

UNIVERSIDADE TIRADENTES – UNIT
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS - PEP

**OBTENÇÃO DE BROMELINA DE ABACAXI PROPAGADO *IN VITRO*
POR USO DE REGULADORES DE CRESCIMENTO
E ESTRESSE SALINO**

Autora: Jaci Lima Vilanova Neta

Orientadores: Daniel Pereira da Silva, Dr.

Denise Santos Ruzene, Dr.^a

Co-orientadora: Ana da Silva Lédo, Dr.^a

ARACAJU, SE - BRASIL

FEVEREIRO DE 20

OBTENÇÃO DE BROMELINA EM ABACAXI *IN VITRO* EM FUNÇÃO DE
REGULADORES DE CRESCIMENTO E ESTRESSE SALINO

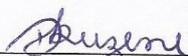
Jaci Lima Vilanova Neta

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA DE PROCESSOS DA UNIVERSIDADE TIRADENTES COMO PARTE
DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
ENGENHARIA DE PROCESSOS

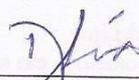
Aprovada por:



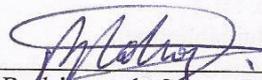
Daniel Pereira da Silva, Dr.
(Orientador)



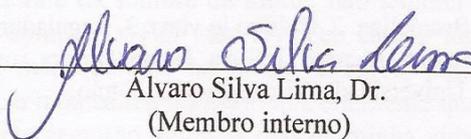
Denise Santos Ruzene, Dr.^a
(Orientadora)



Ana da Silva Lédo, Dr.^a
(Co-orientadora)



Roberto Rodrigues de Souza, Dr.
(Membro externo)



Alvaro Silva Lima, Dr.
(Membro interno)

ARACAJU, SE - BRASIL

FEVEREIRO DE 201

V695o Vilanova Neta, Jaci Lima

Obtenção de bromelina em abacaxi propagado in vitro por uso de reguladores de crescimento e estresse salino. / Jaci Lima Vilanova Neta; orientador : Daniel Pereira da Silva. – Aracaju, 2013.

96 p. : il. ;

Inclui bibliografia.

Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processo). –
Universidade Tiradentes, 2013.

1. Bromelina. 2. Cultivo in vitro. 3. Reguladores. 4. Estresse Salino. 5. Abacaxi. I. Silva, Daniel Pereira. (orient.).
II. Universidade Tiradentes. III. Título

"O Senhor é o meu pastor e nada me faltará. Deita-me em verdes pastos e guia-me mansamente em águas tranqüilas. Refrigera a minha alma, guia-me pelas veredas da justiça, por amor do seu nome. Ainda que eu ande pelo vale da sombra da morte, não temerei mal algum, porque Tu estás comigo, a Tua vara e o Teu cajado me consolam. Prepara-me uma mesa perante os meus inimigos, unges a minha cabeça com óleo, o meu cálice transborda. Certamente que a bondade e a misericórdia me seguirão todos os dias da minha vida e habitarei na casa do SENHOR por longos dias."

Salmo 23

Agradecimentos

Considerando esta dissertação como resultado de uma longa caminhada, agradecer e escolher a quem agradecer não é tarefa fácil, em virtude dos merecedores serem muitos. Assim, para não correr o risco de ser injusta, agradeço previamente a todos que de alguma forma passaram pela minha vida e contribuíram para a construção de quem sou hoje.

No entanto, agradeço, particularmente, a algumas pessoas pela contribuição direta na construção deste trabalho:

Aos meus orientadores Dr.^a Denise Santos Ruzene e Dr. Daniel Pereira da Silva, com os quais partilhei o que era o broto daquilo que veio a ser esse trabalho de dissertação. Obrigada pela liberdade e confiança, além da amizade e compreensão nos mais diversos momentos.

À Dr.^a Ana da Silva Lédo pela co-orientação neste trabalho, pela disponibilidade, atenção e pelas valiosíssimas contribuições.

Ao Dr. Álvaro Silva Lima pela disponibilidade, pelo apoio e empenho em manter a infraestrutura do programa de pós-graduação em engenharia de processos da Universidade Tiradentes.

Aos amigos do Laboratório Cultura de Tecidos de Plantas e do Laboratório de Bioprocessos pela contribuição nos trabalhos de laboratório, especialmente a Dr.^a Aparecida, Inácio, Zilná, Camila, Edmário, Milena, Rodrigo, Moniky e Vanina.

Aos alunos de iniciação científica Márcio e Guilherme pelo apoio na realização dos experimentos.

Aos amigos do mestrado pela atenção e carinho, em especial Glaúcia, Fabi, Roberto, Ana Cláudia, Anderson Alles e Vanessa.

Glaúcia valeu pela força, principalmente, nos momentos finais. Galera muito obrigada por tudo!!!!

À CAPES pelo suporte financeiro concedido durante o período de Mestrado, bem como ao Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP) e a Universidade Tiradentes (UNIT) pela infraestrutura da qual pude usufruir durante esse período.

À EMBRAPA pela disponibilização do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas.

À Biofábrica pela mudas cedidas.

À Adinaldo pela disponibilidade e atenção com que nos atendeu e cedeu mudas de abacaxi pois, só assim esse trabalho pôde ter sido concluído.

Aos meus cunhados, à Valdecir, Dal, D. Ana, Sr. Hamilton e D. Neuza.

Por fim agradeço a Deus, a minha querida mamãe, Nete, ao meu pai (*in memoriam*), as minhas irmãs - Cris, Ró e Su - ao meu bebê lindo – Wagner Emanuel e a Fernando.

Deixei vocês por último, porque sempre deixo o melhor para final, e vocês, sem dúvida alguma, são o melhor da minha vida.

Obrigada Senhor Deus por estar sempre ao meu lado, iluminado e abençoando os meus caminhos e pensamentos; por ter me dado força, coragem e determinação. Toda honra e glória a Ti!

Obrigada mãe, pelo seu apoio irrestrito ao longo de toda a minha vida. Obrigada por acreditar em mim, pelo amor incondicional, pelo carinho, afeto, paciência enfim, o meu sentimento de gratidão é tão grande que não encontro palavras que consigam expressar tamanho sentimento. Tu és a minha fortaleza. Te amo!!!

Obrigada Cris, Ró e Su, pelo amor, atenção, carinho... Obrigada por estarem ao meu lado, sempre. Vocês são um presente de Deus na minha vida, amo muito vocês!

Obrigada Fernando pela paciência, amor, confiança, companheirismo e compreensão nas minhas ausências, falhas e dificuldades, principalmente, nos dias em que estive mais estressada. Obrigada por estar sempre comigo e por me aguentar, sei que não é fácil, rrsrsrs. Te amo!!!

E não podia faltar, claro, um enorme agradecimento ao meu bebezinho que tanto amo, por fazer dos meus dias, mais lindos e brilhantes. Você é muito especial pra mim!

Resumo da Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Processos da Universidade Tiradentes como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Processos.

OBTENÇÃO DE BROMELINA EM ABACAXI *IN VITRO* EM FUNÇÃO DE REGULADORES DE CRESCIMENTO E ESTRESSE SALINO

Jaci Lima Vilanova Neta

O uso industrial de enzimas expandiu-se rapidamente durante as últimas décadas, constituindo-se hoje em um dos grandes mercados a serem explorados. No entanto, devido ao elevado custo das proteases, torna-se essencial a continuidade no desenvolvimento de novas estratégias de produção destas enzimas. Deste modo, a micropropagação constitui uma estratégia de interesse em processo de produção industrial tanto pela grande quantidade de espécies geradas, como pelas inúmeras vantagens existentes. Nesse contexto, a Bromelina, derivada do abacaxi, tem sido considerada uma das melhores proteases vegetais e desperta interesse contínuo dos pesquisadores, especialmente, pelas numerosas aplicações nas indústrias alimentícias e farmacêuticas. Assim, o objetivo desta pesquisa foi verificar a influência de reguladores de crescimento (ANA e BAP) e do estresse salino (NaCl) na atividade da bromelina em plantas de abacaxizeiro (*Ananas comosus L. Merrill*) cv. Pérola cultivadas *in vitro*. Para isto, foram realizados além de experimentos preliminares, experimentos baseados na metodologia de planejamento experimental 2³ com seis pontos axiais e três pontos centrais, análise de variância, diagrama de Pareto e análise de superfície de resposta a fim de avaliar quais variáveis interferem significativamente na atividade da bromelina. Foram avaliados tecidos de folhas e caules, em diferentes concentrações de NaCl para os testes preliminares, sendo que a atividade da bromelina em plantas de abacaxizeiro cv. Pérola mostrou variação em relação aos níveis de salinidade e ao tecido vegetal utilizado, com os níveis mais expressivos de atividade proteolítica da bromelina obtidos em tecidos de caules de abacaxizeiro em meio salino. Os resultados obtidos quando na avaliação de diferentes concentrações de ANA, BAP e NaCl em condições estatísticas, sugere que o balanço adequado dos mesmos ocasiona estresse positivo nas plantas de forma a aumentar a atividade dessa enzima, indicando ainda que o tempo de cultivo e a parte da planta utilizada, são fatores que interferem na atividade da bromelina, sendo o caule aos 90 dias de cultivo direto, quando em comparação ao de 60 dias, o tecido com níveis mais expressivos de atividade, e que ao compararmos as formas de cultivo, direto e subcultivo, à maior atividade da enzima foi encontrada nos experimentos com subcultivo sendo a maior atividade obtida em tecidos de caule.

Palavras-chave: bromelina, cultivo *in vitro*, reguladores, estresse salino, abacaxi.

Abstract of Dissertation presented to the Process Engineering Graduate Program of Universidade Tiradentes as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

PROCESS OF OBTAINING FROM PINEAPPLE BROMELAIN PROPAGATED *IN VITRO* USING PHYTOREGULATORS AND SALT STRESS

Jaci Lima Vilanova Neta

The industrial use of enzymes has expanded rapidly in recent decades, becoming one today in major markets to be explored. However, due to the high cost of the proteases it becomes essential the developing new strategies of producing these enzymes. Thus, the micropropagation is a strategy of interest in industrial production both by the large amount of species generated as the numerous advantages exist. In this context, Bromelain, derived from pineapple, has been considered one of the best vegetables and proteases awakens continued interest of researchers, especially the numerous applications in the food and pharmaceutical industries. The objective of this research was to investigate the influence of growth regulators (ANA and BAP) and salt stress (NaCl) on the activity of bromelain in pineapple plants (*Ananas comosus* L. Merrill) cv. Pérola cultured *in vitro*. For this, besides preliminary experiments, were conducted experiments based on the methodology of experimental design 23 with six axial points and three central points, variance analysis, Pareto diagram and response surface analysis to assess which variables significantly interfere with the activity bromelain. Were evaluated tissues leaves and stems at different NaCl concentrations for preliminary testing, and activity of bromelain in pineapple plants cv. Pérola showed variation in relation to salinity levels and plant tissue used, with the most significant levels of proteolytic activity in tissues obtained from bromelain from pineapple stems in saline. The results obtained when the evaluation of different concentrations of NAA, BAP and NaCl under conditions statistics, suggests that the proper balance of these positive causes stress in plants to increase the activity of this enzyme, further indicating that the time of cultivation and plant part used, are factors that influence the activity of bromelain, being the stem at 90 days direct cultivation when compared to the 60 days, the tissue levels with more expressive activity, and to compare the forms of cultivation, direct and subculture, the highest activity was found in experiments with subculture being the highest activity obtained in stem tissues.

Keywords: bromelain, *in vitro* culture, regulators, salt stress, pineapple.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	01
2. Objetivo Geral.....	03
2.1 Objetivos Específicos.....	03
3. Revisão Bibliográfica.....	04
3.1 Enzimas.....	04
3.1.1 Proteases.....	06
3.2 Bromelina.....	07
3.2.1 Aplicações da bromelina.....	10
3.3 Abacaxi.....	11
3.3.1 Cultivo e Mercado.....	13
3.4 Propagação <i>in vitro</i>	15
3.4.1 Micropropagação de Abacaxizeiro.....	17
3.4.2 Hormônios e Reguladores de Crescimento.....	19
3.4.3 Estresse Salino.....	22
4. Material e Métodos.....	26
4.1 Produção e multiplicação das plantas <i>in vitro</i>	27
4.2 Obtenção da enzima.....	29
4.3 Determinação da proteína total.....	29
4.4 Determinação da atividade enzimática.....	30
4.5 Metodologia aplicada ao estudo da influência de diferentes concentrações de NaCl na atividade da Bromelina obtida de cultivos <i>in vitro</i>	31
4.6 Metodologia estatística aplicada ao estudo da influência de diferentes concentrações de ANA, BAP e NaCl na atividade da bromelina obtida de cultivos <i>in vitro</i>	32
5. Resultados e Discussão.....	34
5.1 Influência de diferentes concentrações de NaCl na atividade da bromelina obtida de mudas de abacaxizeiro cultivadas <i>in vitro</i>	34
5.1.1 Atividade enzimática.....	34
5.1.2 Concentração de proteína total.....	37
5.1.3 Atividade específica.....	39

5.2 Influência de diferentes concentrações de ANA, BAP e NaCl na atividade da bromelina obtida de cultivos <i>in vitro</i>	40
5.2.1 Influência dos reguladores de crescimento e do estresse salino na atividade da bromelina em diferentes tempos de cultivo (60 e 90 dias)...	40
5.2.2 Influência dos reguladores de crescimento e do estresse salino na atividade da bromelina em diferentes cultivos: direto (90 dias) <i>versus</i> subcultivo (60+30) dias.....	68
7. Conclusões.....	82
8. Perspectivas	83
9. Referências Bibliográficas.....	84
Anexos.....	96

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Fruto abacaxi: (a) no campo e (b) em corte.....	11
Figura 2.	Cultivo de abacaxi ou abacaxizal: (a) em fase preliminar de brotamento dos frutos e (b) em fase pré-colheita dos frutos.....	13
Figura 3.	Procedimento de coleta de mudas de abacaxi: (a) abacaxizal em fase de pós-colheita; (b) amostra de filhote rebentão; (c) separação das mudas presentes no filhote rebentão e (d) mudas de filhote rebentão.....	26
Figura 4.	Etapas para inoculação dos explantes (gemas axilares) de abacaxizeiro <i>in vitro</i> : etapas a e b – limpeza da coroa; c – assepsia com NaOCl, álcool 70% e água pura; d – excisão do explante; E e f – inoculação dos explantes.....	28
Figura 5.	Estabelecimento das plantas <i>in vitro</i> : a- primeiros 15 dias sem a presença direta de luz; b – gemas na presença de fotoperíodo; c – intumescimento das gemas; d e e – plantas em desenvolvimento.....	28
Figura 6.	Extrato bruto de caule (fig. 1A, direita) e folha (fig. 1A, esquerda) antes da filtração e após procedimento de filtração (fig. B).....	29
Figura 7.	Fluxograma da metodologia aplicada a multiplicação das plantas <i>in vitro</i>	31
Figura 8.	Fluxograma da metodologia aplicada a multiplicação das plantas <i>in vitro</i>	33
Figura 9.	Plantas micropropagadas em condição de salinidade: a - salinidade moderada sem sintomas de clorose; b - elevado estresse salino (150 e 200 mm NaCl) com sintomas de clorose desenvolvidos.....	36
Figura 10.	Diagrama de pareto dos efeitos absolutos das variáveis independentes manipuladas para a atividade enzimática (U/mL) em tecidos de folha aos 60 dias de cultivo <i>in vitro</i>	49
Figura 11.	Diagrama de pareto dos efeitos absolutos das variáveis independentes manipuladas para a atividade enzimática (U/ml) em tecidos de caule aos 60 dias de cultivo <i>in vitro</i>	50
Figura 12.	Diagrama de pareto dos efeitos absolutos das variáveis independentes manipuladas para a atividade enzimática (U/mL) em tecidos de folha aos 90 dias de cultivo <i>in vitro</i>	51
Figura 13.	Diagrama de pareto dos efeitos absolutos das variáveis independentes manipuladas para a atividade enzimática (U/mL) em tecidos de caule aos 90 dias de cultivo <i>in vitro</i>	52
Figura 14.	Diagrama de pareto dos efeitos absolutos das variáveis independentes manipuladas para a atividade específica (U/mg) em tecidos de folha aos 60 dias de cultivo <i>in vitro</i>	53
Figura 15.	Diagrama de pareto dos efeitos absolutos das variáveis independentes manipuladas para a atividade específica (U/mg) em tecidos de caule aos 60 dias de cultivo <i>in vitro</i>	54
Figura 16.	Diagrama de pareto dos efeitos absolutos das variáveis independentes manipuladas para a atividade específica (U/mg) em tecidos de folha aos 90 dias de cultivo <i>in vitro</i>	55

Figura 17.	Diagrama de pareto dos efeitos absolutos das variáveis independentes manipuladas para a atividade específica (U/mg) em tecidos de caule aos 90 dias de cultivo <i>in vitro</i>	56
Figura 18.	Superfícies de respostas representando os efeitos das diferentes interações entre as variáveis estudadas, e seus efeitos mútuos na atividade enzimática de tecidos de folha de abacaxizeiro aos 60 dias de cultivo <i>in vitro</i> : A - efeito das concentrações de ANA e BAP; B - efeito das concentrações de ANA e NaCl; C - concentrações de BAP e NaCl.....	60
Figura 19.	Superfícies de respostas representando os efeitos das diferentes interações entre as variáveis estudadas, e seus efeitos mútuos na atividade específica em tecidos de folha de abacaxizeiro aos 60 dias de cultivo <i>in vitro</i> : A - efeito das concentrações de ANA e BAP; B - efeito das concentrações de ANA e NaCl; C - concentrações de BAP e NaCl.....	61
Figura 20.	Superfícies de respostas representando os efeitos das diferentes interações entre as variáveis estudadas, e seus efeitos mútuos na atividade enzimática em tecidos de folha de abacaxizeiro aos 90 dias de cultivo <i>in vitro</i> : A - efeito das concentrações de ANA e BAP; B - efeito das concentrações de ANA e NaCl; C - concentrações de BAP e NaCl.....	62
Figura 21.	Superfícies de respostas representando os efeitos das diferentes interações entre as variáveis estudadas, e seus efeitos mútuos na atividade específica em tecidos de folha de abacaxizeiro aos 90 dias de cultivo <i>in vitro</i> : A - efeito das concentrações de ANA e BAP; B - efeito das concentrações de ANA e NaCl; C - concentrações de BAP e NaCl.....	63
Figura 22.	Superfícies de respostas representando os efeitos das diferentes interações entre as variáveis estudadas, e seus efeitos mútuos na atividade enzimática de tecidos de caule de abacaxizeiro aos 60 dias de cultivo <i>in vitro</i> : A - efeito das concentrações de ANA e BAP; B - efeito das concentrações de ANA e NaCl; C - concentrações de BAP e NaCl.....	64
Figura 23.	Superfícies de respostas representando os efeitos das diferentes interações entre as variáveis estudadas, e seus efeitos mútuos na atividade específica de tecidos de caule de abacaxizeiro aos 60 dias de cultivo <i>in vitro</i> : A - efeito das concentrações de ANA e BAP; B - efeito das concentrações de ANA e NaCl; C - concentrações de BAP e NaCl.....	65
Figura 24.	Superfícies de respostas representando os efeitos das diferentes interações entre as variáveis estudadas, e seus efeitos mútuos na atividade enzimática de tecidos de caule de abacaxizeiro aos 90 dias de cultivo <i>in vitro</i> : A - efeito das concentrações de ANA e BAP; B - efeito das concentrações de ANA e NaCl; C - concentrações de BAP e NaCl.....	66
Figura 25.	Superfícies de respostas representando os efeitos das diferentes interações entre as variáveis estudadas, e seus efeitos mútuos na atividade específica de tecidos de caule de abacaxizeiro aos 90 dias de cultivo <i>in vitro</i> : A - efeito das concentrações de ANA e BAP; B - efeito das concentrações de ANA e NaCl; C - concentrações de BAP e NaCl.....	67
Figura 26.	Diagrama de pareto dos efeitos absolutos das variáveis independentes manipuladas para a atividade enzimática (U/mL) em tecidos de folha aos 30 dias de subcultivo <i>in vitro</i>	73
Figura 27.	Diagrama de pareto dos efeitos absolutos das variáveis independentes manipuladas para a atividade enzimática (U/mL) em tecidos de caule aos 30 dias de subcultivo <i>in vitro</i>	74

