

Protocolo de Micropropagação para as Espécies *Piper hispidinervum* e *P. aduncum*

Introdução

A região Amazônica possui recursos naturais com grande potencial econômico, entre os quais várias plantas produtoras de óleos essenciais. Segundo Machado e Fernandes Júnior (2011), os óleos essenciais são compostos naturais, voláteis e complexos, caracterizados por um forte odor, sendo sintetizados por plantas aromáticas durante o metabolismo secundário. Normalmente extraídos de plantas encontradas em países quentes, como as do mediterrâneo e dos trópicos, apresentam grande potencial terapêutico e farmacológico (EDRIS, 2007).

Os óleos essenciais encontram-se presentes em estruturas especiais de secreção das plantas e podem ser extraídos por arraste de vapor d'água, hidrodestilação, prensagem a frio, solventes orgânicos, alta pressão e por CO₂ supercrítico (OKOH et al., 2010). Dentre as famílias de plantas que produzem essas substâncias, encontram-se as Piperáceas, sendo o gênero *Piper* considerado como o de maior importância, tanto do ponto de vista científico quanto econômico (FAZOLIN et al., 2006).

As espécies *Piper hispidinervum* C.DC. (Figura 1) e *P. aduncum* L. (Figura 2), popularmente conhecidas como pimenta-longa e pimenta-de-macaco, respectivamente, são nativas da Amazônia Ocidental brasileira e têm despertado o interesse de pesquisadores, agricultores e empresários da indústria química devido à composição do óleo essencial extraído, principalmente, de suas folhas e ramos finos.

A espécie *P. hispidinervum* apresenta alto teor de safrol no seu óleo essencial, sendo endêmica do Estado do Acre, onde é encontrada somente no Vale do Acre (SILVA, 1993); já *P. aduncum* se destaca pela presença de dilapiol em seu óleo essencial e pode ser encontrada em diversos estados do Brasil, inclusive no Acre, onde é mais abundante nos Vales do Juruá e Purus (WADT, 2001).

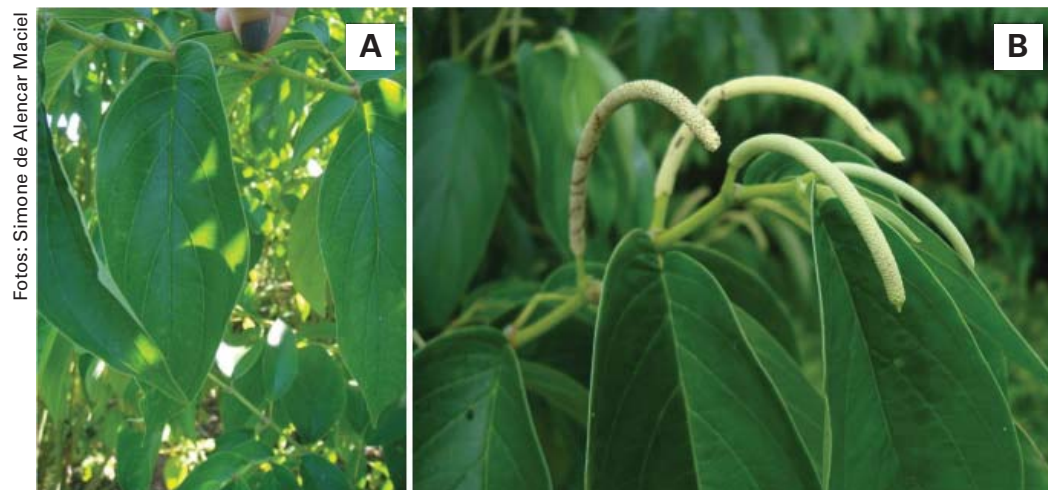


Figura 1. *Piper hispidinervum*: aspecto de folhas (A) e espigas (B) do Banco de Germoplasma da Embrapa Acre.

