

## Produção de betacianina em erva-de-jacaré cultivada *in vitro* com diferentes concentrações de sulfato de cobre

Betacyanin production in alligator weed, grown in vitro, with different concentrations of copper sulfate

Janieli Cristina Perotti<sup>I\*</sup> Isabel Corrêa da Silva Rodrigues<sup>II</sup> Alícia Moraes Kleinowski<sup>II</sup>  
Márcia Vaz Ribeiro<sup>II</sup> Andersom Millech Einhardt<sup>II</sup> José Antonio Peters<sup>II</sup> Marcos Antonio Bacarin<sup>II</sup>  
Eugenia Jacira Bolacel Braga<sup>II</sup>

### RESUMO

A manipulação da concentração dos microelementos no meio de cultura representa uma boa estratégia para aumentar a produção de metabólitos secundários em cultura de tecidos. Este trabalho teve por objetivo demonstrar a influência do sulfato de cobre na produção de betacianina e na multiplicação de plantas de *Alternanthera philoxeroides* (erva-de-jacaré) cultivadas *in vitro*. Segmentos nodais, obtidos de plantas pré-estabelecidas e após três subcultivos, foram inoculados em meio MS, com diferentes concentrações de  $\text{CuSO}_4$  (0; 25; 75; 125; 175; 200  $\mu\text{M}$ ). O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com seis concentrações de  $\text{CuSO}_4$  e cinco repetições representadas por um frasco contendo quatro explantes. Os resultados foram submetidos à análise de variância, à regressão polinomial e a análises de correlação entre as variáveis morfológicas e a produção de betacianina. Concentrações acima de 75  $\mu\text{M}$  diminuíram a altura das plantas, o número de brotos e gemas e o crescimento radicular, enquanto que, na concentração de 125  $\mu\text{M}$ , houve a maior produção de massa fresca. A produção de betacianina aumentou 60% em relação ao controle com 175  $\mu\text{M}$  de  $\text{CuSO}_4$ . Ocorreu crescimento das plantas em todas as concentrações de  $\text{CuSO}_4$  testadas, com exceção de 200  $\mu\text{M}$ , sendo esta considerada tóxica.

**Palavras-chave:** estresse abiótico, betalainas, cultivo *in vitro*, *Alternanthera philoxeroides*, metabolismo secundário.

### ABSTRACT

The manipulation of concentration of trace elements in the culture medium represents a good strategy to increase the production of secondary metabolites in tissue

culture. This study aimed to demonstrate the influence of copper sulphate in the production of betacyanin and the multiplication of plants of *Alternanthera philoxeroides* (alligator weed) cultured *in vitro*. Nodal segments, obtained from plants pre-established and after three subcultures, were inoculated in basic MS with different concentrations of  $\text{CuSO}_4$  (0, 25, 75, 125, 175, 200  $\mu\text{M}$ ). The results were subjected to analysis of variance, polynomial regression and correlation analysis between the morphological variables and the production of betacyanin. The experimental design was completely randomized with six concentration of  $\text{CuSO}_4$  and five replicates represented by a bottle containing four explants. Concentrations above 75  $\mu\text{M}$  decreased the height of the plant, number of shoots and buds and root growth, while the concentration of 125  $\mu\text{M}$  resulted in the highest fresh mass production. Betacyanin production increased 60% over control with 175  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ . Plant growth occurred in all tested concentrations of  $\text{CuSO}_4$ , with the exception of 200  $\mu\text{M}$  which was toxic.

**Key words:** abiotic stress, betalain, *in vitro* culture, *Alternanthera philoxeroides*, secondary metabolism.

### INTRODUÇÃO

Com o intuito de aumentar a produtividade de compostos vegetais de interesse, diversas técnicas vêm sendo utilizadas, incluindo a seleção de linhagens, a engenharia metabólica, a otimização das condições de cultivo e o emprego de elicitores (CHEN & CHEN, 2000). Alguns trabalhos têm demonstrado o efeito de microelementos na morfogênese *in vitro* e na

<sup>I</sup>Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), 960010-900, Pelotas, RS, Brasil. E-mail: janieliperotti@hotmail.com. \*Autor para correspondência.