Figura 28.	Diagrama de pareto dos efeitos absolutos das variáveis independentes manipuladas para a atividade específica (U/mg) em tecidos de folha aos 30 dias de subcultivo <i>in vitro</i>	75
Figura 29.	Diagrama de pareto dos efeitos absolutos das variáveis independentes manipuladas para a atividade específica (U/mg) em tecidos de caule aos 30 dias de subcultivo <i>in vitro</i>	76
Figura 30.	Superfícies de respostas representando os efeitos das diferentes interações entre as variáveis estudadas, e seus efeitos mútuos na atividade enzimática em tecidos de folha de abacaxizeiro aos 30 dias de sub cultivo <i>in vitro</i> a partir dos 60 dias: A - efeito das concentrações de ANA e BAP; B - efeito das concentrações de ANA e NaCl; C - concentrações de BAP e NaCl.....	78
Figura 31.	Superfícies de respostas representando os efeitos das diferentes interações entre as variáveis estudadas, e seus efeitos mútuos na atividade específica em tecidos de folha de abacaxizeiro aos 30 dias de sub cultivo <i>in vitro</i> a partir dos 60 dias: A - efeito das concentrações de ANA e BAP; B - efeito das concentrações de ANA e NaCl; C - concentrações de BAP e NaCl.....	79
Figura 32.	Superfícies de respostas representando os efeitos das diferentes interações entre as variáveis estudadas, e seus efeitos mútuos na atividade enzimática de tecidos de caule de abacaxizeiro aos 60 dias de cultivo <i>in vitro</i> : A - efeito das concentrações de ANA e BAP; B - efeito das concentrações de ANA e NaCl; C - concentrações de BAP e NaCl.....	80
Figura 33.	Superfícies de respostas representando os efeitos das diferentes interações entre as variáveis estudadas, e seus efeitos mútuos na atividade específica de tecidos de caule de abacaxizeiro aos 60 dias de cultivo <i>in vitro</i> : A - efeito das concentrações de ANA e BAP; B - efeito das concentrações de ANA e NaCl; C - concentrações de BAP e NaCl.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Proteases vegetais comercialmente disponíveis	07
Tabela 2.	Planejamento fatorial 2 ³ das variáveis ANA, BAP e NaCl para atividade enzimática e específica da bromelina.....	33
Tabela 3.	Atividade enzimática da bromelina (U/mL) obtidas em folhas e caules de abacaxi cv. Pérola produzidas <i>in vitro</i>	35
Tabela 4.	Concentração de proteína total (U/g) em folhas e caules de abacaxi cv. Pérola produzidas <i>in vitro</i>	37
Tabela 5.	Atividade específica (U/mg) da bromelina em folhas e caules de abacaxi cv. Pérola produzidas <i>in vitro</i>	39
Tabela 6.	Matriz do planejamento fatorial 2 ³ (valores codificados e reais) com respostas da atividade enzimática e específica, aos 60 dias de cultivo <i>in vitro</i> em tecidos de folha de abacaxizeiro.....	42
Tabela 7.	Matriz do planejamento fatorial 2 ³ (valores codificados e reais) com respostas da atividade enzimática e específica, aos 90 dias de cultivo <i>in vitro</i> em tecidos de folha de abacaxizeiro.....	43
Tabela 8.	Matriz do planejamento fatorial 2 ³ (valores codificados e reais) com respostas da atividade enzimática e específica, aos 60 dias de cultivo <i>in vitro</i> em tecidos de caule de abacaxizeiro.....	44
Tabela 9.	Matriz do planejamento fatorial 2 ³ (valores codificados e reais) com respostas da atividade enzimática e específica, aos 90 dias de cultivo <i>in vitro</i> em tecidos de caule de abacaxizeiro.....	45
Tabela 10.	ANOVA para atividade enzimática (U/mL) em tecidos de folha aos 60 dias de cultivo <i>in vitro</i>	49
Tabela 11.	ANOVA para atividade enzimática (U/mL) em tecidos de caule aos 60 dias de cultivo <i>in vitro</i>	50
Tabela 12.	ANOVA para atividade enzimática (U/mL) em tecidos de folha aos 90 dias de cultivo <i>in vitro</i>	51
Tabela 13.	ANOVA para atividade enzimática (U/mL) em tecidos de caule aos 90 dias de cultivo <i>in vitro</i>	52
Tabela 14.	ANOVA para a atividade específica (U/mg) em tecidos de folha aos 60 dias de cultivo <i>in vitro</i>	53
Tabela 15.	ANOVA para a atividade específica (U/mg) em tecidos de caule aos 60 dias de cultivo <i>in vitro</i>	54
Tabela 16.	ANOVA para a atividade específica (U/mg) em tecidos de folha aos 90 dias de cultivo <i>in vitro</i>	55
Tabela 17.	ANOVA para a atividade específica (U/mg) em tecidos de caule aos 90 dias de cultivo <i>in vitro</i>	56

Tabela 18.	Matriz do planejamento fatorial 23 (valores codificados e reais) com respostas da atividade enzimática e específica, aos 30 dias de subcultivo <i>in vitro</i> em tecidos de folha de abacaxizeiro.....	70
Tabela 19.	Matriz do planejamento fatorial 23 (valores codificados e reais) com respostas da atividade enzimática e específica, aos 30 dias de subcultivo <i>in vitro</i> em tecidos de caule de abacaxizeiro.....	71
Tabela 20.	ANOVA para atividade enzimática (U/mL) em tecidos de folha aos 30 dias de subcultivo <i>in vitro</i>	73
Tabela 21.	ANOVA para atividade enzimática (U/mL) em tecidos de caule aos 30 dias de subcultivo <i>in vitro</i>	74
Tabela 22.	ANOVA para atividade específica (U/mg) em tecidos de folha aos 30 dias de subcultivo <i>in vitro</i>	75
Tabela 23.	ANOVA para atividade específica (U/mg) em tecidos de caule aos 30 dias de subcultivo <i>in vitro</i>	76

Capítulo 1

1. INTRODUÇÃO

O uso industrial de enzimas, proteínas com capacidade de catalisar reações, expandiu-se rapidamente, constituindo-se hoje em um dos grandes mercados a serem explorados. Neste sentido, na atualidade, as vendas de enzimas proteolíticas são responsáveis por mais de 60% das vendas totais destes tipos de produtos bioquímicos (CORZO *et al.*, 2011), indicando a grande importância das proteases enquanto grupo de enzimas industriais.

O uso crescente desses catalisadores em processos industriais deve-se não somente à sua característica de alta sensibilidade e especificidade de suas reações químicas, mas também ao avanço de tecnologia envolvida em sua produção. Deste modo, nas últimas décadas, o interesse por proteases de plantas tem aumentado significativamente.

Assim, relacionando com o escopo deste trabalho, a bromelina, enzima alvo e de interesse nesta pesquisa, pode ser considerada como uma das melhores proteases vegetais. O interesse contínuo por bromelina deve-se em especial às suas numerosas aplicações nas indústrias alimentícia e farmacêutica, atuando, por exemplo, na modulação do crescimento tumoral, na melhoria da ação dos antibióticos, no tratamento sistêmico da inflamação, e no processamento de alimentos para amaciamento da carne, sendo considerada como um dos suplementos mais populares em países europeus. Extraída do abacaxi, a bromelina está presente tanto no fruto como na planta, principalmente no caule de onde geralmente é extraída para ser utilizada comercialmente, contudo pode ser também encontrada nos resíduos do fruto, como casca e folhas.

Dado ao elevado custo das proteases, o estudo e desenvolvimento de novas estratégias para produzir compostos homogêneos com caráter estrutural e funcional devem ser continuados visando facilitar a relação custo/benefício junto aos diferentes processos, e desta forma aumentar a aplicabilidade industrial destas enzimas. Nesse sentido, a cultura de tecidos de plantas pode ser utilizada como uma alternativa promissora para a melhoria da produção de material vegetal (células, tecidos, órgãos ou plantas inteiras), para posterior uso deste material vegetal como fonte primária de enzimas.

Assim, desde o início da década de 70, a técnica de micropropagação vem constituindo uma estratégia de interesse em função de suas potencialidades e de resultados

apresentados para um grande número de espécies vegetais, tornando-se aplicável em processo de produção industrial não somente por ser um procedimento significativo na multiplicação de diferentes espécies, mas também por esta ser de importância econômica ao conjunto produtivo (ARAÚJO *et al.*, 2002).

Existem vantagens potenciais da utilização de cultura de tecidos de plantas, tais como a possibilidade de obtenção de novas mudas com teores elevados de enzimas industrialmente importantes, a independência de fatores ambientais, incluindo o tempo, pragas, doenças e limitações geográficas, além da possibilidade de operação contínua. Nesse âmbito, existe ainda o grau relativo de controle sobre a cultura, o que permite que os níveis de produção possam ser ajustados de acordo com as exigências do mercado, tornando-se uma alternativa atraente como primeiro passo na obtenção mais eficiente de biomoléculas (GOTTSCHALK, 2011; GUEVEN *et al.*, 2011; ONAY *et al.*, 2011).

Dentro deste contexto, o estudo das respostas das plantas ao estresse abiótico e os mecanismos de tolerância ao estresse é um campo muito ativo na investigação em biologia vegetal, não só devido ao seu inquestionável interesse acadêmico, mas também devido às condições de estresses abióticos (sobretudo estiagem e salinidade dos solos) ser as principais causas de redução das colheitas em todo o mundo (BOSCAIU, 2011). Além disso, pesquisas sobre a utilização de substâncias reguladoras do crescimento na agricultura também têm sido realizadas em todo o mundo, de modo que novos mecanismos de controle hormonal sobre o crescimento e desenvolvimento vegetal têm sido descobertos. Entretanto, com o avanço dos estudos, tem-se verificado a existência de um grande número de compostos que podem provocar alterações nas plantas, sendo que, em muitos casos, o efeito fisiológico proporcionado está relacionado com fatores ainda desconhecidos. Assim sendo, torna-se necessário que cada vez mais pesquisas sejam realizadas no intuito de tentar desvendar, não somente os mecanismos de ação destas substâncias, como também os diferentes efeitos causados por estas.

Assim, o objetivo deste trabalho foi centrado em estudos relacionados à influência de reguladores de crescimento e do estresse salino em relação à atividade enzimática da enzima bromelina em mudas de abacaxi Pérola cultivadas *in vitro*, visto em especial serem fatores comuns aplicáveis ou existentes em cultivos de abacaxizeiro presentes em regiões tropicais e litorâneas como as existentes no estado de Sergipe, estado brasileiro de grande cultivo e interesse econômico e social por esta cultura.

Capítulo 2

2. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi o de avaliar a influência das diferentes concentrações dos reguladores de crescimento, ácido naftalenoacético (ANA) e benzilaminopurina (BAP), e do cloreto de sódio (estresse salino, NaCl) em relação à atividade enzimática da enzima bromelina em mudas de abacaxi cultivadas *in vitro*.

2.1 Objetivos específicos

Os objetivos específicos foram:

- Avaliar a influência do estresse salino na atividade da bromelina em plantas de abacaxizeiro cv. Pérola cultivadas *in vitro* em diferentes níveis de salinidade aos 60 dias de cultivo;
- Avaliar estatisticamente, por uso de planejamento experimental, a influência de concentração dos reguladores de crescimento (ANA e BAP) e do estresse salino (NaCl) na atividade da enzima bromelina em plantas de abacaxizeiro *Ananas comosus* cultivar Pérola aos 60 e 90 dias de cultivo *in vitro*;
- Avaliar estatisticamente, por uso de planejamento experimental, a influência de um subcultivo realizado aos 60 dias dentro de um período total de 90 dias na atividade da bromelina submetido a reguladores de crescimento e estresse salino em plantas de abacaxizeiro *Ananas Comosus* cultivar Pérola;
- Comparar os resultados de comportamentos da atividade enzimática obtidos em diferentes tempos de cultivo *in vitro* (60 e 90 dias), bem como em condições de cultivo direto aos 90 dias com aquele de subcultivo aos 60 dias dentro de um período total de 90 dias, dados estes correspondentes aos planejamentos fatoriais realizados.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Abaixo é apresentado o estado-da-arte referente ao tema alvo deste trabalho. Para isso, inicialmente é apresentado uma revisão bibliográfica referente às enzimas, com descrição mais pormenorizada da protease bromelina bem como suas aplicações. Posteriormente, é apresentado com base em pesquisa bibliográfica informações sobre a espécie *Ananas comosus*, o cultivo de abacaxi, passando por cultura de tecidos de plantas, em especial relacionado à cultura do abacaxi, finalizando com a descrição de certas variáveis relacionada à técnica de micropropagação *in vitro*.

3.1 Enzimas

Envolvidas em todos os processos biológicos, as enzimas, produzidas dentro das células dos organismos vivos, auxiliam de um modo geral processos como a digestão, o processamento de nutrientes, a produção de energia, além de diversas outras funções metabólicas indispensáveis ao bom funcionamento celular. São moléculas orgânicas presentes nas células de todos os organismos vivos, com a função específica de catalisar reações químicas (KIELING, 2002).

De acordo com Lehninger *et al.* (2002), a maioria das moléculas biológicas é muito estável no ambiente aquoso em pH neutro e temperatura moderada encontrado no interior das células. Muitas reações bioquímicas comuns envolvem eventos químicos que são demasiadamente improváveis nas condições do ambiente celular, como a formação transiente de intermediários eletricamente carregados e instáveis, ou a colisão de duas ou mais moléculas com a orientação precisa e necessária para que ocorra a reação.

Deste modo, praticamente todas as reações químicas que se processam nos organismos são catalisadas. A catálise das reações biológicas é imprescindível para a conservação e reprodução dos seres vivos, uma vez que a maioria das reações químicas que ocorrem nos organismos tem, na ausência de catalisadores, velocidades muito baixas (TORRES, 2001).

Neste sentido, as enzimas, por atuarem como catalisadores, aumentam a velocidade das reações. Entretanto, as enzimas são catalisadores extremamente eficazes nas reações biológicas, o que significa que aumentam a velocidade da reação sem, no entanto, deixarem-se afetar pela reação propriamente dita. Deste modo, nos estágios intermediários da reação, a enzima liga-se à molécula que está sendo transformada e, à medida que o produto vai sendo liberado, a enzima é regenerada na sua forma original (SAID e PIETRO, 2002; SBRUZZY, 2010).

De uma forma geral, as enzimas são encontradas em todas as partes das células, uma vez que são fundamentais sob todos os aspectos da estrutura e função celulares. São extraídas de micro-organismos, plantas ou tecidos animais e subdividem-se em categorias de acordo com os compostos sobre os quais agem ou com o tipo de reação que controlam (SBRUZZY, 2010). Neste sentido, é de se prever a existência de muitas espécies diferentes de enzimas, sendo cada enzima especializada em determinada função biológica (LOPES, 2009; SBRUZZY, 2010).

Atualmente são comercialmente importantes, principalmente nas indústrias farmacêuticas e alimentícias, uma vez que a maior parte das enzimas produzidas industrialmente tem aplicação na produção, conservação e modificação de produtos de origem animal e vegetal (em especial os alimentos), na produção de medicamentos (vitaminas e hormônios) e na produção de derivados de matérias primas animais e vegetais. Em todos os casos de aplicação citados, trata-se fundamentalmente de imitar tecnologicamente o que é feito na natureza, embora em escala condicionada à necessidade e à vontade do homem (KIELING, 2002).

Assim, o uso cada vez maior de enzimas em aplicações industriais, medicamentos e análises clínicas é uma tendência em todo o mundo uma vez que, seu uso como catalisador de processos industriais, possibilita a obtenção de produtos com maior valor agregado em sintonia com as demandas de caráter tecnológico, de mercado e de preservação ambiental, que norteiam os processos produtivos internacionalmente (BON *et al.*, 2008)

Além disso, as enzimas são utilizadas como biocatalisadores em química orgânica como uma alternativa aos processos químicos clássicos por apresentarem inúmeras vantagens, dentre estas se destacam: a elevada velocidade de reação; utilização de condições brandas; compatibilidade com substratos sintéticos; em alguns casos podem catalisar as reações nos dois sentidos e podem, ainda, apresentar alguma seletividade quanto ao tipo de reação que catalisam. Em medicamentos, a grande eficiência das enzimas aliada à sua especificidade, tornam-nas, a princípio, agentes de grande potencial para uso terapêutico (GODOI, 2007).

Entretanto, deve-se levar em conta os aspectos como especificidade, pH ótimo, temperatura de estabilidade, presença de ativadores ou inibidores, preço e viabilidade. Para aplicações terapêuticas, principalmente para uso interno, a enzima precisa ter um elenco de características bem apropriado tais como: alta atividade e estabilidade em pH fisiológico, baixa resposta imunológica e alta afinidade pelo substrato (GODOI, 2007).

Os vegetais como fontes de enzimas têm limitação no fato de que relativamente pouca enzima pode ser extraída de uma grande massa vegetal; o que somente torna-se econômico onde a mão de obra e terra para o plantio possuem custo menor. São poucas as enzimas que podem ser obtidas economicamente nestas condições, entre elas pode ser indicada as proteinases bromelina, ficina e papaína (KIELING, 2002).

3.1.1 Proteases

As proteases, de modo específico, são enzimas que hidrolisam as ligações peptídicas em proteínas e, a partir do ponto de vista da indústria, são o tipo mais importante de enzimas por representam cerca de 60% de todas as enzimas comercializadas no mundo. Os campos de aplicação são muito diversos, incluindo a ciência e tecnologia de alimentos, indústria farmacêutica e fabricação de detergentes (FEIJOO-SIOTA *et al.*, 2011). Entretanto, o número de proteases industrialmente utilizadas de origem vegetal ainda é pequeno (AEHLE, 2007).

Proteases de plantas foram utilizadas em tempos antigos como ilustrado nos escritos homéricos, indicando que o látex da figueira pode ser utilizado para a coagulação do leite e fabricação do queijo. Assim, uma vez que a aplicação industrial de enzimas requer baixo custo na sua obtenção, em especial quando em grande escala, as enzimas de plantas foram ao longo do tempo substituídas pelas de origem microbiana. Entretanto, nos últimos anos, as proteases de plantas vêm sendo o objeto de uma atenção renovada da indústria farmacêutica e da biotecnologia (HEINICKE e GORTNER, 1957), não somente pela atividade proteolítica de uma grande variedade de proteínas, mas também pelo fato de muitas vezes elas serem ativas sobre uma gama de temperaturas e pHs (DUBEY *et al.*, 2007). A Tabela 1 apresenta exemplos de proteases de plantas comercialmente disponível.

Assim, toda esta preocupação têm estimulado pesquisas e aumentado o número de trabalhos sobre proteases vegetais. Recentes desenvolvimentos biotecnológicos e, principalmente, a engenharia de proteínas se certificará do aparecimento, em um futuro próximo, de proteases de plantas com maiores e melhores propriedades industriais (FEIJOO-SIOTA *et al.*, 2011).

Tabela 1. Proteases vegetais comercialmente disponíveis

Enzima	Número CAS*	Fonte	Fornecedores	Forma física
Papaína	9001-73-4	Látex da papaína	Sigma, MP Biomedicals, Sisco Research Laboratories, Beta Pharma, Pierce Biotechnology, Worthington Biochemical Corporation, Enzyme Development Corporation	Cristalizada, papaína agarose, suspensão aquosa tamponada, pó liofilizado e pó bruto
Quimopapaína	9001-09-6	Látex da papaína	Sigma, 3B Scientific Corporation	Pó liofilizado e pó solúvel
Ficina	9001-33-6	Látex da Figueira	Sigma, Pfaltz & Bauer, Enzyme Development Corporation	Suspensão salina, pó liofilizado e agarose de ficina
Bromelina	9001-00-7	Caule do Abacaxi	Sigma, MP Biomedicals, Pfaltz & Bauer, Beta Pharma, Enzyme Development Corporation	Pó liofilizado
Actinidina	39279-27-1	Kiwi	Biochem Europe	Pó
Cucumisina	82062-89-3	Sarcocarp de melão	Sigma	Pó liofilizado

Fonte: adaptado de Feijoo-Siota *et al.* (2011)

* CAS: registro único no banco de dados do Chemical Abstract Service (Chemical American Society).