63

Circular
Técnica

Rio Branco, AC
Setembro, 2012

Autores

Andréa Raposo

Bióloga, D. Sc.,
Embrapa Acre, andrea.
raposo@embrapa.br

Renata Beltrão Teixeira

Engenheira química,
M.Sc., Embrapa Acre,
renata.beltrao@
embrapa.br

Candida Elisa Manfio

Engenheira-agrônoma,
Ph.D., Ufac,
candidamanfio@
gmail.com

Denise Arruda da Silva

Bolsista AT/CNPq,
denise.arruda@
hotmail.com

Nadja Rayad da Silva Moreira

Bolsista Pibic/Embrapa,
nadjarayad@gmail.com

Simone de Alencar Maciel

Engenheira-agrônoma,
M.Sc., simonemacielac
@hotmail.com



Figura 2. *Piper aduncum*: aspecto de folhas (A) e espigas (B) do Banco de Germoplasma da Embrapa Acre.

O safrol é um componente químico aromático empregado nas indústrias químicas como matéria-prima para a síntese de dois derivados: a heliotropina e o butóxido de piperonila. A primeira é usada como componente de fragrâncias em indústrias de cosméticos e perfumarias, e o butóxido de piperonila, como agente sinérgico de inseticidas naturais (piretrium), de ampla utilização nos países industrializados (SILVA et al., 2007), sendo também empregado como precursor de drogas antitrombóticas e auxinas endólicas (ROSA et al., 2000) e como agente sinérgico em produtos veterinários (MENDONÇA, 2007).

O dilapiol é um éter fenílico, responsável por atividades fungicida, inseticida, molusquicida, acaricida, larvicida, nematicida e pelo efeito antibiótico (LOBATO et al., 2007; SILVA, et al., 2007; SOUSA et al., 2008), com grande potencial para exploração nas indústrias química e farmacêutica.

Ambas as espécies podem ser exploradas de forma não destrutiva, haja vista que o óleo é obtido a partir de partes aéreas e ramos finos. Possuem alta capacidade de rebrota, sendo possível realizar diversos cortes ao longo dos anos, caracterizando um sistema de produção não destrutivo e ambientalmente correto, tendo a vantagem em relação a outras culturas de dispensar a necessidade de novos plantios a cada ano (BERGO et al., 2010).

Botanicamente as duas espécies são bem semelhantes, apresentando-se como arbustos com altura de 2 m a 7 m. As diferenças morfológicas se concentram nas características foliares. Do ponto de vista científico, são espécies pouco conhecidas. Enquanto a *P. aduncum* se encontra

em fase de domesticação, a *P. hispidinervum* já possui materiais superiores selecionados, em fase de avaliação em campo experimental (Embrapa Acre), e em poucos anos será lançada sua primeira cultivar aumentando a demanda por mudas.

Dentre as técnicas de cultura de tecidos vegetais, a micropropagação é a mais utilizada, especialmente para mudas em espécies medicinais, ou com algum potencial de interesse econômico, proporcionando a produção de um elevado número de plantas de alta qualidade genética e fitossanitária, em curto espaço de tempo (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Com a crescente demanda para a implantação do cultivo dessas espécies de *Piper*, tem-se como limitação a oferta de mudas em quantidade e qualidade. Portanto, a produção em laboratório por meio da micropropagação é uma alternativa que deverá ser utilizada para multiplicar linhas clonais obtidas a partir de sementes plantadas de matrizes selecionadas e germinadas in vitro. O objetivo deste trabalho é demonstrar passo a passo as etapas de micropropagação dessas espécies.

Metodologia

Este trabalho apresenta o protocolo de cultivo in vitro para as espécies *Piper hispidinervum* e *P. aduncum*, utilizando material oriundo de mudas obtidas por meio da germinação in vitro de sementes.

Os meios de cultura devem ser distribuídos em frascos de vidro transparente com capacidade de 250 mL, do tipo maionese, fechados com tampas plásticas e autoclavados por 15 minutos a 1,1 kgf/cm², em temperatura de 121 °C. Antes da autoclavagem, o pH do meio deve ser ajustado em 5,8. Em todas as fases de cultivo, as culturas devem ser mantidas em sala de crescimento com temperatura controlada de 25 °C ± 2 °C, dispondo de 30 μmol.m².s⁻¹ de irradiância e fotoperíodo de 16 horas de luz.

