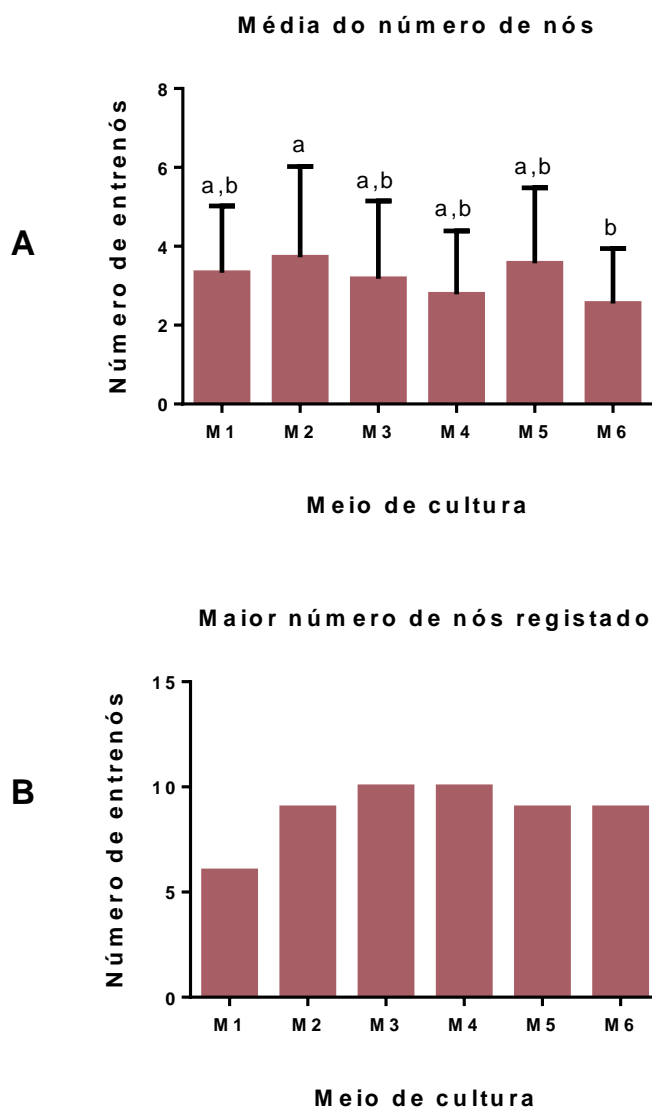


Figura 8 - Efeito dos reguladores de crescimento e suas concentrações no número de entrenós. A) Média do número de nós de cada meio e respetivo desvio padrão. Os valores assinalados com a mesma letra não apresentam diferenças significativas ($p > 0,05$) segundo o teste de Tukey. B) Maior número de nós registado em cada meio. M1, meio MS; M2, meio MS + 0,05 mg/L BA; M3, meio MS + 0,1 mg/L BA; M4, meio MS + 0,2 mg/L BA; M5, meio MS + 0,05 mg/L BA + 0,5 mg/L NAA; M6, meio MS + 0,05 mg/L BA + 1,0 mg/L NAA.

3.1.3. Número de rebentos enraizados

Neste parâmetro, pode-se verificar que o meio M5 (Meio MS + 0,05 mg/L BA + 0,50 mg/L NAA) é aquele que possui um maior número de amostras com raiz, obtendo-se 26 amostras com raiz em 30 amostras totais. Nos resultados apresentados na figura 9, observa-se um notável desenvolvimento de raízes no meio M1 (meio MS). Também se pode verificar que com a adição de BA, o número de amostras com raiz tende a diminuir, contrariamente ao que acontece com a adição de NAA, em que este valor aumenta.

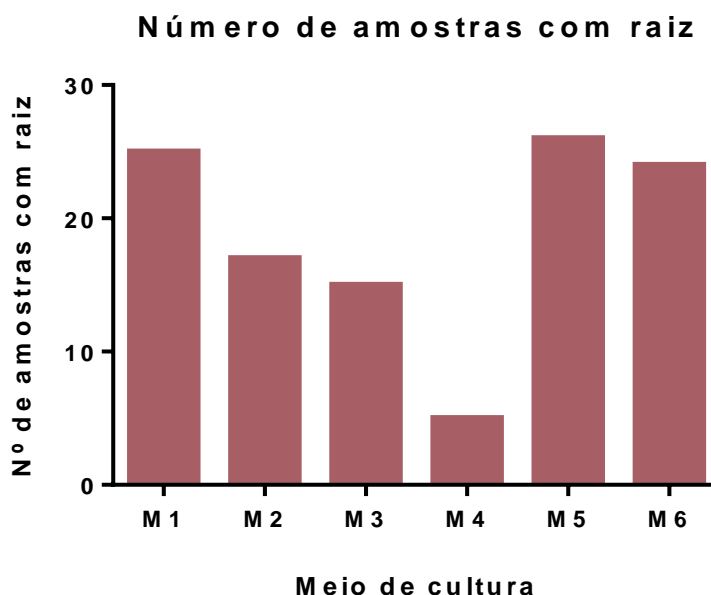


Figura 9 - Efeito dos reguladores de crescimento e suas concentrações no número de explantes enraizados em cada meio de cultura: M1, meio MS; M2, meio MS + 0,05 mg/L BA; M3, meio MS + 0,1 mg/L BA; M4, meio MS + 0,2 mg/L BA; M5, meio MS + 0,05 mg/L BA + 0,5 mg/L NAA; M6, meio MS + 0,05 mg/L BA + 1,0 mg/L NAA.

3.1.4. Número de rebentos caulinares

Neste parâmetro, foi possível verificar algumas diferenças entre os meios em estudo (Fig. 9). O meio M4 (meio MS + 0,2 mg/L BA) foi o que apresentou um valor superior, com uma média de 24,33 rebentos obtidos por cada ensaio. Já o meio M1 (meio MS), apresenta apenas uma média de 10 rebentos obtidos por ensaio.

Podemos verificar, que com o aumento da concentração de BA no meio de cultura, há também um aumento do número de rebentos obtidos.

Média do número de rebentos obtidos por ensaio

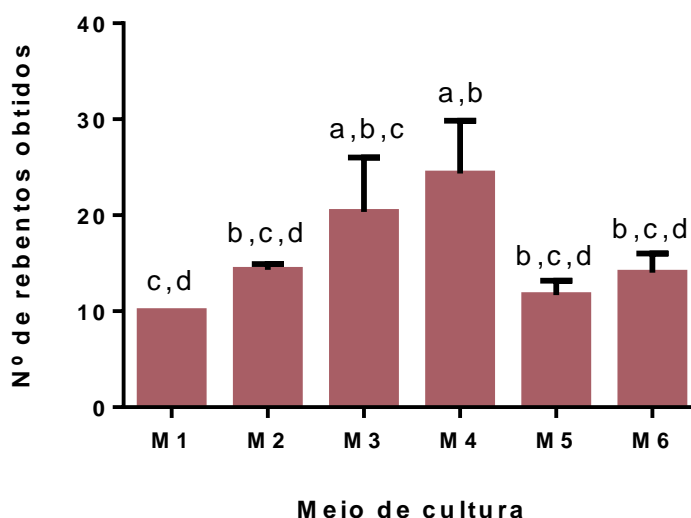


Figura 10 - Média do número de rebentos caulinares obtidos em cada meio e respetivo desvio padrão. Os valores assinalados com a mesma letra não apresentam diferenças significativas ($p > 0,05$) segundo o teste de Tukey. Meio M1, meio MS; Meio M2, meio MS + 0,05 mg/L BA; Meio M3, meio MS + 0,1 mg/L BA; Meio M4, meio MS + 0,2 mg/L BA; Meio M5, meio MS + 0,05 mg/L BA + 0,5 mg/L NAA; Meio M6, meio MS + 0,05 mg/L BA + 1,0 mg/L NAA.

3.1.5. Formação de calo e produção de pigmento

Relativamente à formação de calo, verificou-se que ocorria proliferação celular em todos os meios testados, normalmente na zona basal do explante inicial. Mesmo no meio controlo, sem a presença de reguladores de crescimento, ocorreu a formação de calo, embora por norma o crescimento destes calos fosse reduzido (Fig. 11A). No meio M5 (meio MS + 0,05 mg/L BA + 0,50 mg/L NAA) e M6 (meio MS + 0,05 mg/L BA + 1,00 mg/L NAA), os calos apresentavam dimensões maiores (Fig. 11B), sendo também os meios onde se observou uma maior quantidade de amostras com pigmento (Fig.12).