3.2 Bromelina

Atualmente, bromelina é o nome genérico dado ao conjunto de enzimas proteolíticas encontradas nos vegetais da família Bromeliaceae da qual o abacaxizeiro é a espécie mais conhecida (PIZA *et al.*, 2002; KUMAR, 2011; DOKO, 1991; DEVAKATE, 2009). É um extrato bruto aquoso dos caules e frutos imaturos de abacaxi (AMID *et al.*, 2011), constituindo uma mistura complexa de diferentes tiol-endopeptidases e outros componentes ainda não completamente caracterizados tais como, fosfatases, glicosidases, peroxidases, celulases, glicoproteínas, carboidratos, entre outros (MAURER, 2001).

De um modo geral, proteases constituem os principais componentes da bromelina e incluem bromelina do talo (80%), bromelina da fruta (10%), e ananás (5%) (CHOBOTOVA, 2010). Deste modo, atualmente dois tipos distintos de bromelina do abacaxi são reconhecidos: as enzimas proteolíticas encontradas no talo ou na casca chamadas bromelina do talo (E.C. 3.4.22.32) e as encontradas no fruto, bromelina do fruto (E.C. 3.4.22.33), anteriormente chamada bromelina (RAVINDRA BABU *et al.*, 2008; BENUCCI *et al.*, 2011).

O isolamento e estudo de enzimas a partir de frutos de abacaxi têm sido investigados desde o final do século XIX, enquanto a extração e purificação da bromelina do abacaxi natural tem sido investigado de forma mais recente (DOKO *et al.*, 1991; HEMAVATHI *et al.*, 2007; KUMAR *et al.*, 2011; MAZZOLA *et al.*, 2008; RABELO *et al.*, 2004; RAVINDRA BABU *et al.*, 2008; UMESH HEBBAR *et al.*, 2007).

A bromelina é notavelmente estável ao calor, mantendo atividade proteolítica entre 40 e 60°C na qual a maioria das enzimas são desnaturadas. Além disso, e novamente contrariamente a maioria das enzimas, a bromelina possui um vasto leque de atividade em ambas as condições ácidas e alcalinas, permitindo a manutenção da atividade numa variedade de ambientes biológicos (BHATTACHARYA *et al.*, 2009).

De acordo com Bennuci *et al.* (2008), a bromelina do talo é um membro da família das proteases de cisteína, um grupo de enzimas que depende do grupo tiol (SH) de um resíduo de cisteína para a sua atividade, ou seja, é uma enzima sulfidrílica, essencial para a atividade proteolítica. Enquanto que a bromelina do fruto é uma proteína ácida com pH 4,6, apresentando mudanças conformacionais irreversíveis ocorrendo em valores de pH maiores que 10,3 (MURACHI, 1976).

Em relação a sua origem, a bromelina não está presente nos primeiros estágios de desenvolvimento do fruto, porém, seu nível aumenta rapidamente, mantendo-se elevado até o amadurecimento, sendo essa uma das vantagens da utilização das proteases do abacaxi em comparação com outras proteases vegetais (CESAR, 2005). O autor afirma que apesar da diminuição da atividade proteolítica durante a maturação, o abacaxi é o único fruto que possui concentrações relativamente altas de proteases no estado maduro. No mamão e no figo, tanto a papaína como a ficina, somente são encontradas em altos níveis quando o fruto está verde; com o completo amadurecimento, a concentração de proteases praticamente desaparece.

Para obtenção da bromelina, podem ser utilizadas diferentes partes do abacaxi: folhas, talos, polpa da fruta, cascas e resíduos industriais do processamento do fruto (SRIWATANAPONGSE *et al.*, 2000; AYALA-ZAVALA *et al.*, 2011).

A forma da bromelina comercialmente encontrada é a obtida do talo, apesar da grande quantidade de resíduos do abacaxi provenientes das indústrias de conservas (CESAR, 2005; KILIKIAN e PESSOA-JR, 2005). Para isso, são necessários etapas de moagem, prensagem, filtração e precipitação do suco, onde muitos precipitantes clássicos podem ser usados na preparação da enzima bruta ou no fracionamento, tais como: sulfato de amônio, metanol, isopropanol e acetona, combinados com variações do pH do suco. Contudo, no caso da preparação industrial da bromelina, a acetona é o precipitante mais conveniente (BALDINI *et al.*, 1993). Deste modo, a acetona é adicionada ao suco do talo em dois estágios: i. quando um ou dois volumes de acetona são adicionados a dois volumes de suco de caule de abacaxi, o precipitado formado tem baixa atividade enzimática, cor turva e baixa estabilidade, sendo descartado; ii. a adição de um outro volume de acetona precipita as principais frações enzimáticas, sendo coletadas através de centrifugação, e posteriormente secas. O pó seco é a enzima do talo. A acetona é recuperada, destilando-se o sobrenadante resultante da centrifugação (PARK, 2001).

Segundo Heinicke e Gortner (1957), a bromelina do talo preparada pela precipitação com acetona é uma mistura de muitos colóides, sais inorgânicos e materiais orgânicos simples, que também são precipitados pela acetona. Os autores relatam que a proteína bruta geralmente corresponde a cerca de 50% do total do peso do precipitado desidratado; materiais inorgânicos, principalmente cátions, geralmente correspondem a 10 a 15% do peso total, sendo o restante carboidratos complexos de natureza poliuronídica e glicosídica.

Rowan *et al.* (1990) afirmam a existência de quatro proteases principais presentes no abacaxi *Ananas comosus*: i. bromelina do fruto; ii. bromelina do caule; iii. Ananaína; e iv. comasaína. A bromelina do fruto tem uma atividade proteolítica maior que a bromelina do caule em diversos substratos protéicos e sua atividade é máxima em pH 8,0 na temperatura de 70°C; no caule apresenta atividade máxima a 60°C em pH 7,0 (CESAR, 2005). Em estudos realizados por Lima e Romanelli (1977) a bromelina oriunda de caules de abacaxi da cultivar Pérola mostrou-se estável em uma faixa de pH entre 3,0 e 8,0, sendo que seu pH ótimo de atividade sobre a caseína se situou entre 6,0 e 7,0.

Análises de proteína total, açúcares redutores e atividade enzimática em amostras preparadas da polpa do fruto, da casca e do talo para a caracterização do meio inicial foram realizadas por César (1999). O autor relata que o fruto e o caule apresentam o mesmo teor de proteína total, porém o caule apresenta cerca de 60% menor quantidade de enzimas proteolíticas. Por meio da precipitação em um estágio com 80% (v/v) de etanol a 5°C, foi possível recuperar praticamente toda a enzima originalmente presente, aumentando de 3 a 5

vezes a atividade específica inicial.

Nos tecidos do caule, cultivados em condições de campo, a cultivar Vitória teve semelhança com a cultivar Smooth Cayenne em termos protéicos e enzimáticos. Em iguais condições de cultivo, a cultivar Pérola apresentou maior atividade proteolítica (COSTA *et al.*, 2007).

Ketnawa *et al.* (2012) estudaram o isolamento e a caracterização de extrato de bromelina a partir dos resíduos de cultivares de abacaxi Nang Lae e Phu Lae (frutos da província de Chiang Rai, na Tailândia) em porções de resíduos, tais como casca, núcleo, caule e coroa de 29-40%, 9-10%, 2-5% e 2-4% (em peso), respectivamente, e observaram que o extrato da coroa a partir de ambas as cultivares deu a atividade proteolítica e teores de proteínas mais elevada, enquanto que o extrato do caule exibiu os valores mais baixos. Neste sentido, a atividade proteolítica é o principal parâmetro de avaliação da qualidade e do valor comercial da bromelina (MEINIG, 1999; PIZA *et al.*, 2002; HALE *et al.*, 2005).

3.2.1 Aplicações da Bromelina

Apesar da importância econômica da bromelina estar relacionada, principalmente, com a indústria alimentícia, há relatos que indicam que atualmente esta não se apresenta como um mercado atrativo para utilização desta enzima, uma vez que, a papaína, enzima obtida do mamão, vem sendo largamente utilizada no amaciamento de carnes. Além disso, a indústria de cervejas, nas quais a bromelina também poderia ser utilizada como clarificante, aboliu a utilização da mesma, alegando esta enzima produzir resíduos de difícil retirada dos tanques de armazenagem do produto. Assim, nos dias atuais, o uso principal da bromelina está concentrado na indústria farmacêutica, um dos setores industriais de maior investimento tecnológico e de inovação (GODOI, 2007).

Neste contexto, a bromelina foi reconhecida como agente medicinal em 1957 e, vem sendo amplamente estudada desde então (FILETI *et al.*, 2009; FERREIRA *et al.*, 2011). A ação da bromelina inclui: inibição da agregação plaquetária, atividade fibrinolítica, ação antiinflamatória, ação antitumoral, modulação de citocinas e imunidade, aumento da absorção de outras drogas, propriedades mucolíticas, facilitador da digestão, acelerador da cicatrização, melhora da circulação e sistema cardiovascular. Além disso, esta enzima é bem absorvida por via oral havendo evidências que indicam que sua atividade terapêutica aumenta com as doses mais altas. Apesar de todos os seus mecanismos de ação ainda não estarem totalmente esclarecidos, foi demonstrado que é um seguro e efetivo suplemento. A bromelina parece

possuir tanto ação direta quanto indireta, envolvendo outros sistemas enzimáticos, ao exercer seus efeitos antiinflamatórios (MYNOTT *et al.*, 1999; MAURER, 2001; CORZO *et al.*, 2011; KUMAR *et al.*, 2011). Além disso, esta enzima também vem sendo utilizada no desbridamento de tecidos necróticos enzimáticos a partir de úlceras e feridas de queimaduras e no tratamento médico de pacientes oncológicos (KALRA *et al.*, 2008).

MAURER (2001) efetuou estudos com talos e frutos de abacaxi e comprovou que estão presentes, entre outros componentes, várias proteinases, demonstrou *in vitro* e *in vivo* atividades anti-inflamatórias, antiedemas e antitromboses. Salas et al (2008) analisaram a atividade farmacológica de proteases de cisteína da planta, enfatizando seu papel na cicatrização de feridas em mamíferos, imunomodulação, problemas digestivos e alterações neoplásicas. Além disso, evidências indicam que a bromelina pode ser uma candidata promissora para o desenvolvimento de futuros tratamentos oral para pacientes oncológicos (CHOBOTOVA *et al.*, 2010).

3.3 Abacaxi

O abacaxi (Figura 1) (*Ananas comosus* L.) é uma fruta das regiões tropicais e subtropicais (JACOBS *et al.*, 2010; DI CAGNO *et al.*, 2010), consumido em todo o mundo, tanto ao natural quanto na forma de produtos industrializados (CORZO *et al.*, 2011; ABÍLIO *et al.*, 2009). Dentre as principais fruteiras tropicais, o abacaxi ocupa lugar de destaque no cenário mundial com os principais produtores mundiais dessa frutífera, em 2011, sendo: Tailândia, Brasil, Costa Rica, Filipinas e China (FAO, 2013).



Figura 1. Fruto abacaxi: (a) no campo (b) em corte.

Fonte: <http://www.imchef.org/por-que-la-pina-hace-que-la-gelatina-no-cuaje/>

Considerada como principal fonte da enzima bromelina, um produto de alto valor comercial que não é produzido no Brasil, diferentes partes do abacaxi podem ser usadas como matéria-prima para a obtenção desta enzima: folhas, caules, polpa da fruta, cascas e resíduos industriais do processamento do fruto (BON *et al.*, 2008). A polpa em calda e o suco pasteurizado são os principais produtos industrializados (LOPES *et al.*, 2005).

Entretanto, o significado da bromelina para o abacaxi é um mistério. Uma hipótese baseia-se no fato de que plantas carnívoras obtêm seu suprimento de nitrogênio e fósforo pela decomposição de material orgânico, obtida pela ação de proteinases altamente ativas e outras enzimas digestivas. Na floresta tropical a planta do abacaxi cresce sobre outras plantas, que oferecem muito pouco alimento, sendo assim o arranjo das folhas da planta do abacaxi forma um funil que funciona como reservatório, sempre cheio de água da chuva contendo fontes de nitrogênio e fósforo. Esta hipótese é reforçada pela descoberta de que as folhas reagem ao estímulo mecânico produzindo proteinases; com objetivo de digerir as proteínas de insetos e microrganismos (MAURER, 2001).

O abacaxizeiro é uma planta da família *Bromeliaceae*, monocotiledônea, herbácea considerada perene, uma vez que, após produzir o fruto o seu desenvolvimento continua por meio de uma gema axilar que se desenvolve, produzindo no ano seguinte um novo fruto. A propagação é, predominantemente, vegetativa por meio de mudas que a própria planta emite que, a depender da cultivar, necessita de 12 a 30 meses para iniciar a fase produtiva (AQUINO, 2006).

O fruto é a parte comercializável e representa 63% do total da planta, enquanto que o restante formado por caule, folha, coroa e casca do fruto, é considerado resíduo agrícola, não sendo devidamente aproveitado, o que resulta em perdas econômicas. Estes resíduos apresentam teores representativos de carboidratos, proteínas e enzimas proteolíticas, que possibilitam a sua utilização industrial como matéria-prima para obtenção de bromelina, amido, fibras, álcool etílico e rações animais (BALDINI *et al.*, 1993; PIZA *et al.*, 2002, KETNAWA *et al.*, 2012).

Por longo tempo, o abacaxi tem sido a fruta não cítrica mais popular das regiões tropicais e subtropicais, principalmente pelo seu atrativo sabor e aroma, além do refrescante balanço açúcar-ácido que possui, o que certamente, determinou sua importância sócio-econômica (FREIMAN e SRUR, 1999). Assim, pode ser considerado um fruto extensivamente cultivado no Havaí, Filipinas, Caribe, Malásia, Austrália, México, África do Sul e Brasil (ABÍLIO *et al.*, 2009). As cultivares Pérola e Smooth Cayenne são as mais cultivadas, sendo a 'Pérola' mais utilizada na região nordeste do Brasil (LOPES *et al.*, 2005).

A qualidade dos frutos do abacaxizeiro é atribuída às suas características físicas externas (coloração da casca, tamanho e forma do fruto) e internas conferidas por ampla faixa de constituintes, dentre os quais se destacam os altos teores de açúcares e enzimas proteolíticas (bromelinas). Também é importante conhecer a relação sólidos solúveis totais/acidez titulável (SST/AT) das variedades, visto que este é o parâmetro que mais se relaciona à palatabilidade e, conseqüentemente, à aceitação dos frutos pelo consumidor (FREIMAN e SRUR, 1999).

3.3.1 Cultivo e Mercado

O Brasil é um grande produtor de abacaxi, ocupando em 2011 o posto de segundo maior produtor mundial do fruto (FAO, 2013), com cerca de 1,5 milhões de toneladas de frutos colhidos (IBGE, 2012) um aumento de aproximadamente 4% em relação a 2010, quando ocupou a primeira posição mundial.

A cultura do abacaxizeiro sempre se destacou na fruticultura nordestina, graças não só às qualidades do fruto, que é bastante apreciado em todo o mundo, mas, principalmente, pela sua alta expressão econômica dentro do setor frutícola. Esta cultura gera centenas de empregos diretos e indiretos durante todo o ciclo, isto porque a colheita dos frutos de um abacaxizal (Figura 2) não pode ser mecanizada, uma vez que os mesmos não amadurecem no mesmo tempo, necessitando, portanto, da mão de obra humana para sua colheita (MOURA, 2010).



Figura 2. Cultivo de abacaxi ou abacaxizal: (a) em fase preliminar de brotamento dos frutos; (b) em fase pré-colheita dos frutos.

O Brasil é um dos grandes e tradicionais produtores de abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merril) no mundo, sendo que maior parte dos frutos é comercializada no mercado interno, na forma de fruta *in natura*. A produção está distribuída principalmente nos Estados do Norte e Nordeste, onde se utiliza a cultivar nacional Pérola ou Branco de Pernambuco, que por possuir uma acidez menos pronunciada e ser colhida em regiões quentes durante o ano inteiro, tem apresentado melhor aceitação pelo consumidor brasileiro (MELETTI *et al.*, 2011).

A área colhida de abacaxi no Brasil em 2011 foi de 57.505 hectares, sendo a região nordeste responsável pela maior safra, com aproximadamente 40% do total colhido. A região Norte foi responsável por 20,8%, seguida pela região Sudeste com 30,6%, Centro-oeste 8,0% e Sul 0,7%. Dentre os Estados, a Paraíba apresentou a maior área colhida e a maior produção, seguido pelos Estados do Pará, Minas Gerais, Bahia e Rio de Janeiro (IBGE, 2012). Em 2010, o Brasil produziu 1.413.352 toneladas de abacaxi, dos quais cerca de 40% foram produzidos na região Nordeste do país, seguida pela região Sudeste com 29,7%, Norte com 20,8%, Centro-Oeste com 7,0% e a região Sul com 0,4% da produção nacional. Os principais Estados produtores foram Paraíba (273.520 t) Pará (248 464 t), Minas Gerais (222 199 t), Bahia (139.324 t), Rio Grande do Norte (85.165 t) e Rio de Janeiro (64.442 t) (IBGE, 2011). Em Sergipe o cultivo ainda é reduzido. Em 2011, a safra foi em torno de 23 toneladas, o que representa aproximadamente 2% da produção brasileira (IBGE, 2012).

No que diz respeito as cultivares, as mais conhecidas mundialmente são classificadas em cinco grupos, sendo que a cultivar “Smooth Cayenne” do grupo Cayenne, e “Pérola” do grupo Pernambuco são aquelas que se destacam nos plantios comerciais brasileiros. Dentre estas duas cultivares merece destaque a “Pérola”, que possui fruto de formato cônico, com casca amarela no amadurecimento, de polpa branca, com elevado teor de açúcares, reduzida acidez, o que a torna agradável ao paladar brasileiro (CUNHA *et al.*, 1999).

O abacaxizeiro frutifica dentro de 24 meses após o plantio, quando as mudas são do tipo coroa. De modo geral, pode-se obter 15.000 à 20.000 frutas por hectare, por safra, servindo este valor como média para as variedades. A maturação da polpa e da casca do fruto inicia-se pela base estendendo para o ápice. Para a avaliação da maturação, contrariamente ao dito popular, que seria pela coloração da casca, é necessário analisar o tamanho do fruto, a variedade do produto e as condições ecológicas (CÉSAR, 2002).

A época de colheita das frutas pode ocorrer durante o ano todo ou apenas por um período de 9 meses variando com as regiões de cultivo e com os ciclos de maturação (precoces ou tardias), assim a colheita no clima tropical dura o ano todo e no clima temperado começa em setembro e se estende até junho (GODOI, 2007).

O momento adequado para a colheita depende do fim a que se destinam os frutos. Se for para a fabricação de conservas, deve-se aguardar até que os frutos fiquem maduros, ou seja, o momento em que suas qualidades sensoriais estejam ótimas. Entretanto, se o destino for a exportação como fruta fresca, a colheita deve ser feita com antecipação para que sua maturação total não ocorra até o momento em que seja ofertado ao consumidor. É preciso, contudo, neste caso, não colher frutos demasiadamente imaturos (CÉSAR, 2002).

O abacaxizeiro é uma planta muito sensível ao frio, mas resiste bem à seca. Exige, por isso, clima quente ou mesotérmico, onde não há perigo de ocorrência de geadas. A temperatura média favorável situa-se entre 21 e 27°C. Quando a temperatura se mantém acima de 32°C verificam-se danos na planta devido à transpiração excessiva, enquanto que com a temperatura abaixo de 20°C a planta entra em estado de inatividade (MEDINA, 1978). Portanto, o Brasil possui um clima muito favorável para a produção do fruto.