<sup>II</sup>Departamento de Botânica, UFPEL, Pelotas, RS, Brasil.

produtividade de metabólitos secundários (TREJO-TAPIA et al., 2001; AKITA et al., 2002; KUMAR et al., 2004).

O cobre é um micronutriente essencial para o desenvolvimento normal das plantas, atuando como ativador ou constituinte de enzimas no transporte de elétrons, nos processos de oxirredução e na biossíntese de proteínas e carboidratos (NASSAR, 2004; NIEDZ & EVENS, 2007). O íon divalente  $\text{Cu}^{2+}$  tem demonstrado efeito positivo na produção de alguns metabólitos secundários, entre eles, diogenina em batata-do-ar (*Dioscorea bulbifera*) (NARULA et al., 2005) e quercetina em rasna (*Pluchea lanceolata*) (KUMAR et al., 2004), além de ter aumentado a produção de betacianina em beterraba (*Beta vulgaris*) (TREJO-TAPIA et al., 2001). A concentração dos nutrientes inorgânicos, incluindo o cobre, utilizada no meio em cultura de tecidos vegetais, é, na maioria das vezes, baseada nos níveis estabelecidos por MURASHIGE & SKOOG (1962) para a cultura de tabaco (*Nicotiana tabacum*). No entanto, tal concentração pode não ser a mais adequada para o cultivo de outras espécies e isso pôde ser observado quando o aumento da concentração de sulfato de cobre favoreceu a indução de calos, a indução e o alongamento de brotos e raízes (KOTHARI-CHAJER & SHARMAR, 2008).

*Alternanthera philoxeroides*, conhecida popularmente como brejo-d'água ou erva-de-jacaré (alligator weed), é uma espécie nativa da América do Sul que apresenta em seus extratos flavonoides glicosilados, saponinas e betalaínas. É utilizada na medicina contra alergia, como diurética e antipirética, e em tratamentos de feridas e úlceras, além de apresentar comprovada ação antitumoral e antiviral (JIANG et al., 2005; FANG et al., 2007; RATTANATHONGKOM et al., 2009).

As betacianinas são pigmentos nitrogenados, de coloração vermelho-violeta, classificadas quimicamente em quatro tipos: betanina, amarantina, gonferina e bougainvilina (VOLP et al., 2009). Esses pigmentos são pertencentes, juntamente com as betaxantinas, à classe das betalaínas, sendo amplamente utilizados como aditivo de produtos alimentícios. A tirosinase ou polifenol oxidase cataliza a hidroxilação da tirosina para dihidroxifenilalanina (DOPA) e a subsequente oxidação de DOPA na rota de biogêneses das betalaínas, incluindo as betacianinas e as betaxantinas (WANG et al., 2007).

A cultura de células vegetais vem sendo utilizada para a produção de compostos de interesse às indústrias de alimentos, cosméticos e fármacos (SHIM et al., 2010). Mesmo apresentando resultados satisfatórios, a produtividade desses compostos, como

flavonoides e compostos nitrogenados, muitas vezes é menor em cultura de células se comparada a tecidos sintetizadores nas plantas e isso ocorre devido à falta de diferenciação das células em suspensão e cultura de calo de tecidos e órgãos (VERPOORTE et al., 2000; BOURGAUD et al., 2001).

Tendo em vista que a tirosinase trata-se de uma enzima cúprica que atua na rota de biossíntese de betalaínas e que o cobre pode exercer efeitos positivos na multiplicação de plantas e na produção de metabólitos secundários, objetivou-se com este trabalho demonstrar a influência de diferentes concentrações de sulfato de cobre na produção de betacianina e na multiplicação de plantas de *A. philoxeroides* (erva-de-jacaré) cultivadas *in vitro*.

## MATERIAL E MÉTODOS

Plantas de *A. philoxeroides* (erva-de-jacaré), proveniente do município de Rio Grande, no Rio Grande do Sul, tiveram sua identificação taxonômica confirmada por meio da chave de identificação para Amaranthaceae e catalogada no Herbário Pel sob o número 24.535. Para o estabelecimento *in vitro*, foram utilizados segmentos nodais de brotações novas, contendo uma ou duas gemas axilares, de plantas mantidas, por 15 dias, na casa de vegetação. Os segmentos foram lavados em água corrente e em água destilada sob agitação mecânica por 15 minutos. Posteriormente, o material vegetal foi imerso em hipoclorito de sódio 1%, com três gotas de tween (20min), e em álcool 70%, por 20 segundos. Todos os procedimentos foram intercalados com banhos em água estéril.