Figura 111 – Aspeto dos calos obtidos no meio M1 (A) e no meio M6 (B). O círculo pretende indicar o calo obtido em cada uma das amostras.

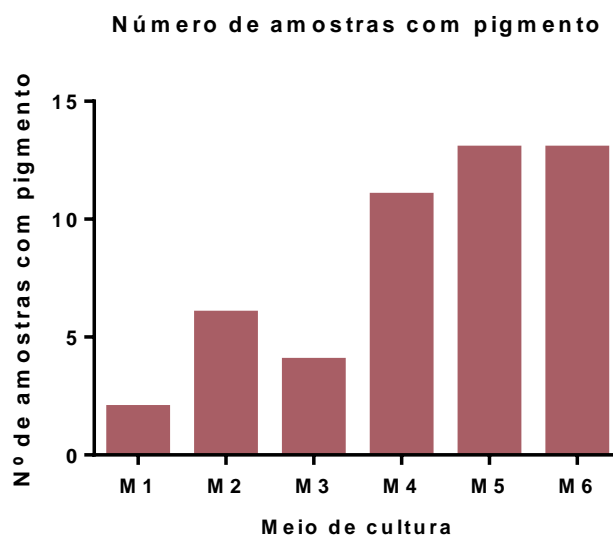


Figura 122 – Número de amostras obtidas com pigmento. Meio M1, meio MS; Meio M2, meio MS + 0,05 mg/L BA; Meio M3, meio MS + 0,1 mg/L BA; Meio M4, meio MS + 0,2 mg/L BA; Meio M5, meio MS + 0,05 mg/L BA + 0,5 mg/L NAA; Meio M6, meio MS + 0,05 mg/L BA + 1,0 mg/L NAA

3.2. Indução e multiplicação de calos

3.2.1. Indução de calos

Nesta etapa foram testados quatro meios MS com diferentes reguladores de crescimento com o intuito de estimar o melhor meio para a obtenção de calo e de pigmento, bem como, o melhor explante a usar. Para isso, recorreu-se à medição do peso dos calos e à observação de amostras com pigmento libertado para o meio de cultura.

Como se pode verificar na figura 13, o meio onde ocorreu um maior crescimento dos calos foi no meio C4 que tinha na sua composição 1,0 mg/L 2,4-D + 0,2 mg/L BA em meio MS. Relativamente ao tipo de explante, existe uma diferença considerável no meio C3 (MS + 1,0 mg/L 2,4-D), porém, o mesmo não acontece nos restantes casos, havendo um equilíbrio entre os valores de cada explante.

Em relação à pigmentação do meio de cultura, tanto o meio C1 como o meio C3 não apresentaram qualquer coloração, sendo o meio C2 aquele que apresentou melhores resultados neste sentido. Apesar dos calos obtidos no meio C4 exibirem maiores dimensões e demonstrarem uma boa capacidade de regeneração de rebentos (Fig. 14A),

a quantidade de pigmento libertado para o meio era inferior ao meio C2. É também importante referir, que, quanto à libertação de pigmento, os explantes provenientes dos entrenós mostraram melhores resultados do que os explantes das folhas e que os calos que correspondiam às amostras pigmentadas, apresentavam uma tonalidade mais escura (Fig. 14B). Para além disso, é também de referir que os calos formados a partir das folhas eram menos friáveis do que os calos provenientes dos entrenós.

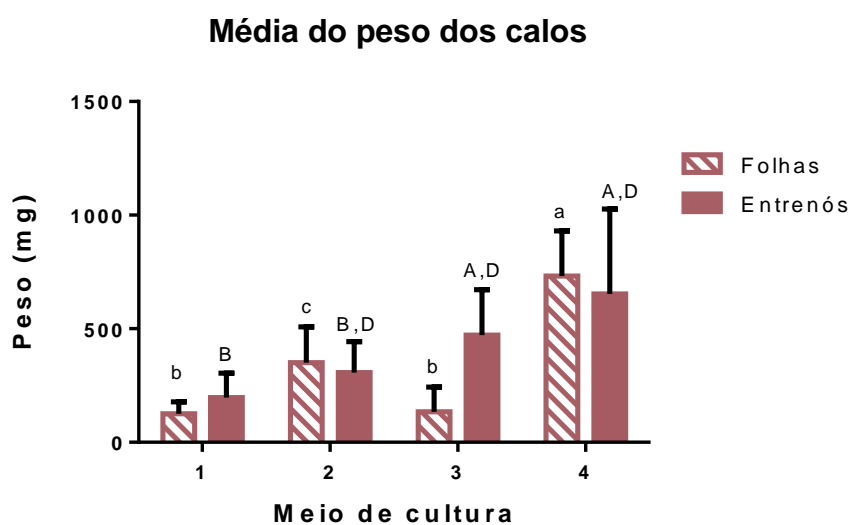


Figura 13 – Média do peso dos calos obtidos para cada explante em cada meio. Os valores assinalados com a mesma letra não apresentam diferenças significativas ($p>0,05$) segundo o teste de Tukey. Meio 1, meio MS + 1,0 mg/L NAA; Meio 2, meio MS + 1,0 mg/L NAA + 0,2 mg/L BA; Meio 3, meio MS + 1,0 mg/L 2,4-D; Meio 4, meio MS + 1,0 mg/L 2,4-D + 0,2 mg/L BA.

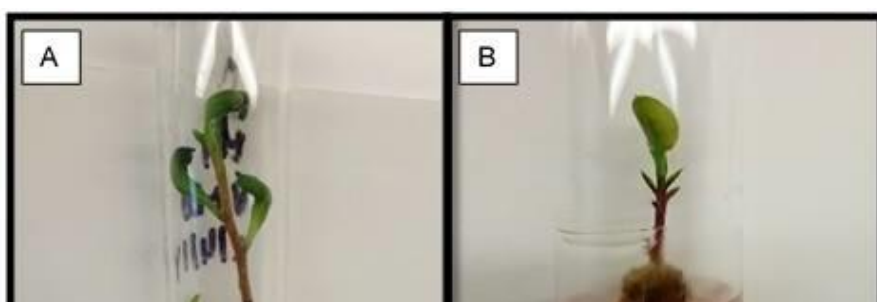


Figura 14 – Aspeto de amostra obtidas no meio C4 (A) e no meio C2 (B).

3.2.2. Cultura de calos em meio líquido

Nesta etapa, o objetivo era essencialmente a produção de pigmento. Desta forma, os calos obtidos em meio sólido, foram transferidos para meios líquidos. Os meios líquidos tinham a mesma composição dos meios C2 e C4 utilizados no ponto anterior, ou seja, o meio C2 era formado pelo meio MS com 0,2 mg/L BA e 1,0 mg/L de NAA, enquanto que o meio C4 continha 0,2 mg/L BA e 1,0 mg/L de 2,4-D. Neste parâmetro, foi avaliada a resposta em função do explante inicial (entrenós ou folhas), do tipo de meios utilizados, o tempo de cultura e a ausência de luz.

Relativamente ao desenvolvimento dos calos, na Fig. 15 encontram-se registados os valores referentes ao peso de cada amostra, no início e no fim de 10 dias de cultura. Nos gráficos da figura 16, para além do meio de cultura, encontra-se também descrito o tipo de explante de cada amostra e o tamanho dos balões usados (50 ou 20 ml).

A partir dos valores registados, pode-se verificar que a média do peso final dos calos de entrenós é inferior ao inicial, ao contrário do que aconteceu com os explantes de folhas. A média final do peso das folhas é maior do que o inicial, revelando um crescimento celular, principalmente no meio C4.

Em relação aos balões usados, pode-se verificar que em geral houve melhores resultados de crescimento nos balões de 20 ml.