3.4 Propagação *in vitro*

Cultura de tecidos vegetais é definida como a cultura asséptica de células, tecidos, órgãos e seus componentes em determinadas condições físicas e químicas *in vitro* (THORPE, 2007). A propagação vegetativa *in vitro*, também denominada de micropropagação por causa do tamanho dos propágulos utilizados, é a aplicação mais prática da cultura de tecidos e aquela de maior impacto (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Tecidos e órgãos podem ser cultivadas por uma grande variedade de propósitos, entre eles o estudo de comportamento celular (incluindo a citologia, nutrição, metabolismo, morfogênese, embriogênese, e patologia), modificação e melhoria da planta, a geração de plantas livres de patógenos para o armazenamento de germoplasmas, propagação clonal e produção de metabólitos de interesse comercial (THORPE, 2007).

Diversos países da América Central a da Ásia, estão aplicando as técnicas de cultura de tecidos vegetais para a micropropagação clonal. Nesses países, processos de desenvolvimento e otimização de protocolos regenerativos proporcionaram a produção de mudas sadias em larga escala, em laboratórios industriais denominados biofábricas (GUERRA *et al.*, 1999). Diversas tecnologias, incluindo a formação de bioprodutos, melhoria agrícola, e homogeneização das plantas, baseado em técnicas de cultura de tecidos de plantas, têm sido desenvolvidas (KIERAN, 2001).

Plantas cultivadas *in vitro* são independentes de fatores geográficos e climáticos, sendo uma grande vantagem quando para a produção de compostos e moléculas importantes. Além disso, na cultura de tecidos, as plantas cultivadas são independentes de problemas técnicos e econômicos associados ao cultivo no campo, incluindo doenças e heterogeneidade no material de origem e variação no conteúdo do produto (FERNANDEZ e POMILIO, 2003).

A micropropagação, termo similar a propagação vegetativa *in vitro*, apresenta ainda outras vantagens como a manutenção das características da planta matriz, um alto rendimento por explante, produção intensa de mudas sadias em curto período, controle total das condições ambientais durante a propagação, utilizando-se de um espaço bastante reduzido, além disso possibilitando a propagação de plantas oriundas da cultura de meristemas ou ápices meristemáticos isentas de viroses ou doenças, a clonagem de espécies de difícil propagação por métodos convencionais bem como a preservação a longo prazo de plantas matrizes sem riscos de infecção (GUERRA *et al.*, 1999; PASQUAL *et al.*, 2001; MACÊDO *et al.*, 2003)

Entretanto, apesar das vantagens apresentadas, é possível encontrar na literatura citações de desvantagens, sendo o principal deles o custo mais elevado em comparação com métodos de propagação convencional em virtude da necessidade de infraestrutura adequada e da aplicação de mão-de-obra especializada, bem como, uma maior interação entre a evolução dos conhecimentos técnicos e o setor empresarial, elevando fatores econômicos frente as oscilações no mercado agrícola (GONZÁLES *et al.*, 2011, SOUZA *et al.*, 2006).

Nesse sentido, alternativas têm sido adotadas no intuito de reduzir os custos de produção, destacando-se a utilização de luz solar em diferentes fases de cultivo *in vitro* (Silva *et al.*, 2008), uso de biorreatores (Escalona *et al.*, 1999), esterilização química do meio (Teixeira *et al.*, 2006) e uso de substâncias solidificantes alternativas (Costa *et al.*, 2007).

Desse modo, fica claro que o sucesso de um sistema de micropropagação, assim como de qualquer outro processo produtivo, depende do controle de um grande número de variáveis. O método utilizado, por exemplo, pode ser bastante específico, quando se objetiva os melhores resultados a partir de cada espécie, uma vez que cada espécie ou clone apresenta características e necessidades únicas, determinada por fatores genéticos, para seu cultivo *in vitro* (GEORGE *et al.*, 2008, GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Dependendo da finalidade da propagação, a micropropagação de plantas pode ser conduzida por proliferação de gemas axilares, indução de gemas adventícias por organogênese direta ou indireta (passando pela fase de calo), ou via embriogênese somática, sendo o caminho da proliferação de gemas axilares preferido para a micropropagação (MURASHIGE, 1974; GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

A seleção da planta matriz doadora do explante é realizada considerando-se a sanidade, a nutrição e o ambiente de crescimento. Plantas nutricionalmente equilibradas originarão explantes de melhor qualidade, tanto na fase de estabelecimento *in vitro*, quanto sobre o seu crescimento posterior. As mudanças ambientais alteram os níveis de carboidratos, proteínas e substâncias de crescimento nos tecidos, daí poder afirmar-se que, de forma geral, os melhores períodos para retirada dos explantes são os que as plantas apresentam melhores condições de intenso crescimento vegetativo (PASQUAL *et al.*, 2001).

Os meios utilizados para a micropropagação de plantas fornecem as substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro* (CALDAS *et al.*, 1998). É composto basicamente por sais minerais, açúcar, como fonte de carbono e energia, alguns aminoácidos, vitaminas e reguladores de crescimento. O balanço nutricional e hormonal do meio é dependente de vários fatores, e principalmente da demanda de cada espécie, não existindo um receituário que possa ser utilizado em larga escala para diferentes materiais (SOUZA *et al.*, 2006).

Para as condições de incubação os fatores físicos, como luz e temperatura são de suma importância no desenvolvimento das culturas, assim como a umidade e o fotoperíodo. A grande maioria das espécies tem desenvolvimento satisfatório quando incubadas com intensidade luminosa de 20 a 70 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, fotoperíodo de dias longos (16 horas de luz por 8 horas de escuro), e temperaturas que variam de 20 a 27°C (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

3.4.1 Micropropagação de Abacaxizeiro

A cultura do abacaxi está amplamente disseminada na região tropical e o Brasil destaca-se como um dos maiores produtores, gerando anualmente mais de 3,1 milhões de toneladas da fruta. Entretanto, apesar das maiores áreas de cultivo concentrarem-se na região Nordeste, a produtividade da cultura nessa região é baixa (45 toneladas por hectare), e está relacionada com a qualidade das mudas (WEBER *et al.*, 2003).

Os brotos que surgem no abacaxizeiro são comumente utilizados nos novos plantios, e muitas vezes já vêm acompanhados de insetos e fitopatógenos, facilitando a disseminação de pragas e doenças (REINHARDT, 1998), como, por exemplo, a fusariose. Esta doença, causada pelo fungo *Fusarium subglutinans*, afeta a produtividade das principais cultivares, como Pérola (REINHARDT e SOUZA, 2000), que representa cerca de 80% da produção, e Smooth Cayenne (SPIRONELLO *et al.*, 1997; CABRAL, 1999).

A micropropagação *in vitro* tem assumido posição destacada com culturas tropicais e a micropropagação do abacaxi no Brasil e no mundo constitui exemplo de cultura tropical beneficiada pelo estado fitossanitário do material resultante desse processo (TEIXEIRA *et al.*, 2001). Essa técnica, além de ser considerada uma importante estratégia para a produção de material de alta qualidade (XIAO *et al.* 2011), tem sido recomendada, também, como forma de obter grande número de plantas em curto espaço de tempo, uma vez que a produção de mudas por cultura de tecidos permite obter milhares de mudas a partir de uma única gema em pequeno período de tempo e totalmente livres de problemas fitossanitários (FTTCHET, 1990; TEIXEIRA *et al.*, 2001).

A primeira propagação *in vitro* de abacaxi foi feita em 1960 por Aghion e Beauchesne (1960), entretanto, foi relatada somente na década de 70 por Mapes (1974) e Lakshmi *et al.* (1974), os quais consideraram a técnica uma alternativa comercial.

Conforme observado por PIZA *et al.* (2002), plantas de abacaxizeiro obtidas *in vitro* possuem bromelinas bioquimicamente ativas. A atividade proteolítica da bromelina em extratos de folhas regeneradas *in vitro* e em calos foi quantificada por APTE *et al.* (1979), que compararam os resultados com folhas de plantas adultas. Estas folhas apresentaram maior atividade proteolítica e quantidade de proteína total.

Na maioria dos trabalhos publicados de micropropagação do abacaxizeiro tem sido utilizada como metodologia básica a desfolha das mudas, desinfestação do caule com hipoclorito de sódio, retirada de gemas em ambiente asséptico, inoculação em meio nutritivo e crescimento em salas específicas com condições ambientais controladas para que ocorra a brotação (ALMEIDA *et al.*, 2002; MACÊDO *et al.*, 2003; MOREIRA *et al.*, 2003).

De Wald *et al.* (1988), trabalhando com multiplicação *in vitro* de diferentes cultivares de abacaxizeiro, verificaram uma grande variação no número de plantas obtidas ao final de 9 a 13 meses após o início da cultura. Na fase de estabelecimento das culturas *in vitro*, evidencia-se o comportamento do explante que se manifestará nas fases subsequentes da micropropagação. Alguns genótipos adaptam-se bem a diferentes composições de meio de cultura, enquanto outros requerem modificações para cada clone ou grupo de clones (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Segundo estes autores a adição de reguladores supre as possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes isolados da planta matriz.

Usando a técnica de micropropagação com a cultivar ‘Pérola’, foi possível produzir 161.080 plantas de abacaxi após oito meses, partindo-se de apenas uma planta com oito mudas e 10 gemas axilares cada (ALMEIDA *et al.*, 2002). Essa quantidade é suficiente para o

cultivo de abacaxi em uma área de 2,3 hectares, em um sistema de plantio adensado (70.000 plantas por hectare) (SANTANA *et al.*, 2001). Esse grande número de plantas obtido por ALMEIDA *et al.* (2002) deve-se à otimização do protocolo de micropropagação utilizando o meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) líquido com 1,5 mg.L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina), que resulta, em média, em 2013,5 brotações por explante após cinco subcultivos.

Pereira *et al.* (2012), utilizando um sistema de cultura de duas fases (meio semi-sólido com uma camada de meio líquido no topo) proliferaram gemas de abacaxizeiro (*Ananas comosus L.*), e obtiveram mais de 430 microbrotos a partir de 5 rebentos iniciais dentro de 5 meses, e sem manipulação do broto. As plântulas depois de transferidas para o solo, sobreviveram a aclimação com 100% de êxito. Concluindo assim, que o sistema poderia ser útil para a micropropagação em larga escala de uma variedade de cultivares de abacaxi, com a produção elevada de plântulas no final do processo, e os custos trabalhistas reduzidos durante as subculturas. Isso demonstra que estudos sobre multiplicação *in vitro* de abacaxi podem ser viáveis economicamente.

3.4.2 Hormônios vegetais e Reguladores de Crescimento

O crescimento e o desenvolvimento de plantas são regulados tanto por fatores endógenos como por fatores externos. Os fatores endógenos são ativos não somente em nível celular e molecular, afetando os processos metabólicos via transcrição e tradução, mas também têm a função de coordenação do organismo como um todo, realizada por meio dos hormônios vegetais (LARCHER, 2000).

Hormônios vegetais, fitorreguladores ou reguladores vegetais, são substâncias naturais ou sintéticas que, em pequenas concentrações, podem alterar qualquer processo fisiológico das plantas, como, por exemplo, a emissão de raízes, alongação de caules, abscisão de folhas e frutas, antecipar ou atrasar a maturação de frutos de interesse comercial, entre outros. (CASTRO *et al.*, 2001; FACHINELLO e KERSTEN, 2008; CATO *et al.*, 2006), por conseguinte a sua aplicação torna-se fundamental para promover maior taxa de multiplicação (MACÊDO *et al.*, 2003) e podem estar relacionados à hiperhidricidade (GEORGE, 1996) com efeitos vinculados a variações na atividade da peroxidase (SAHER *et al.*, 2004). Dessa maneira, as peroxidases podem ser tomadas como substâncias indicadoras de processos bioquímicos (DEBIASI *et al.*, 2007), como divisão celular, crescimento, estresse, etc. (PENEL *et al.*, 1979). Outras substâncias mostram alteração nessas condições, como as

proteínas. Geralmente, altos níveis de proteínas podem estar relacionados à taxa de divisão mitótica, pois a síntese de novas proteínas acarreta mudanças morfológicas e bioquímicas durante as fases de crescimento e desenvolvimento (FRANCK *et al.*, 2004).

Dessa maneira, a composição e a concentração dos reguladores vegetais no meio de cultura são fatores determinantes no padrão de desenvolvimento, sendo as auxinas e as citocininas as classes de reguladores mais utilizadas neste sistema de cultivo (CHEEMA *et al.*, 1983; PIZA, 2001).

As citocininas são sintetizadas a partir de derivados de N⁶-adenina ou compostos de fenil uréia. Existem quatro tipos de citocininas: as de ocorrência natural, zeatina e a citocinina isopenteniladenina (i⁶ Ade); e as citocininas sintéticas 6-Benzilaminopurina (BAP) e a cinetina. (RAVEN, 2001). Elas são utilizadas para estimular a divisão celular e atuam conseqüentemente, no processo de morfogênese (GEORGE, 1996). O BAP (6-benzilaminopurina) é a citocinina que geralmente proporciona melhores resultados, baixo custo e tem sido eficaz na multiplicação de diversas espécies, sendo responsável pela multiplicação de partes aéreas e indução de gemas adventícias (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998; KRIKORIAN, 1991). Entretanto, seu excesso é tóxico e caracteriza-se, principalmente, pela falta de alongamento das culturas, pela redução no tamanho das folhas, pelo encurtamento dos entrenós, pelo engrossamento exagerado dos caules e pela hiperhidricidade generalizada, o que leva a problemas sérios na fase de enraizamento (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

As auxinas, que em seu significado etimológico, exprimem a ideia de crescimento, ou seja, desencadeiam vários processos fisiológicos, entre os quais está a formação do fruto (PANDOLFINI *et al.*, 2007), induzem à extrusão de prótons que acidifica e afrouxa a parede celular, e por meio da entrada da água (com o afrouxamento da parede celular ocorre redução de turgor) há aumento da extensão da célula (TAIZ e ZEIGER, 2009). Uma das principais funções da auxina é a regulação e promoção de crescimento por alongamento de caules novos e coleóptilos. Além disso, atua no alongamento ou inibição de raízes (em função da concentração), nos tropismos, regulação de dominância apical, iniciação do crescimento de raízes laterais, abscisão de folhas, diferenciação vascular, formação de gemas florais e desenvolvimento de frutos (TAIZ e ZEIGER, 2009). O movimento da auxina, tanto nos ramos como nas raízes, é lento, perfazendo somente um centímetro por hora (RAVEN, 2001). As concentrações de auxina são frequentemente baixas se comparadas com as das citocininas. Concentrações excessivas de auxina podem inibir a multiplicação ou favorecer demasiadamente o enraizamento ou formação de calo em detrimento da multiplicação. Entre

as auxinas hormonais, a ANA (ácido naftalenoacético) é a auxina mais usada em meios de multiplicação, seguido de AIB e AIA (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Nesse âmbito, o ANA (ácido naftalenoacético) e o BAP (benzilaminopurina), são a auxina e a citocinina, respectivamente, mais utilizadas, na maioria dos trabalhos nas fases de estabelecimento de gemas como também nos protocolos para multiplicação do abacaxizeiro (BARBOZA *et al.*, 2004; COSTA *et al.*, 2007; KISS *et al.*, 1995; ESCALONA *et al.*, 1999). Além disso, esses reguladores são fundamentais para obtenção de um número suficiente de brotos de abacaxizeiro com parte aérea mais alongada e que permita sua melhor individualização e enraizamento (MACÊDO *et al.*, 2003).

Medeiros *et al.* (2001), mostraram que a utilização da associação das concentrações de 4,0 e 2,0 mg.L⁻¹ e 2,0 e 1,0 mg.L⁻¹ de BAP e ANA, respectivamente, no meio de cultura favorecem a multiplicação, no entanto, os brotos apresentam um alongamento da parte aérea muito pequeno e são de difícil individualização.

Marciani-Bendezú *et al.* (1990), trabalhando com o abacaxizeiro “Smooth Cayenne” e estudando o efeito de diferentes doses de BAP, em meio “MS” (MURASHIGE e SKOOG, 1962) sólido, observaram que a maior formação de brotos por explante foi obtida utilizando-se a concentração de 5,0 mg.L⁻¹.

Visando desenvolver um protocolo para a micropropagação *in vitro* de diferentes genótipos de abacaxizeiro, Ventura (1994) concluiu que na fase de indução de proliferação de gemas deve-se utilizar o meio “MS” suplementado com 2,0 mg.L⁻¹ de ANA e 2,0 mg.L⁻¹ de BAP.

Trabalhando com a variedade de abacaxi Amarelinho, Pescador *et al.* (1994) realizaram um estudo, objetivando, também, desenvolver um protocolo de micropropagação. Os autores concluíram que na fase de multiplicação a indução de proliferação de gemas múltiplas ocorreu em maior intensidade nos meios de cultura contendo 0,5 mg.L⁻¹ de ANA e 1,0 mg.L⁻¹ de BAP.

Villa *et al.* (2006), verificaram em seus estudos com amoreira preta (*Rubus spp.*) que o maior número de folhas foi encontrado no tratamento com 0,5 mg.L⁻¹ de BAP e que a massa fresca da parte aérea sofre incremento, em virtude da diminuição nas concentrações de BAP. Cheema e Sharma (1983), indicam que o BAP induz a uma alta taxa de multiplicação nas concentrações de 2 a 4 mg.L⁻¹ para macieira. Um adequado balanço entre auxinas e citocininas estabelece um eficiente controle no crescimento e na diferenciação das culturas *in vitro* (LIMA *et al.*, 2007)

Araújo *et al.* (2008) cita que a ausência de ANA e 2,243 mg.L⁻¹ de BAP causou maior proliferação de brotos; entretanto, no tratamento sem ANA e com 1,0 mg/L de BAP, os brotos neoformados se apresentaram mais desenvolvidos e mais fáceis de serem subcultivados. Nos tratamentos sem BAP os explantes se apresentaram bem desenvolvidos, enraizados e sem proliferação de brotos.

Segundo Torres *et al.* (1998), o uso de citocininas estimula maior produção de parte aérea por meio do aumento da massa fresca, número de gemas e folhas, porém o contrário é obtido com a utilização de concentrações mais elevadas, acima da ótima para a multiplicação da espécie em estudo.

Brotações cultivadas no meio MS, na ausência de reguladores, apresentaram maior comprimento, porém não há proliferação de brotos, sendo, portanto inviável utilizar para fins de micropropagação. Com o aumento das concentrações de BAP, ocorre diminuição no comprimento das brotações, para todas as concentrações de ANA utilizadas (MACÊDO *et al.*, 2003; FRÁGUAS *et al.*, 2009).

3.4.3 *Estresse Salino*

O estresse salino caracteriza-se por um quadro de alterações deletérias nas plantas cultivadas em condições de salinidade (XIONG e ZHU, 2001), as quais ocorrem devido à intoxicação por íons e pela diminuição na oferta de água e nutrientes à planta (LI *et al.*, 2010; HASEGAWA *et al.*, 2000). Essa condição é um dos maiores problemas enfrentados não só pelas regiões áridas e semiáridas do Nordeste brasileiro, mas, também, por muitas outras regiões do mundo em virtude, principalmente, da intensa evapotranspiração, baixas precipitações e irrigação (ABDEL LATEF, 2010; BRILHANTE *et al.*, 2007).

É difícil afirmar com exatidão a real área afetada pela salinização no mundo atualmente visto que são controversas as informações a respeito. De acordo com a FAO (2007) e com Sheng *et al* (2008), mais de 900 milhões de hectares em todo o mundo, aproximadamente 20% do total das terras agrícolas, estão afetados por sais, o que representa mais de 6% da área terrestre do mundo, sendo o NaCl o principal sal causador dessa salinização (MUNNS e TESTER, 2008).

No Brasil as áreas salinas concentram-se na sua maior parte na região Nordeste, principalmente nos perímetros irrigados, os quais juntos somam mais de 57% da área total da região semiárida (HOLANDA *et al.*, 2007). Nessas regiões de clima semiárido, as plantas estão mais sujeitas ao estresse salino, devido à elevada temperatura e à baixa pluviosidade

características dessas regiões. Tais características associadas ao manejo inadequado da irrigação favorecem a salinização dos solos, por meio da introdução de sais via água de irrigação associado ao controle deficitário da drenagem (REINHARDT *et al.*, 2001; OLIVEIRA, 1997). Nesses locais, o aumento do teor de sais solúveis no solo é um processo natural, pois o déficit de precipitação em relação à evapotranspiração promove o acúmulo de sais nas camadas superficiais do solo, prejudicando o desenvolvimento das plantas (FAGERIA e GHEYI, 1997). Esse fato vem sendo constatado na região Nordeste do Brasil, nas áreas mais intensamente cultivadas com o uso da irrigação (OLIVEIRA, 1997).