Para o experimento com diferentes concentrações de sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ), foram utilizados como explantes segmentos nodais de aproximadamente (1cm), com duas gemas axilares, após três subcultivos (90 dias).

Seis concentrações (0; 25; 75; 125; 175; 200 $\mu\text{M}$ ) de  $\text{CuSO}_4$  foram adicionadas separadamente em meio MS, contendo 30g  $\text{L}^{-1}$  de sacarose, 100mg  $\text{L}^{-1}$  de mio-inositol e sem adição de reguladores de crescimento. O pH dos meios foi ajustado para 5,8, antes da adição de 7g  $\text{L}^{-1}$  de ágar (marca Vetec<sup>®</sup>) e da esterilização. Os frascos contendo os explantes e os meios de cultura foram vedados com papel alumínio e autoclavados por 20 minutos a uma temperatura de 121°C e pressão de 1,05kg  $\text{cm}^{-2}$ .

Os explantes foram inoculados nos meios de cultura em câmara de fluxo laminar, em condições assépticas. Em seguida, os frascos com os explantes foram colocados em sala de crescimento, onde permaneceram por 35 dias sob fotoperíodo de 16 horas

e densidade de fluxo de fótons de  $48\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , com temperatura de  $25\pm 2^\circ\text{C}$ . Ao final desse período, foi avaliado o número de gemas axilares e brotos por planta, a altura das brotações (cm), a porcentagem de enraizamento, o comprimento médio das raízes (cm) e a biomassa fresca da parte aérea (mg).

Para análise das betacianinas, foram utilizadas as partes aéreas das brotações, as quais foram maceradas em 5mL de água destilada e, em seguida, centrifugadas a 15790rpm, a  $4^\circ\text{C}$ , por 25 minutos. A quantificação de betacianinas foi realizada em espectrofotômetro Ultrospec 2100 Pro da Amersham Bioscience®, de acordo com a metodologia descrita por CAI et al. (1998).

A concentração de betacianina foi calculada e expressa como amarantina pela seguinte fórmula: Concentração de amarantina =  $((A_{536} - A_{650}) \times P.M. \times V \times FD \times 100 / \epsilon \times BMF)$ , em que:  $\epsilon$  = coeficiente de absorção de amarantina ( $5,66 \times 10^4 \text{cm}^{-1} \text{mol}^{-1} \text{L}$ ),  $A_{536}$  = absorvância a 536nm para a amarantina e  $A_{650}$  = absorvância a 650 para clorofila, P.M. = peso molecular ( $726,6 \text{g mol}^{-1}$ ), V = volume de extração (5mL), FD = fator de diluição e BMF = biomassa fresca das amostras. Os resultados foram expressos em mg de amarantina por 100g MF<sup>-1</sup>.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com seis tratamentos (concentrações de sulfato de cobre); cada tratamento contendo cinco repetições, sendo cada uma representada por um frasco com cinco explantes. Os resultados foram submetidos à análise de variância e regressão polinomial com o auxílio do *software* estatístico WinStat (MACHADO & CONCEIÇÃO, 2002). Foram realizadas análises de correlação entre as variáveis morfológicas e a produção de betacianina.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os explantes inoculados formaram brotações novas, independentemente da concentração de sulfato de cobre presente nos meios; porém, concentrações acima de  $75\mu\text{M}$  foram prejudiciais a essa indução (Figura 1A). O número máximo de gemas (11,4) e altura (8,4cm) das plantas foi registrado em  $75\mu\text{M}$ , ocorrendo, em concentrações superiores, diminuição significativa nas duas variáveis (Figura 1B e 1C).

Esses resultados corroboram NARULA et al. (2005), os quais, estudando segmentos nodais de *Dioscorea bulbifera* (batata-do-ar), observaram melhor resposta com  $75\mu\text{M}$  de  $\text{CuSO}_4$  no crescimento das brotações e número de gemas dessa espécie. A importância do cobre foi comprovada por JOSHI & KOTHARI (2007), quando observaram aumento significativo do número e comprimento dos brotos por

explante de *Capsicum annum* (pimentão), com a adição de 30 vezes a concentração normal do  $\text{CuSO}_4$  no meio MS. O excesso e a ausência de cobre inibem o crescimento e prejudicam importantes processos celulares, como a fotossíntese, a síntese de pigmentos e o transporte de elétrons mitocondrial (NASSAR, 2004).