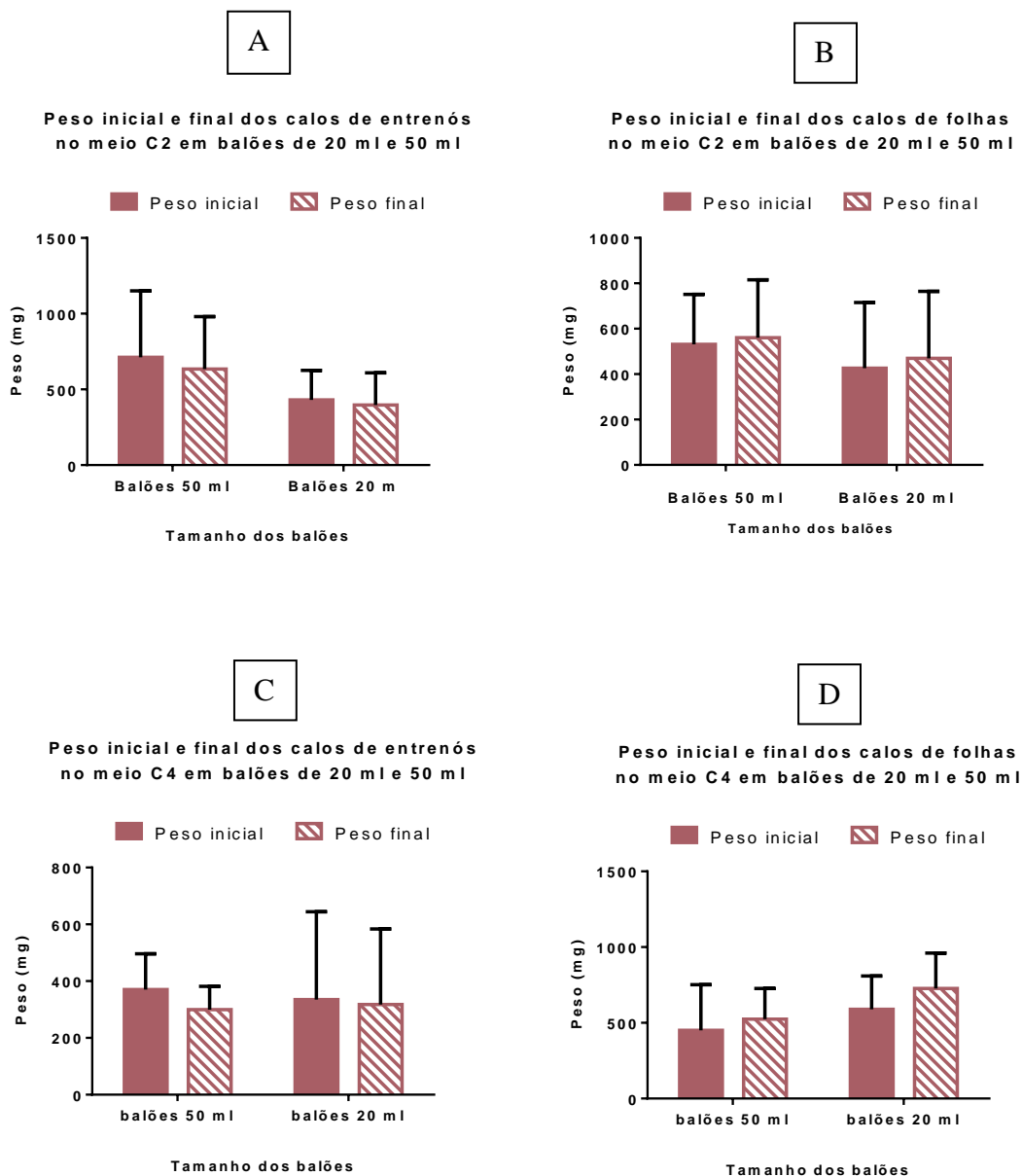


Figura 15 – Influência dos meios de cultura, explantes e tamanho dos balões no crescimento de calo. A) Média do peso inicial e final de calos de entrenós, mantidos no meio C2 em balões de 50 ml e 20 ml. B) Média do peso inicial e final de calos de folhas, mantidos no meio C2 em balões de 50 ml e 20 ml. C) Média do peso inicial e final de calos de entrenós, mantidos no meio C4 em balões de 50 ml e 20 ml. D) Média do peso inicial e final de calos de folhas, mantidos no meio C2 em balões de 50 ml e 20 ml. Meio C2: Meio MS + 1,0 mg/L NAA + 0,2 mg/L BA; Meio C4: Meio MS + 1,0 mg/L 2,4-D + 0,2 mg/L BA.

Quanto às leituras de absorvância, verificou-se que existiu uma maior absorção nos 400 nm. Após os 10 dias de cultura, algumas amostras obtiveram uma leitura de absorvância inferior às realizadas após os 5 dias de cultura. Apesar de nos restantes casos, se detetar um aumento da absorvância após os 10 dias, este aumento foi, em geral, pouco significativo.

Em meio líquido, os calos das folhas apresentaram uma maior capacidade de produção do pigmento em comparação com os calos dos entrenós, apesar da amostra mais pigmentada ter como origem este segundo explante (Figs. 16 e 17). À semelhança do que acontecia em meio sólido, os calos apresentam uma tonalidade escura.

Apesar de se ter registado valores mais favoráveis em balões de 20 ml e com o meio C4 para o crescimento de calo, para a produção de pigmento os balões de 50 ml e com o meio C2 mostraram-se melhores.

Adicionalmente, foram selecionados os 5 calos com maior produção de pigmento e colocados num novo meio. As leituras de absorvância lidas nestas amostras, foram bastante semelhantes às primeiras leituras.

Foi possível registar diferentes tonalidades do meio de cultura, variando entre o vermelho vivo (Fig. 16A) e os alaranjados (Fig. 16B).

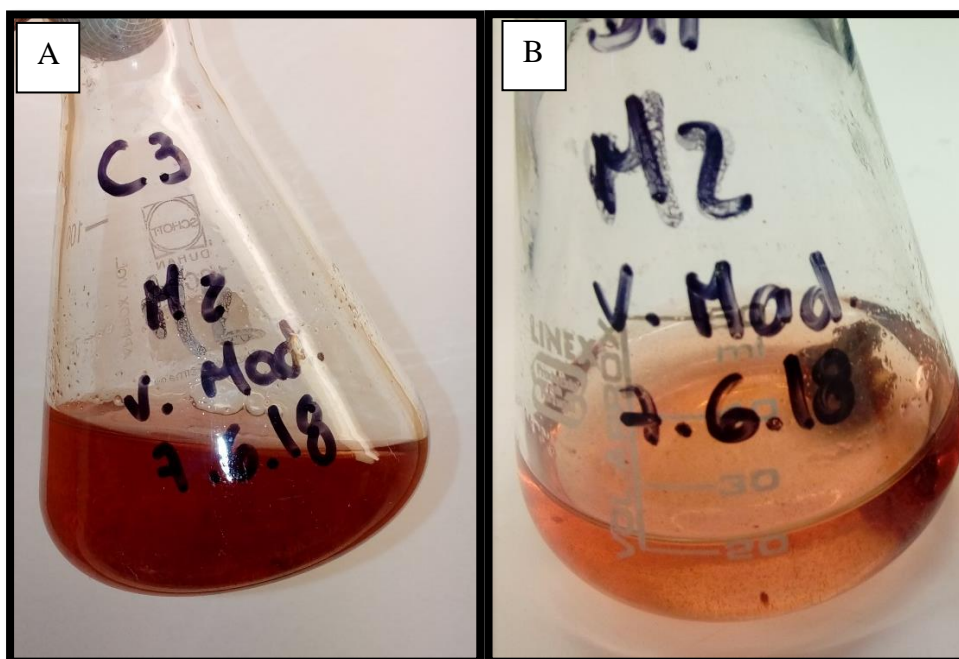


Figura 16 – Diferentes tonalidades de meios de cultura de calos registados após 10 dias em cultura. A) Amostra obtida com maior quantidade de pigmento, com calos de entrenós; B) Amostra com uma tonalidade mais alaranjada obtida com calos de folhas.