Nesse contexto, o estresse salino, principal fator limitante de crescimento e produtividade das plantas, é um dos estresses abióticos que mais restringe a produção agrícola, pois inibe o crescimento e a fertilidade das culturas, agindo osmótica e ionicamente (MACÊDO *et al.*, 2005) dificultando a absorção de água por parte das raízes e causando toxicidade as plantas (BRILHANTE *et al.*, 2007). Além disso, desde o início até o desenvolvimento do estresse salino dentro de uma planta, todos os processos importantes, como a fotossíntese, a síntese de proteínas, energia e metabolismo lipídico são afetados (BORDE *et al.*, 2011; ULISSES *et al.*, 1998; PARIDA e DAS, 2005).

Dessa forma, visto que a resposta das plantas ao estresse são complexas, por depender de fatores intercalados, todos baseados nos processos morfológicos, bioquímicos e fisiológicos das plantas (QASIM *et al.*, 2003), o desenvolvimento de culturas tolerantes a elevados níveis de salinidade nos solos seria uma solução prática desse problema (YAMAGUCHI e BLUMWALD, 2005) uma vez que a produção e produtividade de várias culturas continuam a ser prejudicados e os danos causados por essas tensões são responsáveis por elevados prejuízos econômicos em todo o mundo.

Nesse sentido, uma alternativa para superação dos problemas causados pela salinidade é o melhoramento de plantas, no qual se podem utilizar ferramentas não convencionais para a indução de variabilidade genética (BORÉM, 2001; BRITO *et al.*, 2007, CHAVES *et al.*, 2009). Desse modo, o gerenciamento de técnicas adequadas para a criação de plantas geneticamente modificadas são ferramentas que aperfeiçoam a eficiência do uso de recursos por parte das plantas (CHAVES *et al.*, 2009). Assim, a identificação e seleção de culturas e cultivares resistentes à salinidade é de fundamental importância para serem utilizados em programas de melhoramento genético.

Dessa forma, técnicas de cultura de tecidos vegetais vêm sendo aplicadas como uma alternativa viável e rentável para o desenvolvimento de plantas tolerantes ao estresse, não só pelo potencial de se obterem plantas mais resistentes a fatores de estresses bióticos e abióticos

em condições controladas e espaço limitado, mas também pela rápida propagação clonal *in vitro* de plantas de novas variedades (SAKHANOKHO e KELLEY, 2009; MACÊDO, *et al.*, 2003). A partir dessas técnicas, por meio de variantes somaclonais - variabilidade gerada durante o processo de cultivo *in vitro* - associados a uma pressão de seleção, como o NaCl, torna-se possível a obtenção de genótipos resistentes a fatores adversos, dentre os quais a salinidade, largamente utilizada no melhoramento de diversas espécies vegetais (LUTTS *et al.*, 2004; DUNCAN, 1997).

Trabalhos utilizando diferentes doses de NaCl para uma posterior seleção *in vitro*, em abacaxizeiro, mostraram que a presença do sal afetou diferentes indicadores de crescimento expressos pela produção de brotos, altura e número de folhas (BRITO *et al.*, 2007; MEDEIROS *et al.*, 2001). Tais resultados também foram observados em outras espécies, como a bananeira, cuja adição de NaCl ao meio de cultura afetou a multiplicação *in vitro* indicando que o aumento da concentração do sal é proporcional à diminuição do número de brotos produzidos (MACÊDO *et al.*, 2005).

Teores de proteínas solúveis em folhas diminuíram em resposta à salinidade (ALAMGIR e ALI, 1999; GADALLAH, 1999; WANG e NIL, 2000; PARIDA *et al.*, 2002). Agastian *et al.* (2000), relataram o aumento de proteínas solúveis em baixa salinidade e diminuição em alta salinidade na amoreira. Broetto (1995) afirmou que o estresse salino provocou diminuição na atividade da enzima sintetase de glutamina e no teor de proteínas solúveis em calos de feijão, atribuindo estes resultados aos distúrbios provocados pelo sal no metabolismo levando a acúmulo de amônia o que provavelmente causou a inibição da atividade enzimática.

Quando em estudos com rabanete (*R. Sativus L.*) foi observado que o estresse salino causou a acumulação de uma proteína de 22 kDa (pI de 7,5) e mRNA nas folhas (LOPEZ *et al.*, 1994). Um aumento significativo na quantidade de uma proteína, cuja migração em electroforese bidimensional em gel (2D) corresponde a um peso molecular aparente de 23-25 kDa e ponto isoelétrico de 6,1, foi também observado em cultura de células derivadas de células de calos da laranja Shamuti (BENHAYYIM *et al.*, 1993).

Melo *et al.* (2011) avaliaram o efeito de diferentes concentrações de NaCl nas fases de multiplicação e enraizamento *in vitro* do abacaxizeiro cultivar MD Gold na ausência e presença dos reguladores ANA e BAP concluindo que o cultivo *in vitro* de abacaxizeiro em presença de sal é mais eficiente na presença destes reguladores, garantindo a manutenção do crescimento, aumentando o número de folhas, produzindo novas gemas e acelerando o processo de enraizamento.

Barroso *et al.* (2003) propagaram plantas de abacaxi das variedades Pérola e Smooth Cayenne em meio de cultura contendo 0, 12,5 e 25 mM de NaCl e verificaram que as plantas micropropagadas nesses meios apresentaram médias e taxas de crescimento semelhantes, mas diferiram quanto às correlações entre os caracteres e às variâncias fenotípicas. Os resultados indicaram que os efeitos do estresse salino aplicado *in vitro* permanecem durante a aclimação das plantas.

Piza *et al.* (2002) caracterizaram plantas de abacaxizeiro cv. Smooth Cayenne, cultivadas em meio salino, quanto à atividade da bromelina, e constataram maior atividade da enzima em gemas e raízes que nas partes aéreas das plantas variando em função dos tratamentos salinos e fase do desenvolvimento vegetal, concluindo que condições de estresse salino podem induzir a superexposição genética, ou a maior eficiência de catálise, das enzimas envolvidas na lise de metabólitos primários da planta, produzidos em maior escala nestas condições.

Mercier e Yoshida (1998) compararam a atividade proteolítica da bromelina em folhas de *Bromeliae antiacantha* cultivadas *in vitro* recém-formadas e com 6 meses de cultivo e concluíram que a atividade foi maior em plantas cultivadas aos 6 meses *in vitro*, onde foi observado aumento de atividade de 22%. Os autores concluíram que a ocorrência de regeneração teve influência na atividade da enzima.

Segundo Melander e Horvath (1977), os sais exercem dois efeitos antagônicos sobre as proteínas: i. tendem a quebrar ligações eletrostáticas; e ii. aumentam as interações hidrofóbicas. Entretanto, os autores salientaram que estas não seriam as razões básicas para esperar uma diminuição ou estímulo de enzimas, dependendo basicamente de características estruturais específicas da proteína.

4. MATERIAIS E MÉTODOS EXPERIMENTAIS

Neste capítulo são listados os materiais e descritos os métodos utilizados na etapa experimental deste trabalho. Estes estudos experimentais foram realizados no Laboratório de Bioprocessos (LEB) do Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP), situado no campus Aracaju - Farolândia da Universidade Tiradentes (Unit) e no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Tabuleiros Costeiros, também em Aracaju, SE.

As mudas de abacaxi foram coletadas no campo (Figura 3), no sítio da COOPERAFIR (Cooperativa de Produção, Comercialização e Prestação de Serviços dos Agricultores Familiares de Indiaroba e Região) localizado no povoado Cajueirinho no município de Indiaroba - SE.



Figura 3. Procedimento de coleta de mudas de abacaxi: (a) abacaxizal em fase de pós-colheita; (b) amostra de filhote-rebentão; (c) separação das mudas presentes no filhote-rebentão; e (d) mudas do flhote-rebentão.

4.1 Produção e multiplicação das plantas *in vitro*

A produção e multiplicação das plantas *in vitro* foram realizadas no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Tabuleiros Costeiros, em Aracaju, SE. As plantas de *Ananas comosus var. comosus*, cultivar Pérola, foram estabelecidas *in vitro* em meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) gelificado com agar (MGA), suplementado com 0,1 ppm de ácido naftalenoacético (ANA) e 1,0 ppm de benzilaminopurina (BAP).

Posteriormente, na fase de multiplicação *in vitro*, foram mantidas as concentrações fixas de ANA e BAP quando no estudo comportamental da atividade da bromelina sobre estresse salino em concentrações variadas de NaCl (0, 50, 100, 150 e 200 mmolar), enquanto foram variadas as concentrações de reguladores ANA (0,0 a 0,20 ppm) e BAP (0,0 a 2,0 ppm) e de NaCl (0,0 a 150 mmolar) quando no estudo da influência de reguladores e estresse salino na atividade da bromelina, por intermédio de planejamento experimental.

As diferentes etapas para a produção de plantas *in vitro*, desde a assepsia do material vegetal coletado no campo até o estabelecimento das plantas em laboratório estão apresentadas nas Figuras 4 e 5. Deste modo, inicialmente o pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, realizada a 120°C, por 15 minutos. O preparo e inoculação dos explantes (gemas axilares) de abacaxizeiro foram preparados por limpeza da coroa por aplicação de água corrente e sabão antiséptico, sendo na sequência realizado uma assepsia em hipoclorito de sódio (NaOCl), álcool 70% e água pura, e realizados a excisão dos explantes para posterior inoculação dos mesmos. Para a etapa de estabelecimento das plantas *in vitro*, nos 15 dias iniciais foram mantidas sem a presença direta de luz para evitar oxidação, após este período houve a incidência de luz por fotoperíodo com as culturas mantidas em sala de crescimento com intensidade luminosa de $52 \mu\text{moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, temperatura de $27\pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas, sendo utilizados frascos contendo 10 mL de meio para cada explante.

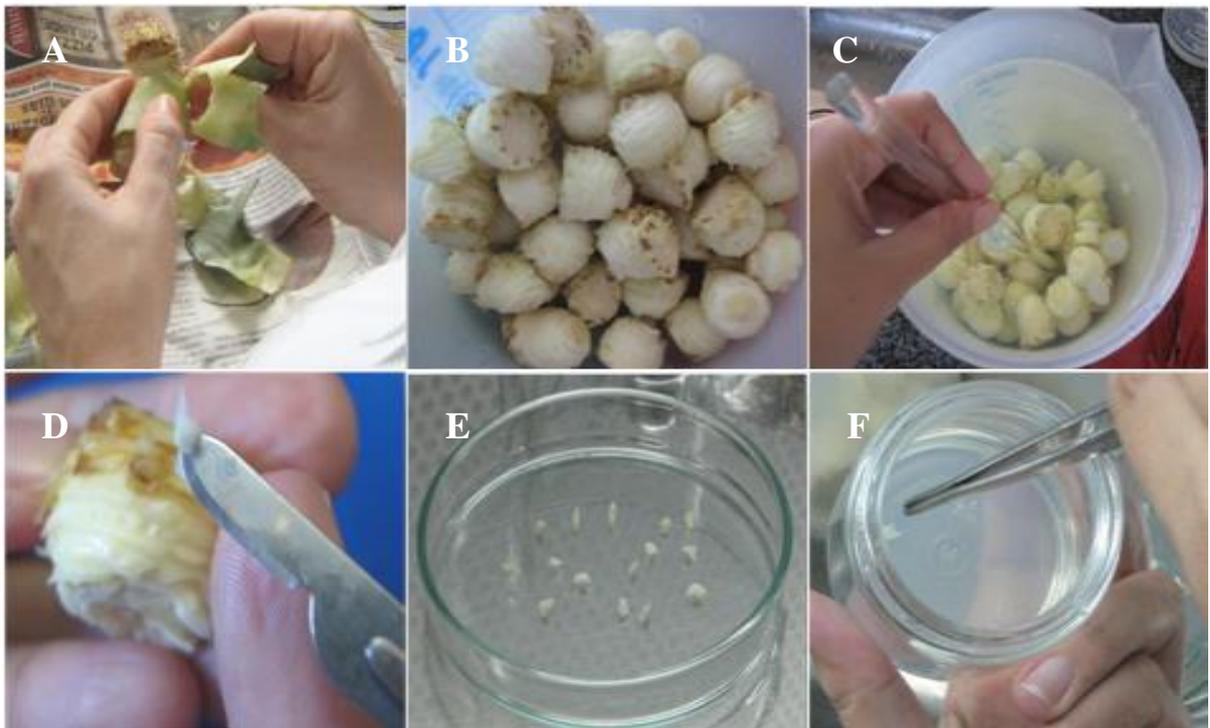


Figura 4. Etapas para inoculação dos explantes (gemas axilares) de abacaxizeiro *in vitro*: Etapas A e B – limpeza da coroa; C – assepsia com NaOCl, álcool 70% e água pura; D – excisão do explante; E e F – Inoculação dos explantes.

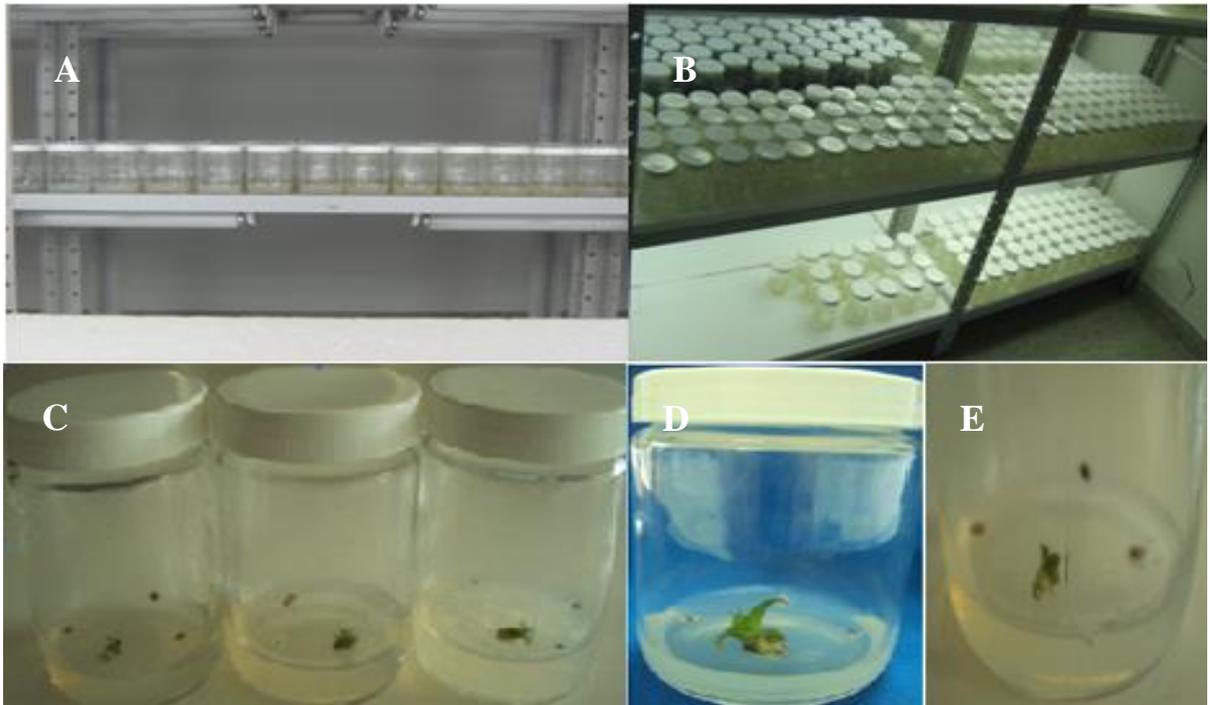


Figura 5. Estabelecimento das plantas *in vitro*: A- primeiros 15 dias sem a presença direta de luz; B – gemas na presença de fotoperíodo; C – intumescimento das gemas; D e E – plantas em desenvolvimento.

4.2 Obtenção da Enzima

A enzima foi obtida a partir do extrato bruto separadamente da folha e do caule de plantas do abacaxi 'Pérola' *in vitro*, utilizando-se 0,500 g do material vegetal (caule ou folha), após maceração em 2,5 mL de tampão fosfato a 0,2 M, em pH 5,7 e filtração por duas vezes em gaze (Figura 6). Para o preparo do tampão fosfato foram dissolvidos 24,43 g de fosfato de potássio monobásico e 1,18 g de fosfato de potássio dibásico em quantidade suficiente de água destilada e completado o volume para 1000 mL, sendo o pH da solução ajustado por adição de ácido fosfórico.



Figura 6. Extrato bruto de caule (Fig. 1A, direita) e folha (Fig. 1A, esquerda) antes da filtração e após procedimento de filtração (Fig. B).

4.3 Determinação da Proteína Total

A determinação da proteína total foi realizada utilizando o método de Bradford (1976) que baseia-se no fato de que o corante *coomassie brilliant blue* coexiste em duas formas de cores diferentes: a cor vermelha e a azul. Dessa forma, a cor vermelha é rapidamente convertida na outra forma por ligação da parte cromófora do corante à proteína.

O procedimento da análise foi feito da seguinte forma: em um tubo de ensaio colocou-se e 980 μ L de água destilada e 20 μ L do extrato bruto, acrescentou-se 1000 μ L do reagente de Bradford, agitou-se o tubo em vortex, deixando-se em repouso por cinco minutos. Passado esse tempo, fez-se a leitura de absorbância no comprimento de onda de 595 nm. As análises foram feitas em triplicatas. O branco foi preparado usando 1000 μ L de água destilada e 1000 μ L do reagente.

Para a realização dos cálculos da concentração de proteína, foi feita uma curva de calibração usando soluções de albumina de soro bovino (BSA) com concentrações variando de 2,5 à 40 mg/L. O reagente de Bradford foi preparado dissolvendo-se 50 mg de *Coomassie Brilliant Blue G-250* em 400 mL de água destilada. A esta amostra adicionou-se 25 mL de

álcool etílico a 95% sob agitação e 50 mL de ácido ortofosfórico a 85%. Após agitação por 24 horas, em erlenmeyer protegido da luz, procedeu-se a filtração da solução em camada de algodão, completando-se o volume com água destilada para 500 mL. Em seguida, todo material foi transferido para um frasco de vidro envolto em papel alumínio e reservado em geladeira. Para o preparo da solução de BSA foram dissolvidos 0,5 g de BSA (Soro Albumina Bovina) em água deionizada suficiente para completar 100 g de solução.

4.4 Determinação da Atividade Enzimática

A atividade enzimática foi realizada baseando-se no método descrito por Murachi (1976) e Baldini *et al.* (1993). Utilizou-se leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda igual a 540 nm em virtude do complexo formado entre as proteínas e o reagente utilizado (Biureto) absorver nesta região. O reagente foi preparado dissolvendo-se 1,5 g de sulfato de cobre penta hidratado e 6,0 g de tartarato duplo de sódio e potássio, em 500 mL de água deionizada. Transferiu-se a solução quantitativamente para um balão volumétrico de 1000 mL. Adicionou-se 300 mL de hidróxido de sódio a 10%, com agitação constante e, então, o volume foi completado para a 1000 mL, sendo em seguida reservado na geladeira. A albumina bovina foi utilizada como substrato a ser hidrolisado pela enzima bromelina. As análises foram feitas em triplicata.

Preparou-se o biorreator com 1000 µL do extrato bruto e 5000 µL de BSA à temperatura de 36°C e no pH 5,7. Imediatamente retirou-se uma alíquota de 1000 µL da amostra que em seguida foi colocada em um tubo de ensaio onde adicionou-se 5000 µL do reagente Biureto. Agitou-se o tubo em Vortex e reservou por 10 minutos. Em seguida fez-se a leitura de absorbância em 540 nm. Retirou-se mais uma alíquota do biorreator, num tempo de 20 minutos após ter sido preparado. Procedeu-se novamente as leituras de absorbância.