Etapa 1 – Estabelecimento do cultivo in vitro: germinação e crescimento inicial

As sementes das duas espécies devem ser colocadas em um Becker de 50 mL e então lavadas em água corrente com cinco gotas de detergente por cinco minutos, sendo em seguida submetidas a três lavagens em água destilada e esterilizada. Posteriormente, devem ser conduzidas à câmara de fluxo laminar, onde serão mergulhadas em álcool etílico a 70% (v/v), durante um minuto e, a seguir, imersas em uma solução aquosa de hipoclorito de sódio em que o teor de cloro ativo deve ser de 2,5%, por 30 minutos. Após esse tempo, devem ser lavadas três vezes em água destilada e autoclavada, com o uso de funil e papel de filtro esterilizados (Figura 3).

Foto: Simone de Alencar Maciel

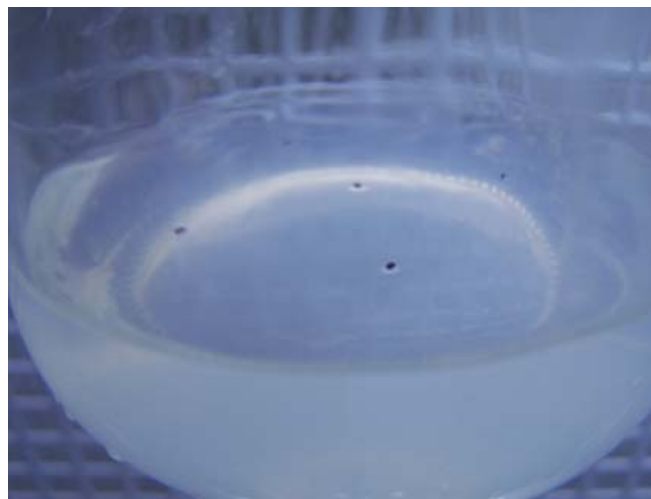


Figura 4. Sementes de *Piper aduncum* inoculadas em meio de cultura MS.

Etapa 2 – Multiplicação in vitro

Após 90 dias de incubação, as plântulas germinadas in vitro (Figura 5) devem ser conduzidas para a câmara de fluxo laminar, onde são retiradas dos frascos com o auxílio de uma pinça longa e colocadas sobre placas de Petri contendo papel esterilizado. Em seguida, com auxílio de bisturi, as folhas e raízes devem ser retiradas e o caule seccionado, de maneira que os entrenós (segmentos nodais), com aproximadamente 2 cm, permaneçam com pelo menos duas gemas axilares.

Devem ser inoculados de quatro a cinco segmentos nodais por frasco de vidro do tipo maionese (250 mL de capacidade), contendo 30 mL de meio de cultura MS, para ambas as espécies, suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose e 7 g.L⁻¹ de ágar. Não é indicada a adição de citocininas para induzir a formação de brotações múltiplas, já que se mostraram tóxicas para essas espécies, promovendo necrose e produção de calos na base dos explantes.

As culturas devem ser mantidas em sala de crescimento e subcultivadas a cada 30 dias, com a renovação do meio de cultura. É possível cultivá-las por até cinco subcultivos sucessivos. O número médio de brotos regenerados por segmento nodal, em cada subcultivo, com a utilização desse protocolo, é de 2,8 brotos/explante para ambas as espécies.

Foto: Simone de Alencar Maciel

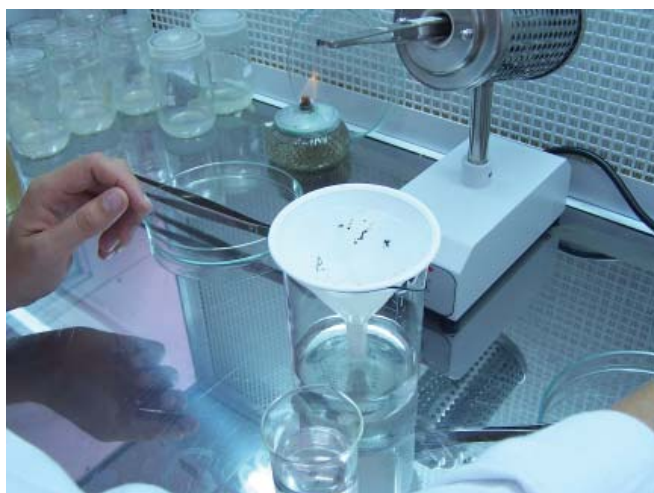


Figura 3. Sementes de *Piper hispidinervum* submetidas à tríplice lavagem com água destilada e autoclavada após desinfestação.