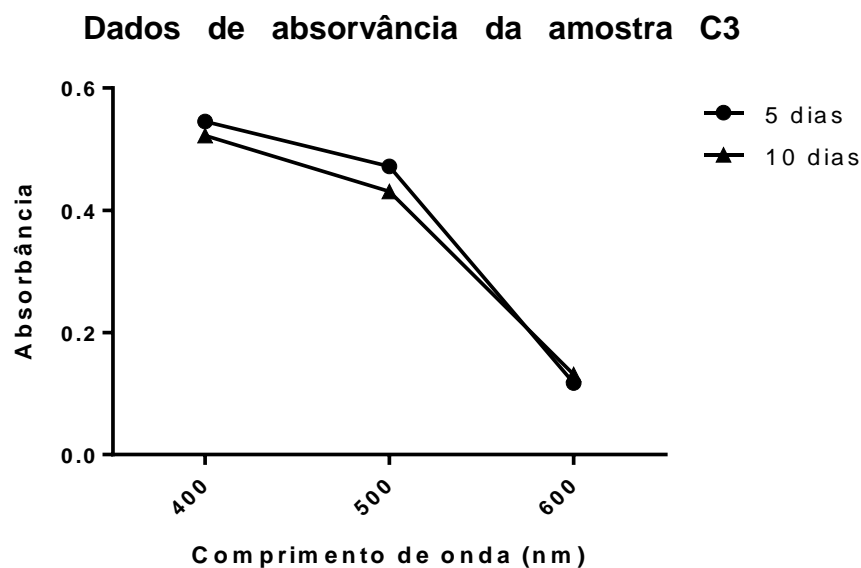


Figura 17 – Gráfico com as leituras de absorvância da amostra C3 (amostra mais pigmentada) após os 5 e 10 dias de cultura.

Foram também colocados calos de folhas no escuro em meio 2 e 4. Após os 5 dias de cultura, das 6 amostras realizadas, nenhuma apresentava pigmentação, estando os valores de absorvância bastante baixos nos 3 comprimentos de onda. Porém, no final dos 10 dias, conseguiram-se meios de cultura com valores de absorvância superiores, nomeadamente nos 400 e 500 nm, bastante próximos aos valores obtidos na presença de luz.

Foi também possível verificar diferentes tonalidades do meio de cultura, incluindo na gama dos amarelos (Fig. 18).



Figura 18 – Resultados obtidos da cultura de calos na ausência de luz.

3.3. Análise do pigmento por HPLC

Relativamente à análise do pigmento produzido por HPLC, não foi possível retirar grandes conclusões no que diz respeito ao pigmento responsável pela coloração dos meios, uma vez que a quantidade de pigmento analisada não era suficiente. Verificou-se que o pré-filtro do HPLC mostrava quantidades consideráveis de pigmento aí retido.

Na figura abaixo encontra-se o cromatograma obtido nesta análise. Ao comparar este cromatograma com a informação existente no software, calcula-se que os dois primeiros picos obtidos correspondem, muito provavelmente, a ácido fenólico e a ácido gálico, respetivamente. Relativamente aos picos máximos registados, não foi conseguida nenhuma correspondência. Esta análise tornou-se difícil de efetuar, uma vez que os picos se encontram pouco resolvidos.

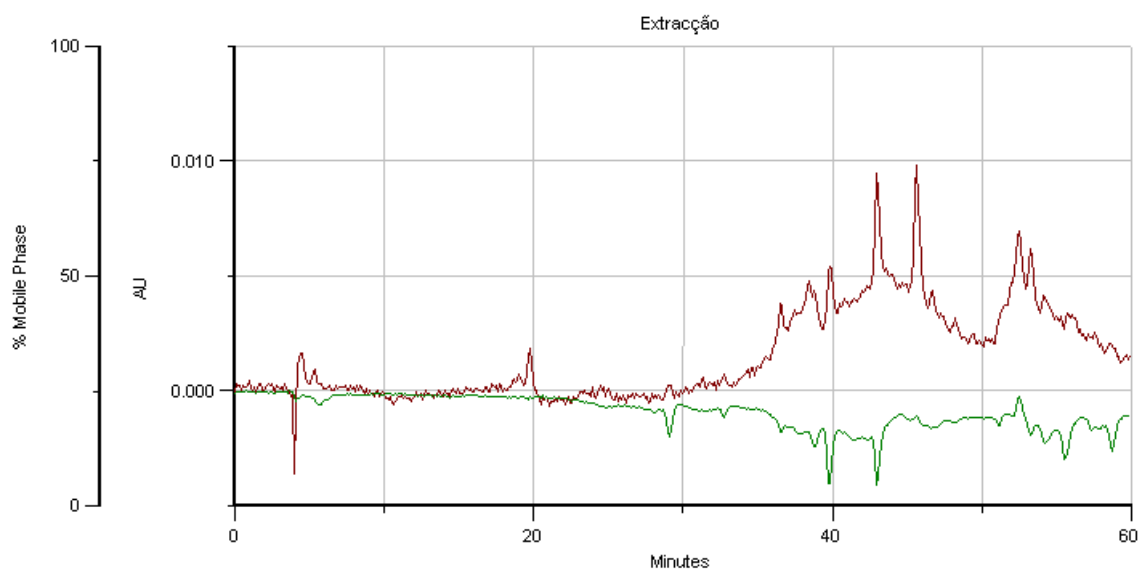


Figura 19 – Cromatograma obtido com pigmento extraído do meio de cultura.



4. Discussão

Apesar de pouco conhecida em Portugal, a vinha-da-madeira é uma potencial planta medicinal que pode contribuir para o tratamento de vários tipos de doenças (Singh *et al.*, 2014). Nos últimos anos, as folhas de *A. cordifolia* têm sido amplamente utilizadas na medicina tradicional (Muizuddin *et al.*, 2015).

As técnicas da cultura *in vitro* podem ser consideradas um método alternativo para a produção de compostos secundários das plantas. Porém, antes de se produzirem estes compostos em larga escala, é necessário estudar primeiro este procedimento em pequena escala, para definir as melhores técnicas de propagação e de produção (Kuswandi, 2014). Neste contexto, deve realçar-se que os estudos no âmbito de cultura *in vitro* da vinha-da-madeira são escassos (Schaller *et al.*, 2016).

No decorrer deste trabalho foi estudado o efeito de diferentes combinações de citocininas e auxinas para a propagação *in vitro* de *A. cordifolia*, nomeadamente de BA e NAA. Para além disso, foram também estudados os efeitos dos reguladores de crescimento 2,4-D, NAA e BA em meios de cultura para a obtenção de calos, assim como os explantes usados (entrenós e folhas). Estes calos foram posteriormente colocados em meio líquido com o principal objetivo de produzir pigmento, sendo analisados diversos fatores, incluindo os reguladores de crescimento adicionados ao meio (2,4-D, NAA e BA), o tipo de explante, o tempo de cultura, o tamanho dos balões utilizados (20 ml e 50 ml) e a ausência de luz. Por fim, obtido o pigmento no meio, procedeu-se a uma análise HPLC, na tentativa de esclarecer o tipo de composto produzido.

4.1. Clonagem *in vitro*

Relativamente ao crescimento global dos rebentos, não ocorreram diferenças significativas entre os meios de cultura em estudo. Porém, pode-se confirmar que a presença de citocininas e auxinas favorecem o seu crescimento, uma vez que o meio MS sem adição de reguladores de crescimento, obteve resultados inferiores neste parâmetro. Verificou-se também que, apesar do meio M5 (com 0,05 mg/L BA e 0,5 mg/L de NAA) apresentar uma média de crescimento maior, o meio 3 (com 0,2 mg/L de BA), foi o que alcançou um maior comprimento.

As citocininas são normalmente utilizadas para promover a divisão celular e, tendo em conta a sua participação na dominância apical, são também usadas com o intuito

de desenvolver meristemas axilares em micropropagação (Canhoto, 2010). Isto explica o valor referente ao maior tamanho registado obtido no meio M3, bem como o número de entrenós também superior neste meio. Contudo, esses valores mais altos não são refletidos na média de crescimento e do número de entrenós, pois em elevadas concentrações de BA é característico a ocorrência de gomos adventícios (Canhoto, 2010) que, neste caso, resultou na regeneração de várias plantas com tamanho reduzido. Isto justifica também o facto do meio M4 obter uma maior quantidade de rebentos caulinares regenerados, mas não com tamanhos tão elevados, devido à sua elevada concentração de BA. No entanto, as plantas adquiridas a partir destes gomos adventícios podem não ser benéficas em cultura *in vitro*, uma vez que estão sujeitas a variação somaclonal (Bonga e Aderkas, 2013).