A variação da leitura de absorbância a 540 nm entre a análise inicial e final (devido à hidrólise da proteína) foi utilizada no cálculo da atividade enzimática.

A Equação 1 apresenta o cálculo realizado na determinação da atividade enzimática da bromelina.

$$A_{ENZ} = \frac{(((Abs_{inicial} - Abs_{final}) - C_{lin}) / C_{ang}) \cdot d \cdot V_{reacional}}{MM_{PD} \cdot t_1 \cdot V} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde A_{ENZ} é a atividade enzimática da enzima [$\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mL}$] ou [U/mL], d é o fator de diluição (volume total/volume da alíquota), $MMPD$ a massa molar da proteína degradada [g/mol], V o volume de enzima [mL], $V_{\text{reacional}}$ o volume reacional [mL], Ab_{inicial} e Ab_{final} são as leituras inicial e final de absorbância, t_1 o tempo para degradação da proteína [min] e C_{lin} e C_{ang} os coeficientes linear e angular da curva de calibração do reagente Bradford.

A atividade específica, A_{Esp} [$\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$] ou [U/mg], foi expressa como unidades de enzima por quantidade de proteína total, $C_{\text{proteína}}$ [mg/mL], conforme a Equação 2.

$$A_{\text{Esp}} = \frac{A_{\text{ENZ}}}{C_{\text{proteína}}} \quad (\text{Equação 2})$$

4.5 Metodologia aplicada ao estudo da influência de diferentes concentrações de NaCl na atividade da Bromelina obtida de cultivos *in vitro*.

Os experimentos foram realizados de forma inteiramente casualizados com um esquema que consistiu em cinco concentrações de cloreto de sódio (0, 50, 100, 150 e 200 mM), dois explantes da planta (folha e caule) em 60 dias de cultivo *in vitro* como descrita na Figura 7. Assim, o esquema fatorial foi $5 \times 2 \times 1$ com três repetições e quatro amostras por repetição, resultando num total de 12 amostras para cada tratamento. Os dados foram analisados por análise da variância (ANOVA) para avaliar a diferença significativa entre as médias e comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($p \leq 0.05$) usando o software SISVAR[®] para quantificar a variabilidade na média das respostas.

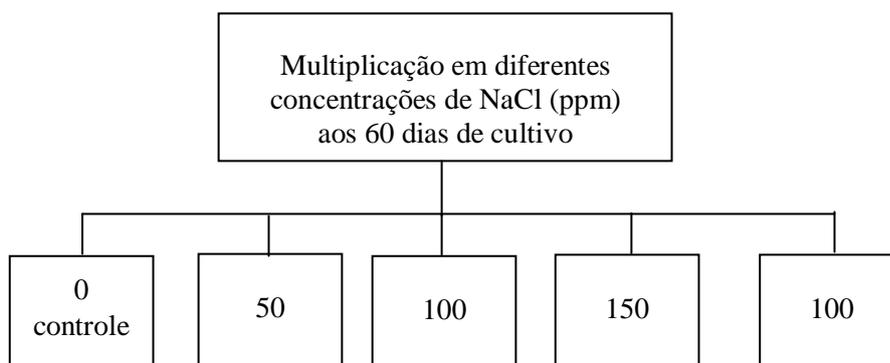


Figura 7. Fluxograma da metodologia aplicada a multiplicação das plantas *in vitro*.

4.6 Metodologia estatística aplicada ao estudo da influência de diferentes concentrações de ANA, BAP e NaCl na atividade da bromelina obtida de cultivos *in vitro*

Para o estudo da influência de diferentes concentrações de ANA, BAP e NaCl na atividade da bromelina foram realizados ensaios dentro de uma conjuntura de planejamento experimental composto central (*Central Composite Design – CCD*) por um fatorial 2^3 com seis pontos axiais e três repetições do ponto central, avaliando-se inicialmente a influência dos reguladores de crescimento e do estresse salino em diferentes tempos de cultivo (60 e 90 dias) bem como sobre o efeito de um subcultivo realizado aos 60 dias dentro de um período total de 90 dias (Figura 8), visando variar as concentrações de ANA (0 à 0,2 ppm), BAP (0 à 2,0 ppm) e NaCl (0 à 150 mM).

Tendo em vista a otimização da atividade da bromelina em três tempos de cultivo, foi realizado um planejamento experimental 2^3 com seis pontos axiais e três repetições do ponto central para cada variável estudada nos respectivos tempos de cultivo – 60 e 90 dias de cultivo direto e um subcultivo de 30. Desta forma, as variáveis foram codificadas de acordo com a Equação 3 para o cálculo estatístico.

$$x_i = (X_i - X_0) / \Delta X_i \quad \text{Eq. (3)}$$

Onde: x_i é o valor da variável independente codificada, X_i é o valor da variável independente real, X_0 é o valor da variável independente real sobre o ponto central e ΔX_i é a variação do valor da variável real.

Sendo assim, o alcance e os níveis das variáveis investigadas neste estudo estão apresentados na Tabela 4. A atividade enzimática (x) e a específica (y) foram tomadas como variáveis dependentes ou respostas dos experimentos enquanto as variáveis independentes foram as concentrações de ANA (x_1), BAP (x_2) e NaCl (x_3). O modelo quadrático para obtenção do ponto otimizado foi expresso de acordo com a equação 4:

$$y(x_1, x_2, x_3) = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 \quad \text{Eq. (4)}$$

Onde: y_1 representa a variável resposta, b_0 é o coeficiente de interceptação, b_1 , b_2 e b_3 os termos lineares, b_{11} , b_{22} e b_{33} os termos quadráticos e x_1 , x_2 e x_3 representam as variáveis estudadas.

Sempre que possível o modelo foi simplificado pela supressão das cláusulas estatisticamente insignificantes. Para avaliar o efeito das variáveis resposta, foi utilizado o programa Statística 8.

Tabela 2. Planejamento fatorial 2^3 das variáveis ANA, BAP e NaCl para atividade enzimática e específica da bromelina.

Tecidos analisados	Variáveis independentes (concentração em ppm e mM)	Símbolos	Alcance e Nível				
			-1,68	-1	0	+1	+1,68
Folha	ANA (ppm)	x_1	0	0,04	0,1	0,159	0,200
	BAP (ppm)	x_2	0	0,40	1,0	1,590	2,000
	NaCl (mM)	x_3	0	30,4	75	119,59	150,00
Caule	ANA (ppm)	x_1	0	0,04	0,1	0,159	0,200
	BAP (ppm)	x_2	0	0,40	1,0	1,590	2,000
	NaCl (mM)	x_3	0	30,4	75	119,59	150,00

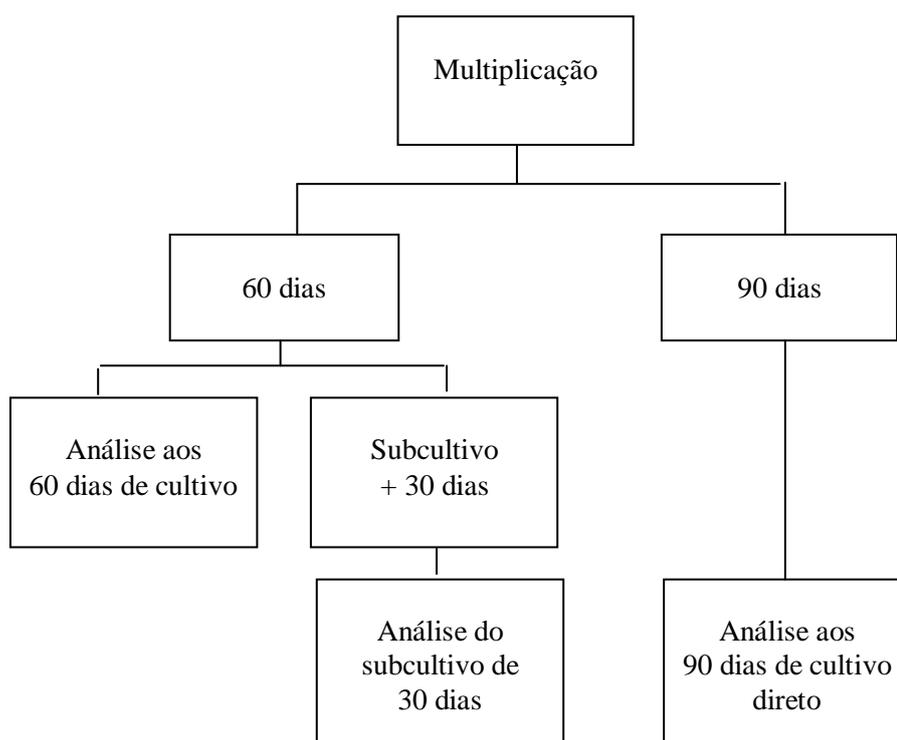


Figura 8. Fluxograma da metodologia utilizada na multiplicação das plantas *in vitro*.

Capítulo 5

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão mostrados inicialmente os resultados obtidos para o estudo comportamental da enzima bromelina frente ao estresse salino (NaCl), o qual foi tido como experimento preliminar, bem como os resultados obtidos no estudo seguinte com o foco direcionado as significâncias das variáveis independentes relacionadas aos reguladores de crescimento ANA e BAP bem como ao NaCl. Para isto, primeiramente, fez-se um estudo abordando a influência das concentrações salinas na enzima estipulando, assim, uma melhor faixa de trabalho para então dar continuidade ao estudo dos fatores que podem de alguma forma interferir na atividade dessa enzima, avaliando-se a influência dos reguladores de crescimento e do estresse salino em diferentes tempos de cultivo (60 e 90 dias) bem como sobre o efeito de um subcultivo realizado aos 60 dias dentro de um período total de 90 dias.

5.1 Influência de diferentes concentrações de NaCl na atividade da Bromelina obtida de mudas de abacaxizeiro cultivadas *in vitro*

Inicialmente foram realizados testes preliminares de comportamento da enzima bromelina sob estresse salino numa faixa que variou de 0 a 200 mM de NaCl, sem a presença dos reguladores de crescimento, ANA e BAP, aos 60 dias de cultivo *in vitro*. Os resultados deste estudo serviram como base na escolha da faixa de trabalho do NaCl à ser utilizada na continuidade do trabalho, quando foi estudado a influência dos reguladores de crescimento e estresse salino na atividade da bromelina.

5.1.1 Atividade Enzimática

A Tabela 3 apresenta os valores obtidos de atividade enzimática da bromelina em folhas e caules de abacaxi cv. Pérola desenvolvidos *in vitro* em diferentes concentrações de NaCl (0, 50, 100, 150 e 200 mM). De acordo com a análise de variância realizada sobre os resultados (Tabela 3) foi verificado que a atividade da bromelina variou significativamente ($p < 0,05$) entre folhas e caules. Houve, também, interação significativa entre as concentrações e as respectivas partes da planta (folha e caule).

Na análise realizada nos resultados da Tabela 3, o coeficiente de variação foi de 12,8%, indicando que houve um controle adequado das condições experimentais. Além disso, os resultados obtidos corroboram com aqueles já apresentados na literatura, os quais salientam que tecidos de abacaxizeiro *in vitro* apresentam bromelinas bioquimicamente ativas (VILANOVA-NETA et al., 2012; LEITE et al., 2012; PIZA et al., 2001 e 2002).

Entretanto, neste estudo foi possível também verificar que a atividade da bromelina em folhas e caules de plantas de abacaxizeiro provavelmente se relaciona de modo positivo com as condições de estresse inicialmente causada pelo próprio cultivo *in vitro*, o que é evidenciado no controle onde se obteve uma alta atividade da enzima. Esta observação referente ao estresse causado pelas condições de cultivo vem de acordo com dados da literatura onde este estresse já foi apresentado como condição existente (PIZA et al., 2003). Entretanto, fica evidente que o teor de salinidade também interferiu na atividade dessa enzima, uma vez que o maior valor de atividade ocorreu em meio salino (Tabela 3).

Tabela 3. Atividade enzimática da bromelina (U/mL) obtidas em folhas e caules de abacaxi cv. Pérola produzidas *in vitro*.

Partes da Planta	Tratamentos* (Concentração de NaCl, mM)				
	Controle	50	100	150	200
Folha	0,0044 aA	0,0018 bA	0,0014 bB	0,0002 cB	0,0007 cA
Caule	0,00241 cB	0,0013 bB	0,0075 aA	0,0023 bA	0,0008 cA

* médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem significativamente pelo teste de Tukey, a 5%.

Observou-se que em tecidos do caule os valores de atividade enzimática foram estatisticamente superior na concentração salina de 100 mM de NaCl (5,84 g/L) quando comparado aos demais tratamentos aplicados; enquanto que em tecidos de folha os valores mais significativos foram obtidos no tratamento controle, ou seja, 0 mM de NaCl. Na maior concentração salina avaliada (200 mM de NaCl) os valores de atividade enzimática foram bastante reduzidos, em ambos os tecidos da planta, bem como na condição de 150 mM para a folha, inclusive não diferindo estatisticamente entre os respectivos valores (Tabela 3).

Piza *et al.* (2002), estudando a caracterização de plantas de abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merrill) cv. Smooth Cayenne, cultivadas *in vitro* em meio salino, concluíram que aos 60 dias de cultivo ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos com diminuição constante da atividade enzimática da bromelina conforme o nível de salinidade foi aumentado. Conforme observado em nossos resultados, o comportamento obtido foi similar aos dados descritos por Piza *et al.* (2002) quando em folhas de abacaxizeiro. Deste modo, conforme apresentados na Tabela 3, uma provável explicação para a diminuição da atividade nas folhas à medida que se aumentou a concentração salina é que durante o período em que a planta ficou submetida ao elevado estresse salina uma provável diminuição drástica da clorofila e carotenóides totais das folhas tenham ocorrido, fazendo com que elas desenvolvessem clorose e, por consequencia, diminuição dos nutrientes para a planta bem como redução de toda sua cadeia metabólica, com queda e/ou alteração das folhas (HERNANDEZ *et al.*, 1999; GADALLAH, 1999; AGASTIAN *et al.*, 2000) (Figura 9).

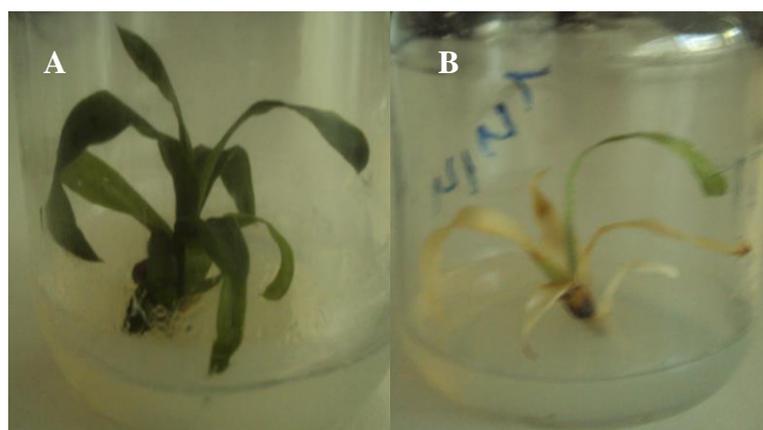


Figura 9. Plantas micropropagadas em condição de salinidade: A - salinidade moderada sem sintomas de clorose; B - elevado estresse salino (150 e 200 mM NaCl) com sintomas de clorose desenvolvidos.

Entretanto, o comportamento obtido nas atividades enzimáticas de bromelina em caules pode ser comparado a trabalhos publicados na literatura e realizados com a enzima peroxidase. Piza *et al.* (2003) observaram que plantas expostas à salinidade tiveram maior tendência de aumento da atividade de peroxidase quando comparadas com o controle (amostra sem adição de NaCl).

Ainda segundo estes autores (PIZA *et al.*, 2003), aos 60 dias, plantas sob efeito da maior concentração salina (2,30 g/L) apresentaram maior atividade enzimática da peroxidase justamente quando as plantas mostraram emissão desordenada de novos brotos e ausência de enraizamento, comportamento similar ao obtido neste trabalho quando na concentração de 100 mM. Além disso, Converso *et al.* (1997) também relataram variações na atividade e na expressão da peroxidase como resultado do estresse salino em plantas de trigo, onde as raízes foram mais tolerantes à salinidade e apresentaram os mais altos valores de atividade quando comparados com folhas e caules, as quais mostraram sinais de clorose em altas salinidades. Esse processo de clorose, também observado no nosso estudo, em algumas plantas submetidas às mais altas concentrações de cloreto de sódio, acabou por levá-las à morte, impossibilitando, assim, análises em tempos de cultivo mais prolongados.

5.1.2 Concentração de Proteína Total

Os resultados da salinidade em plantas propagadas *in vitro* de abacaxizeiro em relação aos teores de proteínas totais estão apresentados na Tabela 4, juntamente a análise de teste de Tukey. A análise de variância indicou que a concentração de proteína total não variou significativamente ($p < 0,05$) entre folhas e caules de abacaxizeiro desenvolvidos *in vitro*, indicando ainda uma interação significativa entre os diferentes tratamentos aplicados bem como destes com as partes da planta utilizada. O coeficiente de variação de 16,2% indica que houve um controle adequado das condições experimentais.

Tabela 4. Concentração de Proteína Total (U/g) em folhas e caules de abacaxi cv. Pérola produzidas *in vitro*.

Partes da Planta	Tratamentos* (Concentração de NaCl, mM)				
	Controle	50	100	150	200
Folha	6,353 cA	10,174 bA	2,199 dA	17,093 aA	8,465 bcB
Caule	5,940 cA	5,303 cdB	2,815 dA	11,189 bB	18,292 aA

* médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem significativamente pelo teste de Tukey, a 5%.

Pelos resultados da Tabela 4, foi também possível perceber a influência dos tratamentos sobre a concentração de proteínas totais nas folhas e caules de abacaxi cv. Pérola, cultivadas *in vitro*, uma vez que esses tecidos mostraram comportamentos similares na maioria das concentrações sendo opostos, apenas, na concentração de 50 e 200 mM. Na condição de 50 mM, tecidos de folha apresentaram aumento na concentração de proteínas totais, enquanto que no caule houve uma manutenção no valor frente aos resultados iniciais (valor controle, 0 mM de NaCl). Na concentração de 200 mM, foi possível perceber um comportamento contrário, ou seja, redução na concentração de proteínas totais quando em folhas, e aumento em tecidos de caule quando comparados aos valores obtidos na condição de 150 mM (NaCl). Essa diminuição em tecidos de folha e aumento em tecidos de caule, na máxima concentração salina, pode ser explicado pelo efeito protetor da planta em relação ao caule, que acaba por deixar as folhas mais susceptíveis aos danos causados pelo sal.

Nesse contexto, na comparação dos tratamentos 150 e 200 mM de NaCl, o comportamento da concentração de proteínas totais comportou-se de forma bastante interessante quanto à condição de salinidade, uma vez que observou-se um decréscimo acentuado no teor de proteínas totais quando avaliado para a folha e um acréscimo acentuado quando avaliado para o caule. Esse decréscimo observado para as folhas quando na concentração mais elevada de NaCl indica, provavelmente, uma inibição da síntese protéica, uma vez que, Martinez e Cerda (1989), estudando o estresse iônico produzido pelo NaCl em folhas de tomate concluíram que esse processo interferiu no transporte de nitrato dos vacúolos para o citoplasma, diminuindo assim a capacidade das células em incorporar nitrogênio (nitrato) para o crescimento e principalmente para a síntese de proteínas.

Em função dos danos causados na planta, a degradação proteolítica de proteínas sob condições de estresse salino tem sido largamente estudada (YANG e KAO, 2000; LIN e KAO, 2001; LIN *et al.*, 2002). Diversos autores têm relatado a diminuição nos teores de proteínas solúveis nas folhas em resposta à salinidade (ALAMGIR e ALI, 1999; GADALLAH, 1999; WANG e NIL, 2000; MUTHUKUMARASAMY *et al.*, 2000; PARIDA *et al.*, 2002). Agastian *et al.* (2000) relataram aumento no teor de proteínas solúveis em baixa salinidade e diminuição em alta salinidade quando em estudos com frutos de amora.