Após esse procedimento, as sementes de ambas as espécies devem ser inoculadas em frascos de vidro do tipo maionese (cinco sementes por frasco), contendo 30 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose e 7 g.L⁻¹ de ágar (a quantidade de ágar pode variar de acordo com o fabricante), onde devem permanecer por 90 dias (Figura 4).

Foto: Simone de Alencar Maciel



Figura 5. Plântulas de *P. hispidinervum* em meio de cultura MS após 90 dias de inoculação.

Etapa 3 – Enraizamento in vitro

Em câmara de fluxo laminar, com o uso de uma pinça longa, os brotos (acima de 5 cm de altura) devem ser retirados dos frascos (Figura 6) e colocados sobre placas de Petri contendo papel esterilizado. Caso ocorra a presença de raízes, devem-se retirá-las com um corte feito na base do explante. Folhas velhas e amareladas também devem ser retiradas. Devem-se inocular quatro a cinco brotos por frasco de vidro do tipo maionese (250 mL de capacidade), contendo 30 mL de meio de cultura MS, suplementado com sacarose (15 g.L⁻¹) e gelificado com ágar (7 g.L⁻¹). As culturas devem permanecer entre 40 e 50 dias em sala de crescimento.

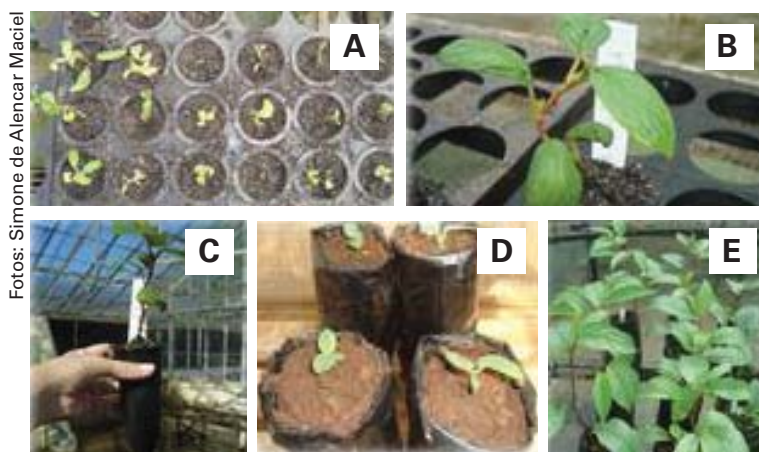
Foto: Simone de Alencar Maciel



Figura 6. Plântulas de *P. hispidinervum* em meio de cultura MS, ao término da etapa de enraizamento, em que a presença de raízes esbranquiçadas e com muitas ramificações indica a formação de um sistema radicular eficiente.

Etapa 4 – Aclimatização

Após 40 a 50 dias, as brotações com raízes devem ser retiradas do meio de enraizamento e lavadas em água corrente para remover o meio de cultura aderido às raízes. Em seguida, conduzidas à casa de vegetação, onde devem ser mantidas em tubetes plásticos (6,5 cm de diâmetro x 14 cm de altura) contendo substrato comercial Plantimax®, suspensas a 0,5 m do solo, sem sombreamento. A irrigação das plantas deve ser feita por nebulização com ajuda de microaspersores, distantes aproximadamente 1,2 m de altura de onde forem acondicionados os tubetes, com vazão nominal de 60 L/H/m², sendo controlados por um temporizador, com umidade relativa em torno de 80% e temperatura média de 30 °C. Após 45 dias, as plantas micropropagadas devem ser transplantadas para sacos plásticos pretos, com capacidade de 2 L, contendo solo argiloso, e transferidas para viveiros com temperatura média de 35 °C, sendo regadas duas vezes ao dia. Nessa etapa espera-se mais de 90% de sobrevivência das mudas. Após 45 dias as mudas com aproximadamente 20 cm de altura podem ir para o campo (Figura 7).



Fotos: Simone de Alencar Maciel

Figura 7. Aclimatização de plântulas de *P. hispidinervum* obtidas in vitro: 1 dia de aclimatização (A); 7 dias de aclimatização (B); 40 dias de aclimatização (C); 45 dias de aclimatização, transplantadas para sacos pretos de 2 L contendo solo argiloso (D); 90 dias de aclimatização, prontas para irem ao campo (E).