As citocininas são também muitas vezes utilizadas em conjunto com auxinas para promover a divisão celular, resultando na formação de calos (Trigiano e Gray, 2016). Esta formação de calos foi particularmente notória nos meios M5 e M6, ambos com 0,05 mg/L de BA, e com 0,5 e 1,0 mg/L de NAA, respetivamente. Porém, o maior tamanho registado nestes meios não foi significativo, uma vez que a concentração de BA usada, em relação à concentração de NAA, foi reduzida. Se a concentração de citocininas fosse superior, resultava numa maior formação de meristemas (Trigiano e Gray, 2016).

Ainda em relação ao crescimento, foi referido que no ensaio 3, as plantas em geral apresentaram um crescimento maior. O que se verificou, foi que ao longo dos três ensaios, as plantas tinham tendência a crescer cada vez mais, obtendo-se valores superiores no último ensaio. Isto poderá estar relacionado com o facto das plantas utilizadas em estudos, não serem micropropagadas já há algum tempo, perdendo assim parte da sua capacidade de multiplicação.

Em relação à taxa de enraizamento, verificou-se uma diminuição desta quanto maior fosse a concentração de BA. Na verdade, elevadas concentrações de citocininas levam à inibição da formação de raízes. Já as auxinas têm um efeito oposto, o seu aumento de concentração, leva a um aumento da formação de raízes (Carvalho e Vidal, 2003). Este efeito foi exibido nos resultados obtidos neste estudo.

Relativamente à libertação de pigmento para o meio de cultura, verificou-se que os meios com maior crescimento de calos (M5 e M6), foram aqueles que apresentaram um maior número de amostras pigmentadas. Embora a produção de metabolitos

secundários esteja relacionada com tecidos especializados da planta (Jha e Ghosh, 2005), existem produtos secundários que estão associados a células indiferenciadas, como o caso dos carotenoides e as betalaínas (Bourgaud *et al.*, 2001).

4.2. Indução e cultura de calos

Na indução de calos em meio sólido, foram estudados quatro meios diferentes, onde variava a combinação dos reguladores de crescimento. Para além disso, foram usados dois tipos de explantes para indução, folhas e entrenós.

Quanto ao tipo de explante, à exceção do meio 3, não houve grandes discrepâncias nos valores obtidos quantitativos, apresentando ambos bons resultados. Porém quanto à libertação de pigmento, os entrenós apresentaram uma coloração mais intensa e menos tardia em comparação com as folhas.

Em relação aos meios de cultura, verificou-se que aquele que apresentou melhores resultados, em termos de obtenção de calos, foi o meio C4. Este meio apresentava tanto a auxina 2,4-D, como a citocinina BA, ambos em concentrações relativamente elevadas (1,0 mg/L 2,4-D e 0,2 mg/l BA). Este resultado, vai de encontro com o que é referido na literatura. A auxina 2,4-D é conhecida por ser uma forte indutora da formação de calos (Bonga e Anderkas, 2013). Para além disso, a combinação de elevadas concentrações tanto de auxinas como citocininas, resulta numa grande proliferação de calos (Trigiano e Gray, 2016).

Curiosamente, os meios que continham apenas a auxina, não apresentaram nenhuma amostra pigmentada. Mais uma vez, este resultado vai de encontro com as betalaínas. As citocininas mostraram-se promotoras da biossíntese de betalaínas, provavelmente através da ativação de genes (Hendry e Houghton, 2012).

Quanto à cultura dos calos em meio líquido, verificou-se que, apesar de se notar uma maior proliferação celular no meio C4 (meio MS + 1,0 mg/L 2,4-D + 0,2 mg/L BA), o meio C2 (meio MS + 1,0 mg/L NAA + 0,2 mg/L BA) apresentou um maior número de amostras com pigmento. A auxina 2,4-D é uma forte indutora de calos, porém NAA parece estimular melhor a produção do pigmento.

Em relação aos explantes usados, as folhas em meio líquido originaram um maior número de amostras pigmentadas em comparação com os entrenós, ainda que a amostra mais concentrada tenha sido obtida com calos de entrenós. Quanto aos balões usados, os de 50 ml mostraram-se mais eficazes na obtenção de pigmento, mas os de 20 ml resultaram num melhor crescimento de calo. Isto pode estar relacionado com a friabilidade dos calos, onde havia uma maior dispersão de células pelo meio.

Foi também possível verificar que a produção do pigmento não necessita de luz, embora na sua presença haja uma maior produção deste. Colocando novamente a hipótese de se tratar de um composto da família das betalaínas, sabe-se que existem plantas produtoras deste tipo de pigmento em que a presença de luz é indispensável (por exemplo, *Amaranthus spp.*), contrariamente ao que acontece com outras espécies (por exemplo, *Beta vulgaris*). Para além disso, a luz vermelha e UV parecem também induzir a síntese de betalaínas (Hendry e Houghton, 2012).

Em relação aos valores de absorção, após 5 e os 10 dias de cultura, os resultados obtidos foram bastante semelhantes, ou, como já referido, anotou-se um decréscimo nalguns casos. Isto indica que o pigmento sofreu degradação nesse espaço de tempo. Em estudos realizados com a espécie *Basella alba*, planta semelhante à *Anredera cordifolia*, este fenómeno também foi verificado na segunda semana de cultura, associando-se esta degradação à ação de enzimas (Cyunel, 1989).

Ainda em relação aos valores de absorção obtidos, verificou-se que estes eram mais elevados no comprimento de onda de 400 nm. Estima-se que o pico máximo de absorção esteja entre os 400 e os 500 nm, porém eram necessárias mais leituras para o poder confirmar.

Os calos que apresentavam uma maior pigmentação foram mudados para um novo meio de cultura, onde se obtiveram valores de absorção bastante idênticos aos primeiros. Desta forma, podemos afirmar que a subcultura de calos, em curto espaço de tempo, é preferível para a produção de maiores quantidades de pigmento, do que culturas com mais de 2 semanas onde o pigmento é degradado.

Neste parâmetro também foram conseguidas identificar amostras com diferentes colorações, desde o amarelo aos vermelhos. Tendo em conta os resultados tanto da coloração como os de absorvância obtidos, pode-se colocar a hipótese da presença de

ambos os tipos de betalaínas: betaxantinas (amarelas com picos de absorção nos 480 nm) e betacianinas (vermelhas com picos de absorção nos 540 nm) (Strack *et al.*, 2003).

4.3. Análise HPLC

Infelizmente não foi conseguido um cromatograma claro onde fosse possível identificar a família do pigmento avermelhado em estudo. Verificou-se que o pré-filtro do HPLC continha pigmento retido, não chegando, assim, quantidades suficientes de amostra para uma boa leitura. Esta acumulação, pode estar relacionada com a aglomeração do pigmento. Porém, este problema não foi identificado a tempo de forma a conseguir encontrar soluções para o corrigir.



5. Conclusão e perspetivas futuras

O estudo relativo à clonagem *in vitro* de *A. cordifolia* foi importante uma vez que os estudos relacionados com micropropagação desta planta são escassos. Pode-se concluir que a sua propagação *in vitro* é relativamente fácil, uma vez que se trata de uma planta simples de manusear e apresenta um crescimento rápido sem a necessidade de se adicionar reguladores de crescimento.

Esta planta desenvolve naturalmente calos na base que estão muitas vezes associados à libertação de um pigmento avermelhado para o meio. Estes calos apresentaram uma grande proliferação na presença conjunta de 2,4-D e BA.

Curiosamente, os calos obtidos de entrenós, em meio sólido apresentaram uma maior pigmentação do que os calos de folhas, uma vez que estas libertavam o pigmento para o meio de cultura numa fase mais tardia. Já em meio líquido, o número de amostras pigmentadas com calos de folhas foi superior, ainda que o mais concentrado tenha sido obtido com os entrenós.

De alguma forma a presença de BA, que se trata de uma citocinina, foi fundamental para a produção do pigmento em causa. Já a presença de luz, embora resulte numa maior pigmentação do meio, não é obrigatória nesta planta. Relativamente à razão volume-concentração, os balões de 50 ml foram mais eficazes.

Infelizmente, a análise HPLC não foi conclusiva. Embora não se possa concluir com certeza que se trate de um pigmento ou pigmentos da família das betalainas, a informação literária acerca destes compostos suporta esta hipótese.

Para clarificar com certeza que tipo de pigmento se trata, em estudos futuros aconselhava-se o recurso a técnicas de RMN, para a análise do esqueleto de carbono e de protão; espectrofotometria de massa, para a análise da estrutura do fragmento; e o espectro de infravermelhos, para avaliar os grupos funcionais.