No entanto, Bernstein *et al.* (2010), estudando a resposta das plantas à salinidade na cultura do milho (*Zea mays* L.), observaram que o teor de proteína nas folhas foi significativamente maior sob salinidade, e que o aumento de proteína, induzido pela salinidade, foi maior na base da folha que na zona de alongamento, onde o teor de proteínas foi mais baixo.

Brilhante *et al.* (2007) também observaram aumento significativo na concentração de proteínas solúveis nas folhas das plantas aclimatadas em relação ao tempo de exposição ao estresse salino, concordando com os dados apresentados nesse estudo.

Assim, é possível concluir que a salinidade tem um efeito positivo na concentração de proteínas, tanto em folhas como em caules, uma vez que os maiores teores de proteína foram encontrados em meio salinos, em especial na condição de 150 mM NaCl em ambas partes das plantas avaliadas (caule e folha).

5.1.3 Atividade específica

Em relação aos dados de atividade específica, pela análise de variância ($p < 0,05$), foi possível verificar que a atividade específica da bromelina variou significativamente entre os tecidos avaliados, bem como nos diferentes tratamentos aplicados (Tabela 4). O coeficiente de variação de 15,85% indica que houve um controle adequado das condições experimentais.

Tabela 5. Atividade específica da bromelina (U/mg) em folhas e caules de abacaxi cv. Pérola produzidas *in vitro*.

Partes da Planta	Tratamentos* (Concentração de NaCl, mM)				
	Controle	50	100	150	200
Folha	0,000655 aA	0,000213 bA	0,000623 aB	0,000015 cB	0,000090 bcA
Caule	0,000405 bB	0,000243 bcA	0,00268 aA	0,00022 cA	0,000048 dA

* médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem significativamente pelo teste de Tukey, a 5%.

Sendo a atividade enzimática e específica parâmetros principais para avaliação da qualidade e do valor comercial da bromelina, torna-se importante salientar que, do mesmo modo que para a atividade enzimática (Tabela 2), a maior atividade específica (Tabela 4) foi encontrada em concentração salina correspondente a 100 mM, observando-se ainda que os tratamentos correspondentes às duas maiores concentrações salinas tiveram um efeito depressivo na atividade específica da enzima. Nesta condição, tanto a atividade específica quanto a proteolítica foram estatisticamente inferiores nos dois tecidos avaliados.

Vilanova-Neta *et al.* (2012), analisando o efeito das diferentes condições de cultivo *in vitro* na atividade da enzima, observaram um perfil de comportamento semelhante entre a atividade enzimática e específica da bromelina, em tecidos da cv. Pérola. Em condições de campo, Costa *et al.* (2007) também observaram que o comportamento da atividade específica das enzimas em caules das cvs. Vitória e Smooth Cayenne foram semelhantes ao comportamento da atividade proteolítica. Estes resultados estão de acordo com os obtidos neste trabalho, onde os perfis das atividades enzimática e específica foram análogos.

5.2 Influência de diferentes concentrações de ANA, BAP e NaCl na atividade da bromelina obtida de cultivos *in vitro*

Conforme observado nos resultados obtidos anteriores, relacionados ao estresse salino e sua influência sobre a obtenção de bromelina, na continuidade deste estudo foi utilizado a faixa de 0 à 150 mM de NaCl para análise da influência do estresse salino de forma conjunta com reguladores, ANA e BAP.

Assim, foram realizados ensaios dentro de uma conjuntura de planejamento experimental composto por um fatorial 2^3 com seis pontos axiais e três repetições do ponto central, conforme descritos no item *Materiais e Métodos*, avaliando-se inicialmente a influência dos reguladores de crescimento e do estresse salino em diferentes tempos de cultivo (60 e 90 dias) bem como sobre o efeito de um subcultivo realizado aos 60 dias dentro de um período total de 90 dias, uma vez que a troca do meio de cultura da planta pode vir a fornecer nutrientes essenciais à planta quando em prolongados períodos de cultivo.

5.2.1 Influência dos reguladores de crescimento e do estresse salino na atividade de bromelina em diferentes tempos de cultivo (60 e 90 dias)

A influência dos reguladores de crescimento e do estresse salino nas atividades enzimáticas e específicas de bromelina em diferentes tempos de cultivo *in vitro* (60 e 90 dias), obtidas em tecidos de folha e caule, estão apresentados nas Tabelas 6, 7, 8 e 9, conforme matriz de planejamento fatorial 2^3 .

De acordo com os dados obtidos (Tabelas 6, 7, 8 e 9), pode-se observar que os maiores valores de atividade enzimática e específica da bromelina, entre os respectivos tecidos e tempos de cultivos *in vitro* avaliados, foram de 0,0093 U/mL e 0,0018 U/mg para a folha (Tabela 5), e 0,0091 U/mL e 0,0016 U/mg para o caule (Tabela 7) aos 60 dias de cultivo; enquanto aos 90 dias de cultivo foram obtidos valores correspondentes a 0,0088 U/mL e 0,0012 U/mg para a folha (Tabela 6) e, 0,0095 U/mL e 0,0037 U/mg para o caule (Tabela 8).

Como observado nas Tabelas 6 e 7 as maiores atividades, tanto a atividade enzimática como a específica, da bromelina para os tecidos de folha, aos 60 dias de cultivo, foram encontradas no ensaio onde todas as concentrações das variáveis em estudo (ANA, BAP e NaCl) estiveram em seus menores valores porém ainda presentes no meio, enquanto que aos 90 dias de cultivo, os maiores valores de atividades da bromelina para os tecidos de folha foram obtidos nos ensaios com os níveis próximos aqueles aos de máxima concentração avaliada de ANA e NaCl com a condição de mínima presença de BAP.

Para os valores relacionados ao tecido de caule, como observado nas Tabelas 8 e 9 as maiores atividades, tanto a atividade enzimática como a específica, da bromelina aos 60 dias de cultivo foram encontradas no ensaio onde todas as concentrações das variáveis em estudo (ANA, BAP e NaCl) estiveram com seus níveis próximos aqueles de máxima concentração, enquanto que aos 90 dias de cultivo, os maiores valores de atividades da bromelina para os tecidos de caule foram obtidos nos ensaios com os níveis centrais, conforme planejamento experimental.

Por meio desta análise, ainda sem a aplicação da estatística, torna-se possível verificar uma equivalência com os resultados apresentados nos estudos preliminares de estresse salino frente a obtenção de bromelina aos 60 dias de cultivo, onde verifica-se que a atividade enzimática da bromelina foi maior quando utilizando-se meio salino quando em tecido de caule, enquanto em tecido de folha o estudo apresentou maior atividade no controle, meio sem adição de NaCl. Assim, nos dados apresentados no estudo relacionando ambos os reguladores com o estresse salino verificou-se o maior valor de atividade enzimática com seus níveis próximos aqueles de máxima concentração, enquanto para as folhas a maior atividade enzimática foi para os pontos de menores valores, porém ainda presentes no meio, uma vez que a presença de reguladores em concentrações distintas daquelas utilizadas no estudo preliminar provavelmente alteraram condições de obtenção enzimática das plantas.

Tabela 6. Matriz do planejamento fatorial 2³ (valores codificados e reais) com respostas da atividade enzimática e específica, aos 60 dias de cultivo *in vitro* em tecidos de folha de abacaxizeiro.

Ensaio	ANA (ppm)	BAP (ppm)	NaCl (mM)	Atividade Enzimática (U/mL)	Atividade Específica (U/mg)
1	-1 (0,040)	-1 (0,400)	-1 (30,400)	0,0093	0,0018
2	-1 (0,040)	-1 (0,400)	1 (119,59)	0,0060	0,0009
3	-1 (0,040)	+1 (1,59)	-1 (30,400)	0,0075	0,0019
4	-1 (0,040)	+1 (1,59)	1 (119,59)	0,0056	0,0015
5	+1 (0,159)	-1 (0,400)	-1 (30,400)	0,0023	0,0005
6	+1 (0,159)	-1 (0,400)	1 (119,59)	0,0059	0,0013
7	+1 (0,159)	+1 (1,59)	-1 (30,400)	0,0044	0,0009
8	+1 (0,159)	+1 (1,59)	1 (119,59)	0,0084	0,0014
9	-1,68 (0)	0 (1,00)	0 (75,00)	0,0058	0,0013
10	1,68 (0,200)	0 (1,00)	0 (75,00)	0,0035	0,0010
11	0 (0,100)	-1,68 (0)	0 (75,00)	0,0064	0,0009
12	0 (0,100)	1,68 (2,000)	0 (75,00)	0,0083	0,0016
13	0 (0,100)	0 (1,000)	-1,68 (0,00)	0,0064	0,0013
14	0 (0,100)	0 (1,000)	1,68 (150,00)	0,0040	0,0007
15	0 (0,100)	0 (1,000)	0 (75,00)	0,0039	0,0007
16	0 (0,100)	0 (1,000)	0 (75,00)	0,0039	0,0007
17	0 (0,100)	0 (1,000)	0 (75,00)	0,0039	0,0007

Tabela 7. Matriz do planejamento fatorial 2³ (valores codificados e reais) com respostas da atividade enzimática e específica, aos 90 dias de cultivo *in vitro* em tecidos de folha de abacaxizeiro.

Ensaio	ANA (ppm)	BAP (ppm)	NaCl (mM)	Atividade Enzimática (U/mL)	Atividade Específica (U/mg)
1	-1 (0,040)	-1 (0,400)	-1 (30,400)	0,0051	0,0008
2	-1 (0,040)	-1 (0,400)	+1 (119,59)	0,0034	0,0005
3	-1 (0,040)	+1 (1,59)	-1 (30,400)	0,0044	0,0007
4	-1 (0,040)	+1 (1,59)	+1 (119,59)	0,0036	0,0005
5	+1 (0,159)	-1 (0,400)	-1 (30,400)	0,0036	0,0005
6	+1 (0,159)	-1 (0,400)	+1 (119,59)	0,0088	0,0012
7	+1 (0,159)	+1 (1,59)	-1 (30,400)	0,0021	0,0003
8	+1 (0,159)	+1 (1,59)	+1 (119,59)	0,0028	0,0004
9	-1,68 (0)	0 (1,00)	0 (75,00)	0,0021	0,0003
10	+1,68 (0,200)	0 (1,00)	0 (75,00)	0,0045	0,0006
11	0 (0,100)	-1,68 (0)	0 (75,00)	0,0053	0,0008
12	0 (0,100)	+1,68 (2,000)	0 (75,00)	0,0050	0,0009
13	0 (0,100)	0 (1,000)	-1,68 (0,00)	0,0036	0,0008
14	0 (0,100)	0 (1,000)	+1,68 (150,00)	0,0041	0,0010
15	0 (0,100)	0 (1,000)	0 (75,00)	0,0027	0,0008
16	0 (0,100)	0 (1,000)	0 (75,00)	0,0026	0,0008
17	0 (0,100)	0 (1,000)	0 (75,00)	0,0027	0,0008

Tabela 8. Matriz do planejamento fatorial 2³ (valores codificados e reais) com respostas da atividade enzimática e específica, aos 60 dias de cultivo *in vitro* em tecidos de caule de abacaxizeiro.

Ensaio	ANA (ppm)	BAP (ppm)	NaCL (mM)	Atividade Enzimática (U/mL)	Atividade Específica (U/mg)
1	-1 (0,040)	-1 (0,400)	-1 (30,400)	0,0071	0,0010
2	-1 (0,040)	-1 (0,400)	+1 (119,59)	0,0057	0,0009
3	-1 (0,040)	+1 (1,59)	-1 (30,400)	0,0026	0,0005
4	-1 (0,040)	+1 (1,59)	+1 (119,59)	0,0044	0,0007
5	+1 (0,159)	-1 (0,400)	-1 (30,400)	0,0064	0,0011
6	+1 (0,159)	-1 (0,400)	+1 (119,59)	0,0043	0,0008
7	+1 (0,159)	+1 (1,59)	-1 (30,400)	0,0069	0,0013
8	+1 (0,159)	+1 (1,59)	+1 (119,59)	0,0092	0,0018
9	-1,68 (0)	0 (1,00)	0 (75,00)	0,0047	0,0008
10	+1,68 (0,200)	0 (1,00)	0 (75,00)	0,0078	0,0016
11	0 (0,100)	-1,68 (0)	0 (75,00)	0,0028	0,0004
12	0 (0,100)	+1,68 (2,000)	0 (75,00)	0,0028	0,0005
13	0 (0,100)	0 (1,000)	-1,68 (0,00)	0,0065	0,0010
14	0 (0,100)	0 (1,000)	+1,68 (150,00)	0,0054	0,0008
15	0 (0,100)	0 (1,000)	0 (75,00)	0,0036	0,0005
16	0 (0,100)	0 (1,000)	0 (75,00)	0,0037	0,0005
17	0 (0,100)	0 (1,000)	0 (75,00)	0,0036	0,0005

Tabela 9. Matriz do planejamento fatorial 2³ (valores codificados e reais) com respostas da atividade enzimática e específica, aos 90 dias de cultivo *in vitro* em tecidos de caule de abacaxizeiro.

Ensaio	ANA (ppm)	BAP (ppm)	NaCL (mM)	Atividade Enzimática (U/mL)	Atividade Específica (U/mg)
1	-1 (0,040)	-1 (0,400)	-1 (30,400)	0,0029	0,0006
2	-1 (0,040)	-1 (0,400)	+1 (119,59)	0,0060	0,0011
3	-1 (0,040)	+1 (1,59)	-1 (30,400)	0,0058	0,0007
4	-1 (0,040)	+1 (1,59)	1 (119,59)	0,0058	0,0008
5	+1 (0,159)	-1 (0,400)	-1 (30,400)	0,0032	0,0006
6	+1 (0,159)	-1 (0,400)	+1 (119,59)	0,0045	0,0007
7	+1 (0,159)	+1 (1,59)	-1 (30,400)	0,0078	0,0015
8	+1 (0,159)	+1 (1,59)	+1 (119,59)	0,0043	0,0007
9	-1,68 (0)	0 (1,00)	0 (75,00)	0,0057	0,0010
10	+1,68 (0,200)	0 (1,00)	0 (75,00)	0,0050	0,0009
11	0 (0,100)	-1,68 (0)	0 (75,00)	0,0023	0,0007
12	0 (0,100)	+1,68 (2,000)	0 (75,00)	0,0055	0,0018
13	0 (0,100)	0 (1,000)	-1,68 (0,00)	0,0064	0,0015
14	0 (0,100)	0 (1,000)	+1,68 (150,00)	0,0079	0,0018
15	0 (0,100)	0 (1,000)	0 (75,00)	0,0095	0,0037
16	0 (0,100)	0 (1,000)	0 (75,00)	0,0095	0,0037
17	0 (0,100)	0 (1,000)	0 (75,00)	0,0095	0,0037

Assim, na sequência do trabalho, e visando verificar o nível de significância entre as variáveis estabelecidas, os dados obtidos junto aos experimentos anteriores (Tabelas 6 a 9) foram avaliados estatisticamente por intermédio de análise de variância (tabelas ANOVA) e realizados testes de *Student* e *Fisher*.

O teste estatístico de *Fisher* (F) para análise de variância foi empregado para a determinação das variáveis significativas, para as quais o grau de significância foi classificado com base no valor de F . Quanto maior for a magnitude do valor de F , menor será o valor da probabilidade (p) e mais significativos serão os modelos correspondentes bem como o coeficiente individual. Além disso, o valor de p serve como uma ferramenta para verificar o significado de cada um dos coeficientes, que também indica a força da interação de cada parâmetro. Os baixos valores de p , inferiores a 0,05, indicam a correlação mais significativa dos coeficientes, uma vez que quanto menor o valor p maior a significância do coeficiente correspondente (BOX, 1998). Assim, neste estudo, esses efeitos significativos estão representados pelos respectivos diagramas de Pareto e por análises de ANOVA, bem como por intermédio de gráficos de Superfície, que serão apresentados e avaliados a seguir.

As Tabelas 10, 11, 12 e 13 apresentam os valores encontrados para as análises de ANOVA para a atividade enzimática em tecidos de folha e caule aos 60 e aos 90 dias, respectivamente, e as Tabelas 14, 15, 16 e 17 para as análises de atividade específica em tecidos de folha e caule aos 60 e aos 90 dias, respectivamente; sendo indicados com o símbolo asterisco (*) os fatores significativos obtidos a partir do teste de *Fisher*. Nestes fatores significativos, indicados pelo valor de p menor que 0,05, existem diferenças estatisticamente comprovadas entre escolher como condição para o processo de obtenção do produto o nível maior ou menor das respectivas variáveis (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

As Figuras de 10 a 13 apresentam os diagramas de Pareto com os efeitos absolutos das variáveis independentes utilizadas neste estudo de atividade enzimática da bromelina obtidas em tecidos de folha e caule aos 60 e aos 90 dias, respectivamente. Enquanto que as Figuras de 14 a 17 mostram os diagramas de Pareto com os efeitos absolutos das variáveis independentes utilizadas neste estudo de atividade específica da bromelina obtidas em tecidos de folha e caule aos 60 e aos 90 dias, respectivamente. Estes efeitos são mostrados pelos diagramas de Pareto, através do teste de *Student* que por sua vez demonstram a significância da variável quando seu valor é maior que o valor de p (0,05).

Nesse sentido, para a atividade enzimática foi possível verificar um efeito significativo de todas as variáveis estudadas com p menor que 0,05 em tecidos de folhas aos 60 dias e caule aos 90 dias (60 e 90 dias) de cultivo *in vitro* (Tabelas 10 e 13; Figuras 10 e 13).

Na Tabela 12, relacionado a atividade enzimática obtida das folhas aos 90 dias de cultivo, foi verificado como significativo somente o efeito do BAP, enquanto que no caule aos 60 dias, somente o BAP não foi significativo (Tabela 11 e 12; Figura 11 e 12). Quanto às interações entre as variáveis, em tecidos de folhas foi possível verificar interação significativa entre as variáveis ANA e BAP e ANA e NaCl aos 60 dias e entre ANA e NaCl aos 90 dias, enquanto em tecidos de caule verificou-se interação significativa entre ANA e BAP e BAP e NaCl aos 60 dias e entre ANA e NaCl e BAP e NaCl aos 90 dias (Tabelas 10-13; Figuras 10-13).

Para a atividade específica foi observado comportamento similar no que diz respeito a significância das variáveis, exceto para a folha aos 90 dias onde somente ANA teve significância e aos 60 dias o NaCl não foi significativo. A única interação significativa, para a atividade específica obtida das folhas, em ambos os tempos de cultivo, foi ANA e NaCl enquanto para o caule somente houve interação significativa aos 60 dias entre BAP e NaCl (Tabelas 14 a 17; Figuras 14 a 17).

Salienta-se que todos os resultados apresentados acima e relacionados a Tabela ANOVA foram verificados em relação ao sua significância ao nível de confiança de 95% a partir da análise de variância, denotada pela importância do modelo quando p menor que 0,05.

Tabela 10. ANOVA para atividade enzimática (U/mL) em tecidos de folha aos 60 dias de cultivo *in vitro*.