O aumento da concentração de  $\text{CuSO}_4$  até  $125\mu\text{M}$  promoveu um incremento da biomassa fresca da parte aérea, apresentando associação linear positiva com a altura das plantas (Figura 1D, Tabela 1). Esse resultado pode ser devido ao cobre ser constituinte e ativador de enzimas envolvidas no transporte de elétrons e na biossíntese de proteínas e carboidratos. Tais resultados, porém, não foram observados em *Dioscorea bulbifera* (batata-do-ar), em que concentrações acima do controle promoveram diminuição da biomassa fresca, até mesmo na concentração de  $75\mu\text{M}$ , em que as brotações apresentaram maior comprimento (NARULA et al., 2005). No entanto, o aumento de 50 vezes na concentração de  $\text{CuSO}_4$ , no meio MS, em *Paspalum scrobiculatum* (paspalum nativo), e cinco vezes em *Stevia rebaudiana* (estévia) promoveu um significativo aumento na biomassa dos calos e nos brotos das respectivas plantas (KOTHARI-CHAJER & SHARMAR, 2008).

O efeito do cobre foi bastante visível no comprimento das raízes, observando-se um estímulo no crescimento radicular até  $75\mu\text{M}$  e um efeito deletério a partir dessa concentração. Plantas expostas às concentrações de  $175$  e  $200\mu\text{M}$  tiveram uma diminuição de aproximadamente quatro vezes no comprimento da raiz, com engrossamento e diminuição de ramificações no sistema radicular (Figura 1E e Figura 2). Esse resultado está de acordo com NASSAR (2004) que observou, em brotos de banana, inibição total da rizogênese no meio de cultivo adicionado de  $100\mu\text{M}$  de  $\text{CuSO}_4$ .

LLORENS et al. (2000), estudando o efeito do aumento da concentração de cobre em *Vitis vinifera* (videira), verificaram que os níveis de cobre aumentavam tanto nas folhas, como nas raízes após o estresse, com maior concentração desse nutriente nas raízes. Isso sugere a ocorrência de um mecanismo de imobilização nesse órgão, podendo ser esta a razão para o forte efeito das altas concentrações de cobre no sistema radicular.

A adição de  $\text{CuSO}_4$  no meio de cultura, em concentrações maiores que as originais do meio MS, tem apresentado efeitos positivos na produção de metabólitos secundários. Em *Dioscorea bulbifera*