6. Bibliografia

- Agati, G., Brunetti, C., Di Ferdinando, M., Ferrini, F., Pollastri, S. e Tattini, M. (2013). Functional roles of flavonoids in photoprotection: New evidence, lessons from the past. *Plant Physiology and Biochemistry*, 1–11.
- Astuti, S.M., Sakinah, A.M., Andayani, B.M. e Risch, A. (2011). Determination of Saponin Compound from *Anredera cordifolia* (Ten) Steenis Plant (Binahong) to Potential Treatment for Several Diseases. *Journal of Agricultural Science*, 3(4), 224–232.
- Azeredo, H.M.C. (2009). Betalains: Properties, sources, applications, and stability - A review. *International Journal of Food Science and Technology*, 44(12), 2365–2376.
- Bailey, L.H. (1949). *Manual of Cultivated Plants*. Macmillan Company.
- Bailey, L.H. (1975). *Manual of cultivated plants most commonly grown in the continental United States and Canada*. Macmillan Company.
- Batista, M.A., Pinheiro-Sant, H.M., Chaves, J.B. P. e Moraes, F.A. (2006). Carotenos e provitamina A em bertalha e ervas aromáticas comercializadas em Viçosa, Estado de Minas Gerais, durante as quatro estações do ano. *Acta Scientiarum - Health Sciences*, 28(1), 93-100.
- Bonga, J.M. e Aderkas, P. (2013). *In Vitro Culture of Trees*. Springer Science & Business Media.
- Borkowski, T., Szymusiak, H., Gliszczyńska-Świgło, A., Rietjens, I. M. C. M. e Tyrakowska, B. (2005). Radical scavenging capacity of wine anthocyanins is strongly pH-dependent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 5526–5534.
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, A. e Guckert, A. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, 161, 674-684.
- Bowden, K., Drysdale, A.C. e Mogeey, G A. (1965). Constituents of *Amanita muscaria*. *Nature*, 206, 1359–1360.
- Britton, G., Liaaen-Jensen, S. e Pfander, H. (1995) *Carotenoids*, Vol. 1A: Isolation and Analysis. Basel, Birkhäuser Verlag
- Brockington, S.F., Walker, R.H., Glover, B.J., Soltis, P. S., e Soltis, D.E. (2011). Complex pigment evolution in the Caryophyllales. *New Phytologist*, 190, 854–864.
- Cai, Y., Sun, M., Wu, H., Huang, R. e Corke, H. (1998). Characterization and Quantification of Betacyanin Pigments from Diverse *Amaranthus* Species. *Journal*

- of Agricultural and Food Chemistry, 46(2), 2063–2070.
- Campos M., (1997). Caracterização do polen apícola pelo seu perfil em compostos fenólicos e pesquisa de algumas actividades biológicas. PhD- thesis. Faculty of Pharmacy – University of Coimbra, Portugal.
- Campos M.; Sabatier S.; Amiot M.; Aubert S. (1990) – Characterization of flavonoids in three hive products : Bee pollen, Propolis, and Honey. *Planta Medica*, 56-58.
- Canadanovic-Brunet, J.M., Savatovic, S.S., Cetkovic, G.S., Vulic, J.J., Djilas, S.M., Markov, S.L. e Cvetkovic, D.D. (2011). Antioxidant and Antimicrobial Activities of Beet Root Pomace Extracts. *Czech Journal of Food Sciences*, 29, 575-585.
- Canhoto, J.M. (2010). Biotecnologia vegetal da clonagem de plantas à transformação
- Carvalho, J. e Vidal, M. (2003). *Noções De Cultivo E Tecidos Vegetais*. 1ª Edição. Embrapa. Campina Grande, PB.
- Castellanos-Santiago, E., e Yahia, E.M. (2008). Identification and quantification of betalains from the fruits of 10 Mexican prickly pear cultivars by high-performance liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 5758–5764.
- Chawla, H.S. (2009). *Introduction to plant biotechnology*. 3ª Edition, Science Publishers, Inc Enfield, NH, USA.
- Christinet, L., Burdet, F., Zaiko, M., Hinz, U. e Zrýd, J.P. (2004). Characterization and functional identification of a novel plant 4,5-extradiol dioxygenase involved in betalain pigment biosynthesis in *Portulaca grandiflora*. *Plant Physiol*, 134, 265–274.
- Christopher, B. (2008). *RHS A-Z Encyclopedia of Garden Plants*. The Royal Horticultural Society, UK.
- Chuang, M.T., Lin, Y.S. e Hou, W.C. (2007). Ancordin, the major rhizome protein of madeira-vine, with trypsin inhibitory and stimulatory activities in nitric oxide productions. *Peptides*, 28, 1311–1316.
- Clement, J.S., e Mabry, T.J. (1996). Pigment evolution in the *Caryophyllales*: A systematic overview. *Botanica Acta*, 109, 360–367.
- Clemente, A.C. e Desai, P.V. (2011). Evaluation of the haematological, hypoglycemic, hypolipidemic and antioxidant properties of *Amaranthus tricolor* leaf extract in rat. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 10, 595-602.
- Crozier, A., Clifford, M.N. e Ashihara, H. (2008), *Plant secondary*

- metabolites: occurrence, structure and role in the human diet. Blackwell Publishing Ltd.
- Cyunel, E. (1989). *Basella alba* L.: *In vitro* culture and the production of betalains. *Medicinal and Aromatic Plants II*, 7, 47-68.
- Davies, K. (2009). Plant Pigments and their manipulation. *Annual Plant Reviews*, 14
- Day, T.A., Howells, B.W. e Rice, W.J. (1994). Ultraviolet absorption and epidermal-transmittance spectra in foliage. *Physiologia Plantarum*, 92, 207–218.
- Deshmukh, S.A. e Gaikwad, D.K. (2014). A review of the taxonomy, ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Basella alba* (*Basellaceae*). *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 4, 153-165.
- Djamil, R., Wahyudi, P. S., Wahono, S., e Hanafi, M. (2012). Antioxidant Activity of Flavonoid From *Anredera Cordifolia* (Ten) Steenis Leaves. *International Research Journal of Pharmacy*. 3, 241–243.
- Dodds, J. H. e Roberts, L.W. (1985). *Experiments in Plant Tissue Culture*. 2^a Edição. Cambridge University Press, UK.
- Downham, A. E Collins, P. (2000). Colouring our foods in the last and next millennium. *International Journal of Food Science and Technology*, 35, 5–2
- Ernst, H. (2002). Recent advances in industrial carotenoid synthesis. *Pure and Applied Chemistry*, 74, 2213–2226.
- Esatbeyoglu, T., Wagner, A.E., Motafakkerazad, R., Nakajima, Y., Matsugo, S. e Rimbach, G. (2014). Free radical scavenging and antioxidant activity of betanin: electron spin resonance spectroscopy studies and studies in cultured cells. *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 73, 119–126.
- Escribano, J. (1998). Characterization of the antiradical activity of betalains from *Beta vulgaris* L. roots. *Phytochemical Analysis*, 9, 124–127.
- Evans, D.E., Coleman, J.O.D e Kearns, A. (2003). *Plant cell*. BIOS Scientific Publishers, London and New York
- Ferri, M. (2009). Binahong (*Anredera cordifolia*) Sebagai Obat. *Bulletin Warta. Penelitian dan Pengembangan Tanaman Industri. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan*. 15.
- Fiehn, O. (2002). Metabolomics - The link between genotypes and phenotypes. *Plant*