Referências

BERGO, C. L. **Estudos agrônômicos e fitoquímicos de *Piper hispidinervum* C.DC. e *Piper aduncum* L. Para produção de safrol e dilapiol.** 2010. 138 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

EDRIS, A. E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 4, p. 308-23, 2007.

FAZOLIN, M.; ESTRELA, J. L. V.; CATANI, V.; COSTA, C. R. **Potencialidades da pimenta-de-macaco (*Piper aduncum* L.): características gerais e resultados de pesquisa.** Rio Branco, AC: Embrapa Acre, 2006. 53 p. (Embrapa Acre. Documentos, 103).

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília, DF: EMBRAPA-SPI: EMBRAPA-CNPQ, 1998. v. 1, p. 183-260.

LOBATO, A. K. S.; SANTOS, D. G. C.; CASTRO, D. S.; TORRES, G. I. O. P. S.; OLIVEIRA, C. F. N.; SILVA, M. H. L. Avaliação dos efeitos da temperatura e da restrição hídrica sobre a germinação de sementes de *Piper aduncum* L. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 297-299, 2007. Suplemento 2.

MACHADO, B. F. M. T.; FERNANDES JÚNIOR, A. Óleos essenciais: aspectos gerais e usos em terapias naturais. **Cadernos Acadêmicos**, v. 3, n. 2, p. 105-127, 2011.

MENDONÇA, R. P. de. **Atividade endectocida de uma nova alternativa terapêutica (scifenotrina, butóxido de piperonila, D-tetrametrina e ivermectina) em cães.** 2007. 91 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal.

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.

OKOH, O. O.; SADIMENKO, A. P.; AFOLAYAN, A. J. Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. **Food Chemistry**, v. 120, n. 1, p. 308-312, May 2010.

ROSA, F. A. F.; NASCIMENTO, M. G.; REBELO, R. A.; PESCADOR, R. Avaliação da atividade regulatória de compostos análogos ao ácido indolacético em sementes de alface. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 23., 2000, Poços de Caldas, MG. **Anais...** Poços de Caldas: SBQ, 2000. v. 2, QB-010.

SILVA, M. H. L. **Tecnologia de cultivo e produção racional de pimenta longa, *Piper hispidinervum* C.DC.** Rio de Janeiro, RJ: UFRJ, 1993. 120 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

SILVA, W. C.; RIBEIRO, J. D.; SOUZA, H. E. M.; CORRÊA, R. S. Atividade inseticida de *Piper aduncum* L. (Piperaceae) sobre *Aetalion* sp. (Hemiptera: Aetalionidae), praga de importância econômica no Amazonas. **Acta Amazonica**, v. 37, n. 2, p. 293-298, 2007.

SOUSA, P. J. C.; BARROS, C. A. L.; ROCHA, J. C. S.; LIRA, D. S.; MONTEIRO, G. M.; MAIA, J. G. S. Avaliação toxicológica do óleo essencial de *Piper aduncum* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 217-221, 2008.

WADT, L. H. de O. **Estrutura genética de populações naturais de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C.DC.) visando seu uso e conservação.** 2001. 95 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade de São Paulo, Piracicaba.

Circular Técnica, 63

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Acre

Endereço: Rodovia BR 364, km 14, sentido Rio Branco/Porto Velho, Caixa Postal 321, Rio Branco, AC, CEP 69900-056

Fone: (68) 3212-3200

Fax: (68) 3212-3284

<http://www.cpacac.embrapa.br>

sac@cpafac.embrapa.br

1ª edição

1ª impressão (2012): 200 exemplares

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



Comitê de publicações

Presidente: Ernestino de Souza Gomes Guarino

Secretária-Executiva: Cláudia Carvalho Sena

Membros: Clarissa Reschke da Cunha, Henrique José Borges de Araujo, José Tadeu de Souza Marinho, Maria de Jesus Barbosa Cavalcante, Maykel Franklin Lima Sales, Moacir Haverroth, Rodrigo Souza Santos, Romeu de Carvalho Andrade Neto, Tatiana de Campos

Expediente

Supervisão editorial: Cláudia C. Sena/Suely M. Melo

Revisão de texto: Cláudia C. Sena/Suely M. Melo

Normalização bibliográfica: Riquelma de S. de Jesus

Tratamento das ilustrações: Bruno Imbroisi

Editoração eletrônica: Bruno Imbroisi