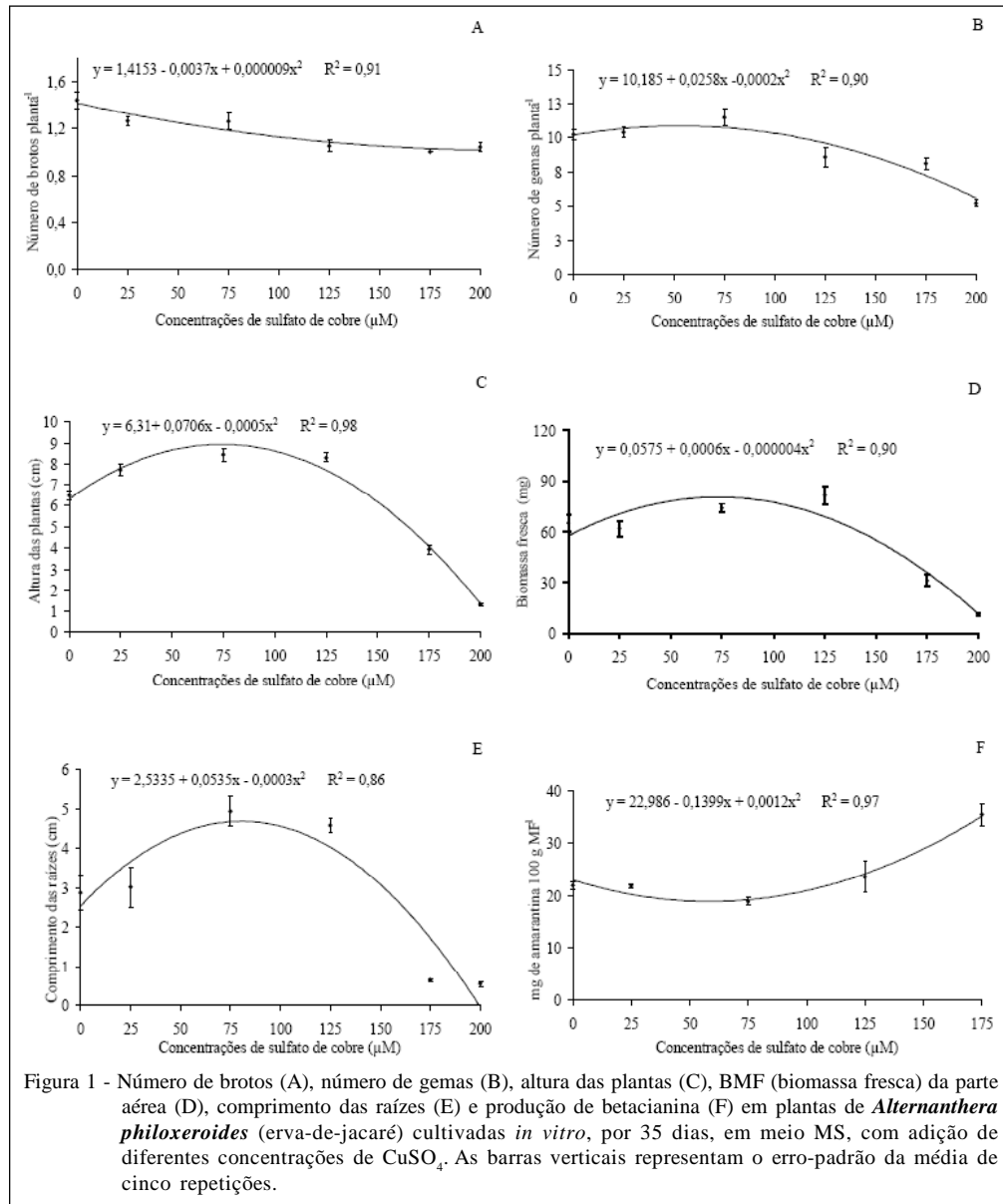


Tabela 1 - Análise de correlação entre as variáveis morfológicas e produção de betacianina após tratamento com diferentes concentrações de sulfato de cobre em plantas de *Alternanthera philoxeroides* (erva-de-jacaré) cultivadas *in vitro*, em meio MS, por 35 dias. Pelotas - RS, Brasil, novembro de 2009.

	NB*	A	BFPA	CR	PB
NG	-0,4149	0,5086	0,4718	0,5097	-0,6391
NB	-	-0,8554	-0,8089	-0,7494	0,7924
A	-	-	0,8850	0,8652	-0,8021
MFPA	-	-	-	0,8252	-0,7817
CR	-	-	-	-	-0,6931

\*NG = número de gemas, NB = número de brotos, A = altura (cm), BFPA = biomassa fresca da parte aérea, CR = comprimento radicular (cm) e PB = produção de betacianina.



Figura 2 - Plantas de *Alternanthera philoxeroides* (erva-de-jacaré) cultivadas *in vitro*, em meio MS, com a adição de 175 $\mu$ M de sulfato de cobre, por 35 dias.

(batata-do-ar), a adição de 75 $\mu$ M de CuSO<sub>4</sub> promoveu um aumento significativo no rendimento de diosgenina (NARULA et al., 2005). Os níveis de quercetina também aumentaram após a adição de 150 $\mu$ M de CuSO<sub>4</sub> em brotos de *Plunchea lanceolata* (rasna), e a adição de 100 $\mu$ M de CuSO<sub>4</sub> aumentou significativamente o conteúdo de lepidina em *Lepidium sativum* (agrião-do-seco) (SABA et al., 2000). Resultados semelhantes foram obtidos por TREJO-TAPIA et al. (2001), que verificaram estímulo na produção de betalainas, em *Beta vulgaris* (beterraba), quando aumentavam em cinco vezes a concentração de Cu<sup>2+</sup> em meio B5. Por outro lado, a ausência de cobre no meio de cultura não afetou a produção de betacianina nessa mesma espécie (AKITA et al., 2002).