- Molecular Biology, 48, 155–171.
- Fischer, N., e Dreiding, A.S. (1972). Biosynthesis of Betalaines. On the Cleavage of the Aromatic Ring during the Enzymatic Transformation of Dopa into Betalamic Acid. *Helvetica Chimica Acta*, 55, 649–658.
- Floyd, A.G. (1989). The vine weeds of coastal rainforest. Noxious plant control responsibility, safety and benefits (Volume 1). New South Wales Agriculture and Fisheries, Sydney, NSW.
- Fontana, J. D., Mendes, S. V., Persike, D. S., Peracetta, L. F. e Passos, M. (2000) Carotenóides. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, 13
- Franco, J.A . (1971) Nova Flora de Portugal. *Lycopodiaceae – Umbelliferae*. Vol. I. Lisboa.
- Gandía-Herrero, F., Escribano, J., e García-Carmona, F. (2012). Purification and antiradical properties of the structural unit of betalains. *Journal of Natural Products*, 55, 649–658.
- Gandía-Herrero, F., Jiménez-Atiénzar, M., Cabanes, J., Escribano, J., e García-Carmona, F. (2009). Fluorescence detection of tyrosinase activity on dopamine-betaxanthin purified from *Portulaca oleracea* (common purslane) flowers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 2523–2528.
- Gasztonyi, M. N., Daood, H., Hájos, M. T. e Biacs, P. (2001). Comparison of red beet (*Beta vulgaris* var *conditiva*) varieties on the basis of their pigment components. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 932–933.
- genética. Imprensa da Universidade de Coimbra. Coimbra.
- Gengatharan, A., Dykes, G. A., e Choo, W. S. (2015). Betalains: Natural plant pigments with potential application in functional foods. *LWT - Food Science and Technology*, 64, 645–649.
- Green, B.R., e Durnford, D.G. (1996). The Chlorophyll-Carotenoid Proteins of Oxygenic Photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47, 685–714.
- Grotewold, E. (2006) *The Science of Flavonoids*. Springer, New York, New York.
- Guarino, C., La Valva, V. e Ravenna, P. (1992). Sistematica ed ecologia de *Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis. (*Basellaceae*), specie sudamericana spontaneizzata nel Napoletano. *Depinoa*, 33, 67-76.

- Hammond, G.B., Vaisberg, A. J., Marçalo, A., Villegas, L. F., e Moura-Letts, G. (2006). In vivo wound-healing activity of oleanolic acid derived from the acid hydrolysis of *Anredera diffusa*. *Journal of Natural Products*, 55, 481-504.
- Harborne, J.B. (1988) *The Flavonoids: Advances in Research Since 1980*. Chapman and Hall, New York.
- Harborne, J.B. (1994). *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*. Chapman and Hall, London.
- Harborne, J.B. e Williams, C.A. (2000). *Advances in flavonoid research since 1992*. *Phytochemistry*.
- Hatlestad, G.J., Sunnadeniya, R.M., Akhavan, N.A., Gonzalez, A., Goldman, I.L., McGrath, J.M. e Lloyd, A.M. (2012). The beet R locus encodes a new cytochrome P450 required for red betalain production. *Nature Genetics*, 44, 816–820.
- Hatschbach, G. (1974). *Baseláceas do Estado de Paraná*. *Bol. Mus. Bot. Munic*, 13, 1-5.
- Havaux, M., e Kloppstech, K. (2001). The protective functions of carotenoid and flavonoid pigments against excess visible radiation at chilling temperature investigated in *Arabidopsis* npq and tt mutants. *Planta*, 213, 953–966.
- Houghton, J.D. e Hendry, G.A.F. (2012). *Natural food colorants*. 2ª Edição. Springer Science & Business Media.
- Jackman, R.L. e Smith, J.L. (1996). *Anthocyanins and betalains*. *Natural food Colourants*. Springer Science and Business Media Dordrecht
- Jha, T.B e Ghosh, B. (2005). *Plant Tissue Culture: Basic and Applied*. Universities Press, Índia.
- Khan, M. I. e Giridhar, P. (2015). *Plant betalains: Chemistry and biochemistry*. *Phytochemistry*. 117, 267–295.
- Kinupp, V.F. (2007). *Plantas Alimentícias Não-Convencionais da Região Metropolitana de Porto Alegre*. (Dissertação de doutoramento em Fitotecnia). Universidade federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia.
- Kolb, C.A., e Pfündel, E.E. (2005). Origins of non-linear and dissimilar relationships between epidermal UV absorbance and UV absorbance of extracted phenolics in leaves of grapevine and barley. *Plant, Cell and Environment*, 25, 580–590.
- Kusumanti, E. e Sugiharto, S. (2017). Effect of dietary supplementation of binahong leaf meal, betel nut meal or their combination on serum albumin and globulin, fecal

- endoparasites and bacterial counts in milk of Saanen goats suffering from subclinical mastitis. *Agriculture and Natural Resources*, 51, 415–419.
- Kuswandi, P.C. e Sugiyarto, L. (2014). Morphogenetic effects of several plant growth regulators (pgr) on in vitro development of binahong (*Anredera cordifolia* l.) leaf. Yogyakarta State University, 103-108.
- Lawson, B.E. (1999). Predicting the potential distribution of two environmental weed species, *Anredera cordifolia* and *Schinus terebinthifolia*, using CLIMEX. (Dissertação). University of Queensland, St. Lucia, Queensland.
- Liakoura, V., Bornman, J.F., e Karabourniotis, G. (2003). The ability of abaxial and adaxial epidermis of sun and shade leaves to attenuate UV-A and UV-B radiation in relation to the UV absorbing capacity of the whole leaf methanolic extracts. *Physiologia Plantarum*, 117, 33–43.
- Lin, H.Y., Kuo, S.C., Chao, P.D.L. e Lin, T.D. (1988). A new sapogenin from *Boussingaultia gracilis*. *Journal of Natural Products*, 51, 797–798.
- Lourenço, J., Clamote, F., Pereira, E.P., Araújo, P.V., Silva, V. e Holyoak, D.T. (2018). *Boussingaultia cordifolia* Ten. – mapa de distribuição. Flora-On: Flore de Portugal Interativa, Sociedade Portuguesa de Botânica. Acedido em 18 de agosto de 2018 em: <http://www.flora-on.pt/#wBoussingaultia+cordifolia>.
- Manoi, F. (2009). Binahong (*Anredera cordifolia*) Sebagai Obat. *Warta Penelitian dan Pengembangan Tanaman Industri*, 15, 3-5.
- Martinevski, C.S., Oliveira, V., Rios, A., Flores, S. e Venzke, J. (2013) Utilização de Bertalha (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) e Ora-Pro-Nobis (*Pereskia aculeata* Mill.) na elaboração de pães. *Brazilian Journal Food and Nutrition*, 24, 255-370.
- Martinevski, C.S., Oliveira, V.R., Rios, A.O., Flores, S.H. e Guimarães, J. (2013) Utilização de Bertalha (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) e Ora-Pro-Nobis (*Pereskia aculeata* Mill.) na elaboração de pães. *Brazilian Journal Food and Nutrition*, 24, 255-370.
- Mazza, C. A., Bocalandro, H. E., Giordano, C. V., Battista, D., Scopel, A. L., e Ballaré, C. L. (2000). Functional Significance and Induction by Solar Radiation of Ultraviolet-Absorbing Sunscreens in Field-Grown Soybean Crops. *Plant Physiology*, 122, 117–125.
- Miers, J. (1864). On *Boussingaultia gracilis*. *Journ. Bot.*, 2, 164.

- Moßhammer, M.R., Stintzing, F.C. e Carle, R. (2005). Colour studies on fruit juice blends from *Opuntia* and *Hylocereus cacti* and betalain-containing model solutions derived therefrom. In *Food Research International*, 38, 975–981.
- Muizuddin M e Zubaidah E. (2015). Studi aktivitas antibakteri kefir teh daun sirsak (*Annona muricata* Linn.) dari berbagai merk teh daun sirsak dipasaran. *J Pangan dan Agroindustri*, 3, 1662-1672.
- Murashige, T. e Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
- Musso, H. (1979). The pigments of fly agaric, *Amanita muscaria*. *Tetrahedron*, 35, 2843-2853.
- Netwall C.A, Anderson L.A e Philip, J.D. (1996). *Herbal Medicine: A guide for health care professional*. The Pharmaceutical Press. London.
- Netzel, M., Stintzing, F. C., Quaas, D., Straß, G., Carle, R., Bitsch, R., Bitsch, I. e Frank, T. (2005). Renal excretion of antioxidative constituents from red beet in humans. In *Food Research International*, 38, 1051–1058.
- Niyogi, K.K. (2000). Safety valves for photosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, 3, 455–460.
- Paiva, W. (1997). Bertalha (*Basella L. syn. B. rubra*). Hortaliças não-convencionais das Amazônia. Embrapa, 33-38.
- Polturak, G., e Aharoni, A. (2017). La Vie en Rose: Biosynthesis, Sources and Applications of Betalain Pigments. *Molecular Plant*, 1-16.
- Rachmawati S. (2008). Study Macroscopic, dan Skrining Fitokimia *Daun Anredera cordifolia* (Ten) Steenis. Airlangga University. Indonesia.
- Rainha, B.V. e Silva, M. (1972). *Boussingaultia cordifolia* Ten. *Agron. Lusit*, 34, 186.
- Reitz, R. (1968). *Basellaceae*. *Flora Ctarinense Ilustrada*, 3, 3-8.
- Rice-Evans, C.A. Miller, N. J. e Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2, 152-159.
- Russo, A., Acquaviva, R., Campisi, A., Sorrenti, V., Di Giacomo, C., Virgata, G., Barcellona, M-L. e Vanella, A. (2000). Bioflavonoids as antiradicals, antioxidants and DNA cleavage protectors. *Cell Biology and Toxicology*, 16, 91-98.
- Sandmann, G., Römer, S., e Fraser, P. D. (2006). Understanding carotenoid metabolism as a necessity for genetic engineering of crop plants. *Metabolic Engineering*, 8, 291-