Neste trabalho foi observado, a partir da concentração de 125 $\mu$ M de CuSO<sub>4</sub>, um incremento na produção de betacianina, (Figura 1F), apresentando aumento de 59% no seu teor na concentração de 175 $\mu$ M

em relação ao controle (Tabela 2). A análise de correlação demonstrou, com exceção do número de brotos por explante, associação linear negativa entre a concentração de betacianina e as variáveis morfológicas analisadas (Tabela 1).

Como o cobre é um elemento constituinte da enzima tirosinase, que cataliza a hidroxilação da tirosina para DOPA (dihidroxifenilalanina) e a subsequente oxidação desta na rota de biossíntese de betalainas (STEINER et al., 1999), o incremento da produção de betacianina, neste trabalho, pode ter sido influenciada pela maior disponibilidade desse íon.

## CONCLUSÃO

Altas concentrações de sulfato de cobre estimulam a biossíntese de betacianinas, porém apresentam efeitos deletérios para o crescimento das plantas de *A. philoxeroides* (erva-de-jacaré).

Tabela 2 - Produção de betacianina em plantas de *Alternanthera philoxeroides* (erva-de-jacaré) cultivadas *in vitro*, por 35 dias, em meio MS, com adição de diferentes concentrações de CuSO<sub>4</sub> em relação ao controle. Pelotas - RS, Brasil, novembro de 2009.

Concentração de CuSO <sub>4</sub> ( $\mu$ M)	Conteúdo de betacianina (mg de amarantina 100g MF <sup>-1</sup> )	Conteúdo de betacianina em relação ao controle (x controle)
0 (controle)	22	1,00
25	22	1,00
75	19	0,86
125	24	1,09
175	35	1,59

## REFERÊNCIAS

- AKITA, T. et al. New medium composition for high betacyanin production by a cell suspension culture of table beet (*Beta vulgaris* L.). **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.66, n.4, p.902-905, 2002. Disponível em: <[http://www.jstage.jst.go.jp/article/bbb/66/4/66\\_902/\\_article-char/en](http://www.jstage.jst.go.jp/article/bbb/66/4/66_902/_article-char/en)>. Acesso em: 19 set. 2009. doi:10.1271/bbb.66.902.
- BOURGAUD, F. et al. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Science**, v.161, n.5, p.839-851, 2001. Disponível em: <[http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=ArticleURL&\\_udi=B6TBH-443JW7X-2&\\_user=687304&\\_coverDate=10%2F31%2F2001&\\_rdoc=1&\\_fmt=high&\\_orig=search&\\_sort=d&\\_docanchor=&view=c&\\_searchStrId=1429291411&\\_rerunOrigin=google&\\_acct=C000037798&\\_version=1&\\_urlVersion=0&\\_userid=687304&md5=4479599e0bf2d8ded6ec3249e5785501](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6TBH-443JW7X-2&_user=687304&_coverDate=10%2F31%2F2001&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&_searchStrId=1429291411&_rerunOrigin=google&_acct=C000037798&_version=1&_urlVersion=0&_userid=687304&md5=4479599e0bf2d8ded6ec3249e5785501)>. Acesso em: 10 set. 2009. doi:10.1016/S0168-9452(01)00490-3.
- CAI, Y. et al. Characterization and quantification of betacyanin pigments from diverse *Amaranthus* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, n.6, p.2063-2070, 1998. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf9709966>>. Acesso em: 22 set. 2009. doi: 10.1021/jf9709966.
- CHEN H.; CHEN, F. Effects of yeast elicitor on the grown and secondary metabolism of a high-tanshinone-producing line of the Ti transformed *Salvia miltiorrhiza* cells in suspension culture. **Process Biochemistry**, v.35, n.8, p.837-840, 2000. Disponível em: <[http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=ArticleURL&\\_udi=B6THB-3YTJKSM-D&\\_user=687304&\\_coverDate=03%2F31%2F2000&\\_rdoc=1&\\_fmt=high&\\_orig=search&\\_sort=d&\\_docanchor=&view=c&\\_searchStrId=1429295178&\\_rerunOrigin=google&\\_acct=C000037798&\\_version=1&\\_urlVersion=0&\\_userid=687304&md5=367b9063alb45696195555e13d9bdcc](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6THB-3YTJKSM-D&_user=687304&_coverDate=03%2F31%2F2000&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&_searchStrId=1429295178&_rerunOrigin=google&_acct=C000037798&_version=1&_urlVersion=0&_userid=687304&md5=367b9063alb45696195555e13d9bdcc)>. Acesso em: 21 set. 2009. doi: 10.1016/S0032-9592(99)00146-6.
- FANG, J.B. et al. Antitumor constituents from *Alternanthera philoxeroides*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v.9, n.6, p.511-515, 2007. Disponível em: <<http://www.informaworld.com/smp/content-db=all~content=a782065002>>. Acesso em: 19 out. 2009. doi: 10.1080/10286020600782231.
- JIANG, W. et al. Effects of *Alternanthera philoxeroides* Griseb. against dengue virus in vitro. **Journal of First Military Medical University**, v.25, n.4, p.454-456, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15837655>>. Acesso em: 22 ago. 2009.
- JOSHI, A.; KOTHARI, S.L. High copper levels in the medium improves shoot bud differentiation and elongation from the cultured cotyledons of *Capsicum annuum* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.88, n.2, p.127-133, 2007. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/e6w495702617j770>>. Acesso em: 16 set. 2009. doi: 10.1007/s11240-006-9171-6.
- KOTHARI-CHAJER, A.; SHARMA, M. Micronutrient optimization results into highly improved in vitro plant regeneration in Kodo (*Paspalum scrobiculatum* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.94, n.6, p.105-112, 2008. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/t7032h170m46142u>>. Acesso em: 22 set. 2009. doi: 10.1007/s11240-008-9392-y.
- KUMAR, S. et al. *In vitro* propagation of *Pluchea lanceolata*, a medicinal plant, and effect of heavy metals and different aminopurines on quercetin content. **In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v.40, n.2, p.171-176, 2004. Disponível em: <<http://www.bioone.org/doi/abs/10.1079/IVP2003490>>. Acesso em: 18 set. 2009. doi: 10.1079/IVP2003490.
- LLORENS, N. et al. Effects of copper exposure upon nitrogen metabolism in tissue cultures *Vitis vinifera*. **Plant Science**, v.160, n.1, p.159-163, 2000. Disponível em: <[http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=ArticleURL&\\_udi=B6TBH-426XX3C-K&\\_user=686487&\\_coverDate=12%2F07%2F2000&\\_rdoc=1&\\_fmt=high&\\_orig=search&\\_sort=d&\\_docanchor=&view=c&\\_searchStrId=1432274636&\\_rerunOrigin=google&\\_acct=C000037759&\\_version=1&\\_urlVersion=0&\\_userid=686487&md5=7f93f626f57fb86733da5afce519bb81](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6TBH-426XX3C-K&_user=686487&_coverDate=12%2F07%2F2000&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&_searchStrId=1432274636&_rerunOrigin=google&_acct=C000037759&_version=1&_urlVersion=0&_userid=686487&md5=7f93f626f57fb86733da5afce519bb81)>. Acesso em: 22 de set. 2009. doi: 10.1016/S0168-9452(00)00379-4.
- MACHADO, A.; CONCEIÇÃO, A.R. **Programa estatístico WinStat sistema de análise estatístico para Windows. Versão 2.0.** Pelotas: UFPel, 2002. Disponível em: <<http://minerva.ufpel.edu.br/~amachado/WinStat.EXE>>. Acesso em: 10 ago. 2010.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, n.3, p.473-497, 1962. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>>. Acesso em: 11 jun. 2009. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
- NARULA, A. et al. Abiotic metal stress enhances diosgenin yield in *Dioscorea bulbifera* L. cultures. **Plant Cell Reporter**, v.24, n.4, p.250-254, 2005. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/k018552j592wl46n>>. Acesso em: 18 set. 2009. doi: 10.1007/s00299-005-0945-9.
- NASSAR, A.H. Effect of some copper compounds on rhizogenesis of micropropagated banana shoots. **International Journal of Agriculture & Biology**, v.6, n.3, p.552-556, 2004. Disponível em: <[http://www.fspublishers.org/ijab/past-issues/IJABVOL\\_6\\_NO\\_3/31](http://www.fspublishers.org/ijab/past-issues/IJABVOL_6_NO_3/31)>. Acesso em: 15 jul. 2009. doi: 1560-8530/2004/06-3-552-556.
- NIEDZ, R.; EVENS, T.J. Regulating plant tissue growth by mineral nutrition. **In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v.43, n.4, p.370-381, 2007. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/121141j274222605>>. Acesso em: 20 out. 2009. doi: 10.1007/s11627-007-9062-5.
- RATTANATHONGKOM, A. et al. Inhibitory effect on nitric oxide production of RAW 264.7 macrophage cell of an active compound from *Alternanthera philoxeroides*. **Khon Kaen University Research Journal**, v.9, n.3, p.9-16, 2009. Disponível em: <[http://ora.kku.ac.th/Res\\_kku/Journal/AttachFile/8833.pdf](http://ora.kku.ac.th/Res_kku/Journal/AttachFile/8833.pdf)>. Acesso em: 14 nov. 2009.
- SABA, D.P. et al. Effect of ZnSO<sub>4</sub> and CuSO<sub>4</sub> on regeneration and lepidine content in *Lepidium sativum* L. **Biologia Plantarum**, v.41, n.2, p.253-256, 2000. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/g86j7qq831463583>>. Acesso em: 10 out. 2009. doi: 10.1023/A:1002708427984.