- 302.
- Sasaki, N., Adachi, T., Koda, T. e Ozeki, Y. (2004). Detection of UDP-glucose:cyclo-DOPA 5-O-glucosyltransferase activity in four o'clocks (*Mirabilis jalapa* L.). FEBS Letters, 568, 159–162.
- Schaller, C. (2018). Establecimiento y regeneración in vitro de plantas de *Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis. CONICET, Consejo Nacional de Investigaciones. Acedido em 18 de agosto de 2018, em: https://www.conicet.gov.ar/new_scp/detalle.php?keywords=&id=50040&congreso=yes&detalles=yes&congr_id=6143774
- Seigler, D. (2012). Plant Secondary Metabolism. Springer Science & Business Media, New York
- Sekiguchi, H., Ozeki, Y., e Sasaki, N. (2013). Biosynthesis and regulation of betalains in red beet. Red Beet Biotechnology. Springer, Boston, MA
- Sen, K., Goel, A., Rawal, S., Mahajan, N., Baboo, S. e Alok, S. (2010). Antimicrobial activity of *Basella rubra* leaves. Int. J. Pharm. Sci. Res. 1, 88-91
- Shenoy V.R. (1993). Anthocyanins—Prospective food colours. Current Science, 64, 575-579.
- Shimada, S., Otsuki, H., e Sakuta, M. (2007). Transcriptional control of anthocyanin biosynthetic genes in the *Caryophyllales*. Journal of Experimental Botany, 58, 957–967.
- Silva, V., Figueiredo, E., e Smith, G.F. (2015). Alien succulents naturalised and cultivated on the central west coast of Portugal Alien succulents naturalised and cultivated on the central west. BioOne Research Evolved, 33, 58–81.
- Singh, G.K., Utami, N.V., e Usman, H.A. (2014). Effect of Topical Application of Binahong [*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis] Leaf Paste in Wound Healing Process in Mice. Althea Medical Journal, 1, 6–11.
- Smith, R. H. (2013). Plant Tissue Culture. Plant Tissue Culture. Elsevier Inc.
- Souza, L.F. (2014). Aspectos fitotécnicos, bromatológicos e componentes bioativos de *Pereskia aculeata*, *Pereskia grandifolia* e *Anredera cordifolia*. (Dissertação de doutoramento em Fitotecnia). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia.

- Sperling, C.R. (1987). Systematics of the *Basellaceae*. (Dissertação de doutoramento), Harvard University, Boston, USA.
- Stafford, H.A. (1990). Flavonoid Metabolism. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Stintzing, F. C. e Carle, R. (2007). Betalains - emerging prospects for food scientists. *Trends in Food Science and Technology*, 18, 514–525.
- Stintzing, F. C., e Carle, R. (2004). Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. *Trends in Food Science and Technology*, 15, 19–38.
- Strack, D., Vogt, T., e Schliemann, W. (2003). Recent advances in betalain research. *Phytochemistry*, 62, 247–269.
- Sukandar, E.Y., Sigit, J.I., e Adiwibowo, L.F. (2013). Study of kidney repair mechanisms of corn silk (*Zea mays* L. Hair)-binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) leaves combination in rat model of kidney failure. *International Journal of Pharmacology*. 9, 12-23.
- Sunnadeniya, R., Bean, A., Brown, M., Akhavan, N., Hatlestad, G., Gonzalez, A., Symond, V.V. e Lloyd, A. (2016). Tyrosine hydroxylation in betalain pigment biosynthesis is performed by cytochrome P450 enzymes in beets (*Beta vulgaris*). *PLoS ONE*, 11, 1-16.
- Svenson, J., Smallfield, B.M., Joyce, N.I., Sansom, C.E., e Perry, N.B. (2008). Betalains in red and yellow varieties of the andean tuber crop ulluco (*Ullucus tuberosus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 7730–7737.
- Tanaka, Y., Sasaki, N., e Ohmiya, A. (2008). Biosynthesis of plant pigments: Anthocyanins, betalains and carotenoids. *Plant Journal*, 54, 733–749.
- Tournaire, C., Croux, S., Maurette, M.T., Beck, I., Hocquaux, M., Braun, A.M. e Oliveros, E. (1993). Antioxidant activity of flavonoids: Efficiency of singlet oxygen ($^1\Delta_g$) quenching. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology*, 19, 205–215.
- Trigiano, R.N. e Gray, D.J. (2010). *Plant Tissue Culture, Development, and Biotechnology*. CRC Press.
- Troncoso, N. (1987). *Basellaceae*. Fl. Ilustr. Entre Ríos, 7, 248-251.
- Tshikalange, T.E., Meyer, J.J.M., e Hussein, A.A. (2005). Antimicrobial activity, toxicity and the isolation of a bioactive compound from plants used to treat sexually

- transmitted diseases. *Journal of Ethnopharmacology*, 96, 515–519.
- Uchida, S. (2003). Production of Digital map of the Hazardous Condition of Soil Erosion for the Sloping Lands of west Java, Indonesia, using Geographic Information System (GIS). *JIRCAS*
- Van Der Sluis, A. A., Dekker, M. e Jongen, W. M. F. (1997). Flavonoids as bioactive components in apple products. In *Cancer Letters*, 114, 107-108.
- Van Steenis, C. (1957). *Basellaceae*. *Flora Malesiana*, 5, 300-304.
- Velićanski, A.S., Cvetković, D.D., Markov, S.L., Vulić, J.J., e Djilas, S.M. (2011). Antibacterial activity of *Beta vulgaris* L. pomace extract. *Acta Periodica Technologica*, 42, 263–269.
- Villa Carenzo, M. (1966). *Boussingaultias argentinas* (Baselaceas). *Lilloa*, 32, 301-317.
- Vivian-Smith, G., Lawson, B., Turnbull, I., e Paul, D. (2007). The biology of Australian weeds. *Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis. *Plant Protection Quarterly*, 22, 2–10.
- Vogt, T., Grimm, R., Strack, D. e Gmbh, H.P. (1999). Cloning and expression of a cDNA encoding betanidin 5-O -glucosyltransferase, a betanidin and avonoid specific enzyme with high homology to inducible glucosyltransferases from the Solanaceae. *The Plant Journal* 19, 509-519.
- Wagner, W.L., Herbst, D. R., e Sohmer, S. H. (1999). *Manual of the Flowering Plants of Hawai'i*, Honolulu. University of Hawaii Press. Honolulu.
- Wang, C.Q., Chen, M., e Wang, B.S. (2007). Betacyanin accumulation in the leaves of *Chalophyte Suaeda salsa* L. is induced by watering roots with H₂O₂. *Plant Science*, 172, 1-7.
- Williamson, G., Day, A.J., Plumb, G.W., e Couteau, D. (2000). Human metabolic pathways of dietary flavonoids and cinnamates. *Biochemical Society Transactions*, 28, 17-21.
- Wroblewska, M., Juskiewicz, J. e Wiczkowski, W. (2011). Physiological properties of beetroot crisps applied in standard and dyslipidaemic diets of rats. *Lipids in Health and Disease*, 10, 1-8.
- Xifreda, C., Argimón, S., e Wulff, A.F. (2000). Intraspecific characterization and chromosome numbers in *Anredera cordifolia* (*Basellaceae*). *Thaiszia - Journal of Botany*, 9, 99–108.
- Zapater, M.A. (1991). *Basellaceae*. *Aport. Bot. Salta. Ser. Flora*, , 1-5.