- SHIM, K.M. et al. Accumulation of cell biomass anthraquinones, phenolics, and flavonoids as affected by auxin, cytokinin, and medium salt strength in cell suspension culture of *Morinda citrifolia*. **Korean Journal of Horticultural Science & Technology**, v.28, n.2, p.288-294, 2010. Disponível em: <[http://www.dbpia.co.kr/view/ar\\_view.asp?arid=1423187](http://www.dbpia.co.kr/view/ar_view.asp?arid=1423187)>. Acesso em: 27 maio, 2010.
- STEINER, U. et al. Tyrosinase involved in betalain biosynthesis of higher plants. **Planta**, v.208, n.1, p.114-124, 1999. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/lfq49g56ky0w2anq/>>. Acesso em: 29 set. 2009. doi: 10.1007/s004250050541.
- TREJO-TAPIA, G. et al. Influence of cobalt and other microelements on the production of betalains and the growth of suspension cultures of *Beta vulgaris*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.67, n.1, p.19-23, 2001. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/x3p47465g4748287/>>. Acesso em: 20 out. 2009. doi: 10.1023/A:1011684619614.
- VERPOORTE, R.A. et al. Engineering the plant cell factory for secondary metabolite production. **Transgenic Research**, v.9, n.4-5, p.323-343, 2000. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/p11u59277787375t/>>. Acesso em: 14 out. 2009. doi: 10.1023/A:1008966404981.
- VOLP, A.C.P. et al. Pigmentos naturais bioativos. **Alimentos e Nutrição**, v.20, n.1, p.157-166, 2009. Disponível em: <<http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/alimentos/article/viewArticle/959>>. Acesso em: 20 out. 2009.
- WANG, C.Q. et al. Correlation of tyrosinase activity and betacyanin biosynthesis induced by dark in C3 halophyte *Suaeda salsa* seedlings. **Plant Science**, v.173, n.5, p.487-494, 2007. Disponível em: <[http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=ArticleURL&\\_udi=B6TBH-4PC8RC3-2&\\_user=687304&\\_coverDate=11%2F30%2F2007&\\_rdoc=1&\\_fmt=high&\\_orig=search&\\_sort=d&\\_docanchor=&view=c&\\_searchStrId=1429331534&\\_rerunOrigin=google&\\_acct=C000037798&\\_version=1&\\_urlVersion=0&\\_userid=687304&md5=c4794fd386d2f406b4ebc04abb959320](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6TBH-4PC8RC3-2&_user=687304&_coverDate=11%2F30%2F2007&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&_searchStrId=1429331534&_rerunOrigin=google&_acct=C000037798&_version=1&_urlVersion=0&_userid=687304&md5=c4794fd386d2f406b4ebc04abb959320)>. Acesso em: 02 out. 2009. doi: 10.1016/j.plantsci.2007.07.010.