Fatores	SQ	GL	MQ	F	p
(1)ANA (ppm) (L)	0,000010	1	0,000010	16,09464	0,005113*
ANA (ppm) (Q)	0,000001	1	0,000001	2,18224	0,183132
(2)BAP (ppm) (L)	0,000002	1	0,000002	3,62453	0,098650
BAP (ppm) (Q)	0,000019	1	0,000019	31,16436	0,000831*
(3)NaCl (mM) (L)	0,000000	1	0,000000	0,38212	0,556044
NaCl (mM) (Q)	0,000003	1	0,000003	5,62276	0,049516*
1L by 2L	0,000006	1	0,000006	9,43858	0,018011*
1L by 3L	0,000021	1	0,000021	34,39401	0,000621*
2L by 3L	0,000000	1	0,000000	0,75008	0,415146
Error	0,000004	7	0,000001		
Total SS	0,000062	16			

$R^2 = 0,93$; GL = GRAUS DE LIBERDADE; SQ = SOMA QUADRÁTICA; MQ = MÉDIA QUADRÁTICA;
 F = TESTE DE FISHER; P = PROBABILIDADE
 Nível de significância: *95%

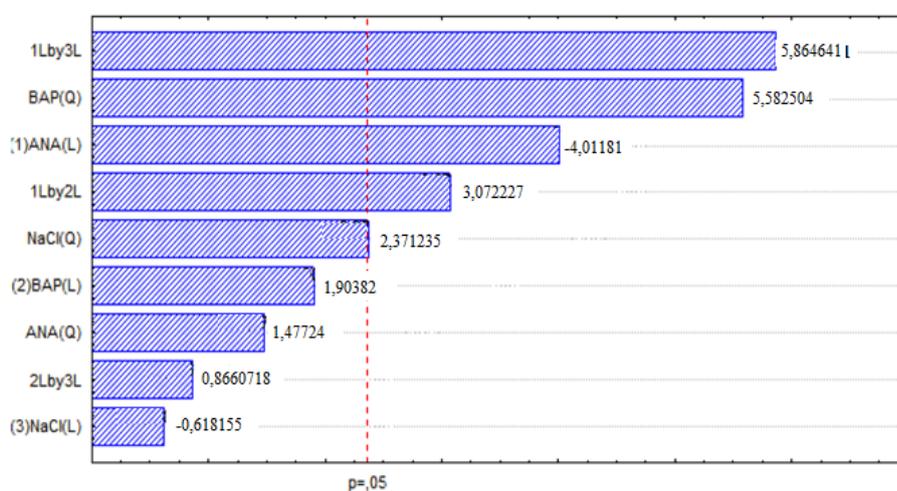


Figura 10. Diagrama de Pareto dos efeitos absolutos das variáveis independentes manipuladas para a atividade enzimática em tecidos de folha aos 60 dias de cultivo *in vitro*.

Tabela 11. ANOVA para atividade enzimática (U/mL) em tecidos de caule aos 60 dias de cultivo *in vitro*.

Fatores	SQ	GL	MQ	F	p
(1)ANA (ppm) (L)	0,000011	1	0,000011	28,89595	0,001035*
ANA (ppm) (Q)	0,000013	1	0,000013	36,66941	0,000513*
(2)BAP (ppm) (L)	0,000000	1	0,000000	0,07054	0,798208
BAP (ppm) (Q)	0,000000	1	0,000000	0,52980	0,490314
(3)NaCl (mM) (L)	0,000000	1	0,000000	0,38380	0,555199
NaCl (mM) (Q)	0,000011	1	0,000011	30,32893	0,000900*
1L by 2L	0,000016	1	0,000016	42,89939	0,000319*
1L by 3L	0,000000	1	0,000000	0,01743	0,898672
2L by 3L	0,000007	1	0,000007	19,60316	0,003053*
Error	0,000003	7	0,000000		
Total SS	0,000060	16			

$R^2 = 0,96$; GL = GRAUS DE LIBERDADE; SQ = SOMA QUADRÁTICA; MQ = MÉDIA QUADRÁTICA;
 F = TESTE DE FISHER; p = PROBABILIDADE
 Nível de significância: *95%

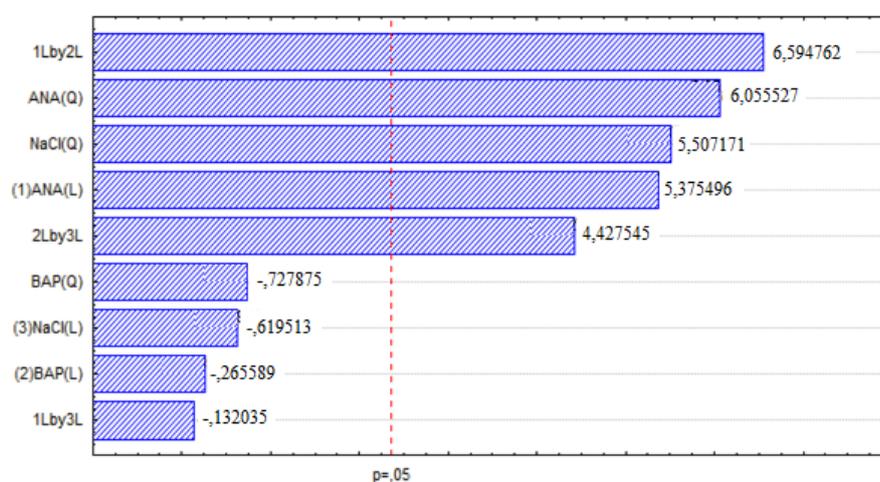


Figura 11. Diagrama de Pareto dos efeitos absolutos das variáveis independentes manipuladas para a atividade enzimática (U/mL) em tecidos de caule aos 60 dias de cultivo *in vitro*.

Tabela 12. ANOVA para atividade enzimática (U/mL) em tecidos de folha aos 90 dias de cultivo *in vitro*.

Fatores	SQ	GL	MQ	F	p
(1)ANA (ppm)(L)	0,000002	1	0,000002	1,530003	0,255996
ANA (ppm)(Q)	0,000001	1	0,000001	0,480177	0,510671
(2)BAP (ppm)(L)	0,000005	1	0,000005	4,625205	0,068550
BAP (ppm)(Q)	0,000009	1	0,000009	7,838441	0,026535*
(3)NaCl (mM)(L)	0,000001	1	0,000001	1,252134	0,300068
NaCl (mM)(Q)	0,000002	1	0,000002	1,770572	0,225019
1L by 2L	0,000006	1	0,000006	5,260205	0,055519
1L by 3L	0,000009	1	0,000009	7,854377	0,026427*
2L by 3L	0,000002	1	0,000002	1,427480	0,271082
Error	0,000008	7	0,000001		
Total SS	0,000043	16			

$R^2 = 0,81$; GL = GRAUS DE LIBERDADE; SQ = SOMA QUADRÁTICA; MQ = MÉDIA QUADRÁTICA;
 F = TESTE DE FISHER; p = PROBABILIDADE
 Nível de significância: *95%

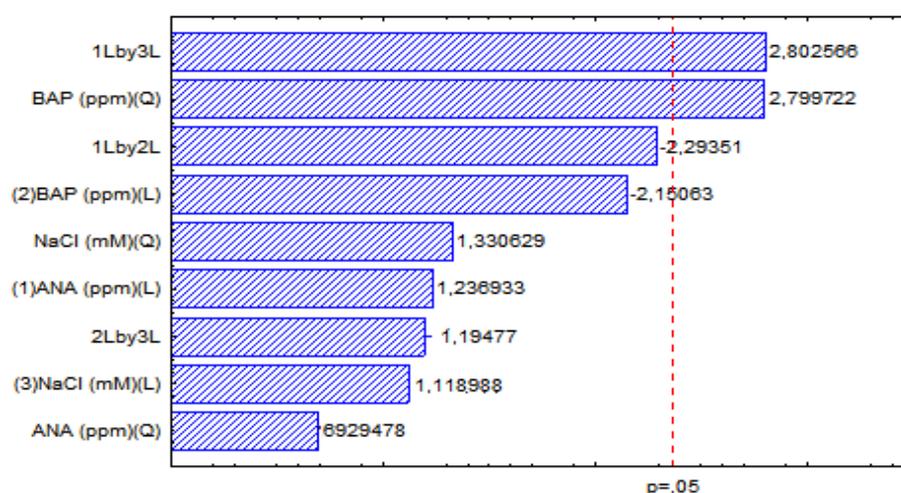


Figura 12. Diagrama de Pareto dos efeitos absolutos das variáveis independentes manipuladas para a atividade enzimática (U/mL) em tecidos de folha aos 90 dias de cultivo *in vitro*.

Tabela 13. ANOVA para atividade enzimática (U/mL) em tecidos de caule aos 90 dias de cultivo *in vitro*.

Fatores	SQ	GL	MQ	F	p
(1)ANA (ppm)(L)	0,000000	1	0,000000	1,6012	0,246219
ANA (ppm)(Q)	0,000025	1	0,000025	185,2754	0,000003*
(2)BAP (ppm)(L)	0,000012	1	0,000012	87,6374	0,000033*
BAP (ppm)(Q)	0,000046	1	0,000046	339,1207	0,000000*
(3)NaCl (mM)(L)	0,000001	1	0,000001	6,7386	0,035638*
NaCl (mM)(Q)	0,000008	1	0,000008	62,8790	0,000096*
1L by 2L	0,000000	1	0,000000	2,3663	0,167869
1L by 3L	0,000003	1	0,000003	25,3052	0,001513*
2L by 3L	0,000008	1	0,000008	56,7428	0,000134*
Error	0,000001	7	0,000000		
Total SS	0,000043	16			

$R^2 = 0,98$; GL = GRAUS DE LIBERDADE; SQ = SOMA QUADRÁTICA; MQ = MÉDIA QUADRÁTICA;
 F = TESTE DE FISHER; P = PROBABILIDADE
 Nível de significância: *95%

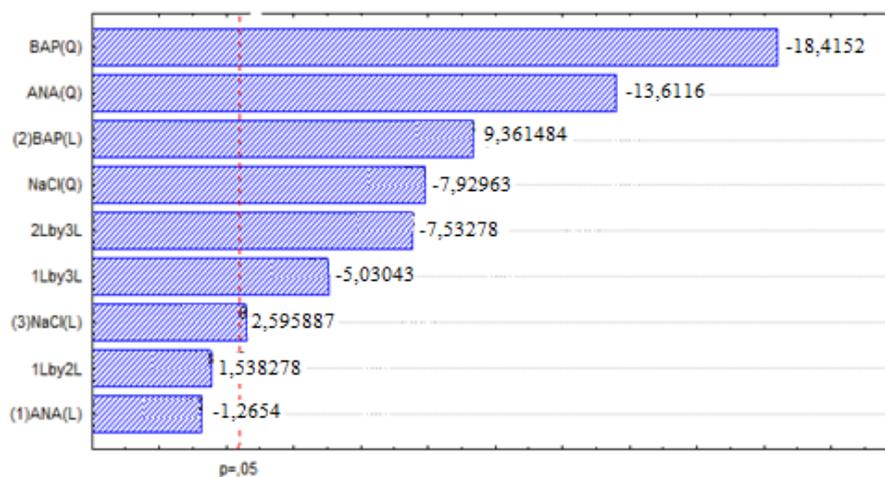


Figura 13. Diagrama de Pareto dos efeitos absolutos das variáveis independentes manipuladas para a atividade enzimática (U/mL) em tecidos de caule aos 90 dias de cultivo *in vitro*.

Tabela 14. ANOVA para a atividade específica (U/mg) em tecidos de folha aos 60 dias de cultivo *in vitro*.

Fatores	SQ	GL	MQ	F	p
(1)ANA (ppm)(L)	0,000001	1	0,000001	14,29100	0,006889*
ANA (ppm)(Q)	0,000000	1	0,000000	8,89333	0,020452*
(2)BAP (ppm)(L)	0,000001	1	0,000001	20,26275	0,002794*
BAP (ppm)(Q)	0,000001	1	0,000001	14,51979	0,006624*
(3)NaCl (mM)(L)	0,000000	1	0,000000	3,29434	0,112384
NaCl (mM)(Q)	0,000000	1	0,000000	4,05926	0,083776
1L by 2L	0,000000	1	0,000000	3,82725	0,091311
1L by 3L	0,000001	1	0,000001	22,24044	0,002168*
2L by 3L	0,000000	1	0,000000	1,70631	0,232746
Error	0,000000	7	0,000000		
Total SS	0,000004	16			

$R^2 = 0,92$; GL = GRAUS DE LIBERDADE; SQ = SOMA QUADRÁTICA; MQ = MÉDIA QUADRÁTICA;
 F = TESTE DE FISHER; p = PROBABILIDADE
 Nível de significância: *95%

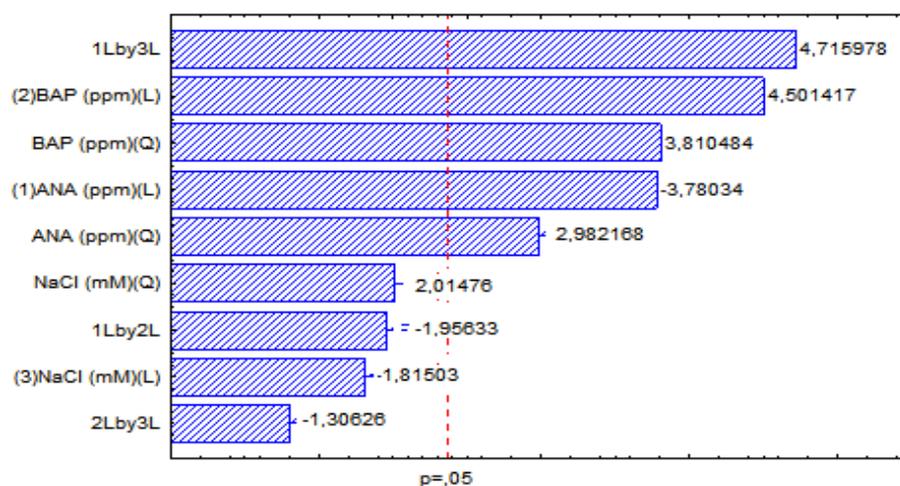


Figura 14. Diagrama de Pareto dos efeitos absolutos das variáveis independentes manipuladas para a atividade específica (U/mg) em tecidos de folha aos 60 dias de cultivo *in vitro*.

Tabela 15. ANOVA para a atividade específica (U/mg) em tecidos de caule aos 60 dias de cultivo *in vitro*.

Fatores	SQ	GL	MQ	F	p
(1)ANA (ppm)(L)	0,000001	1	0,000001	81,9283	0,000041*
ANA (ppm)(Q)	0,000001	1	0,000001	116,3627	0,000013*
(2)BAP (ppm)(L)	0,000000	1	0,000000	0,2182	0,654606
BAP (ppm)(Q)	0,000000	1	0,000000	0,0007	0,979480
(3)NaCl (mM)(L)	0,000000	1	0,000000	1,3868	0,277423
NaCl (mM)(Q)	0,000000	1	0,000000	39,0630	0,000424*
1L by 2L	0,000000	1	0,000000	46,2137	0,000254*
1L by 3L	0,000000	1	0,000000	1,0681	0,335747
2L by 3L	0,000000	1	0,000000	12,2303	0,010031*
Error	0,000000	7	0,000000		
Total SS	0,000002	16			

$R^2 = 0,98$; GL = GRAUS DE LIBERDADE; SQ = SOMA QUADRÁTICA; MQ = MÉDIA QUADRÁTICA;
 F = TESTE DE FISHER; P = PROBABILIDADE
 Nível de significância: *95%

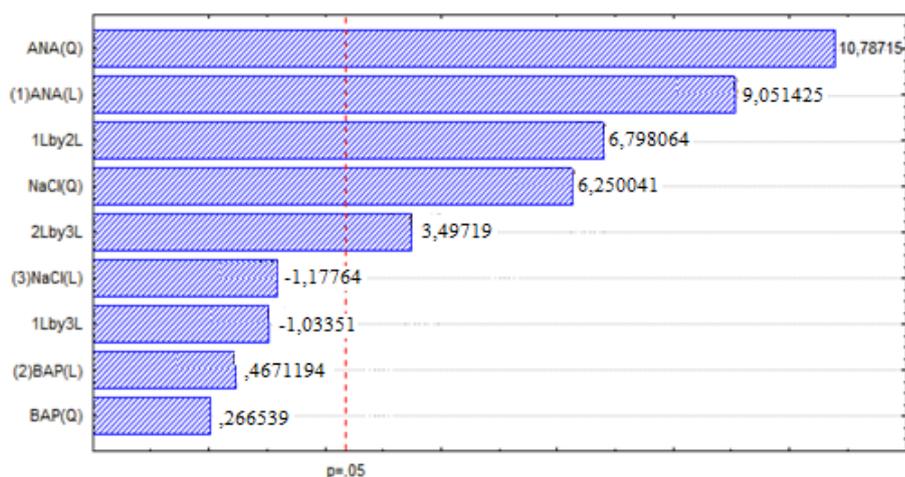


Figura 15. Diagrama de Pareto dos efeitos absolutos das variáveis independentes manipuladas para a atividade específica (U/mg) em tecidos de caule aos 60 dias de cultivo *in vitro*.

Tabela 16. ANOVA para a atividade específica (U/mg) em tecidos de folha aos 90 dias de cultivo *in vitro*.

Fatores	SQ	GL	MQ	F	p
(1)ANA (ppm)(L)	0,000000	1	0,000000	0,464808	0,517300
ANA (ppm)(Q)	0,000000	1	0,000000	8,046590	0,025165*
(2)BAP (ppm)(L)	0,000000	1	0,000000	1,331663	0,286383
BAP (ppm)(Q)	0,000000	1	0,000000	0,002980	0,957989
(3)NaCl (mM)(L)	0,000000	1	0,000000	1,287744	0,293823
NaCl (mM)(Q)	0,000000	1	0,000000	0,194915	0,672173
1L by 2L	0,000000	1	0,000000	4,036971	0,084463
1L by 3L	0,000000	1	0,000000	7,010968	0,033046*
2L by 3L	0,000000	1	0,000000	1,030694	0,343794
Error	0,000000	7	0,000000		
Total SS	0,000001	16			

$R^2 = 0,78$; GL = GRAUS DE LIBERDADE; SQ = SOMA QUADRÁTICA; MQ = MÉDIA QUADRÁTICA;
 F = TESTE DE FISHER; P = PROBABILIDADE
 Nível de significância: *95%

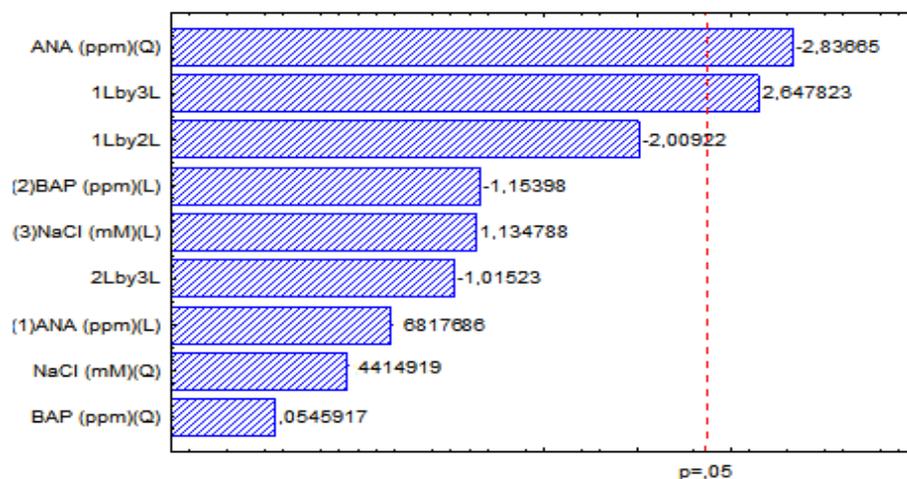


Figura 16. Diagrama de Pareto dos efeitos absolutos das variáveis independentes manipuladas para a atividade específica (U/mg) em tecidos de folha aos 90 dias de cultivo *in vitro*.

Tabela 17. ANOVA para a atividade específica (U/mg) em tecidos de caule aos 90 dias de cultivo *in vitro*.

Fatores	SQ	GL	MQ	F	p
(1)ANA (ppm)(L)	0,000000	1	0,000000	0,0168	0,900444
ANA (ppm)(Q)	0,000012	1	0,000012	179,0154	0,000003*
(2)BAP (ppm)(L)	0,000001	1	0,000001	7,7831	0,026915*
BAP (ppm)(Q)	0,000010	1	0,000010	142,4192	0,000007*
(3)NaCl (mM)(L)	0,000000	1	0,000000	0,1019	0,758907
NaCl (mM)(Q)	0,000007	1	0,000007	101,1685	0,000021*
1L by 2L	0,000000	1	0,000000	1,5983	0,246607
1L by 3L	0,000000	1	0,000000	3,0772	0,122837
2L by 3L	0,000000	1	0,000000	3,0654	0,123446
Error	0,000000	7	0,000000		
Total SS	0,000002	16			

$R^2 = 0,98$; GL = GRAUS DE LIBERDADE; SQ = SOMA QUADRÁTICA; MQ = MÉDIA QUADRÁTICA;
 F = TESTE DE FISHER; P = PROBABILIDADE
 Nível de significância: *95%

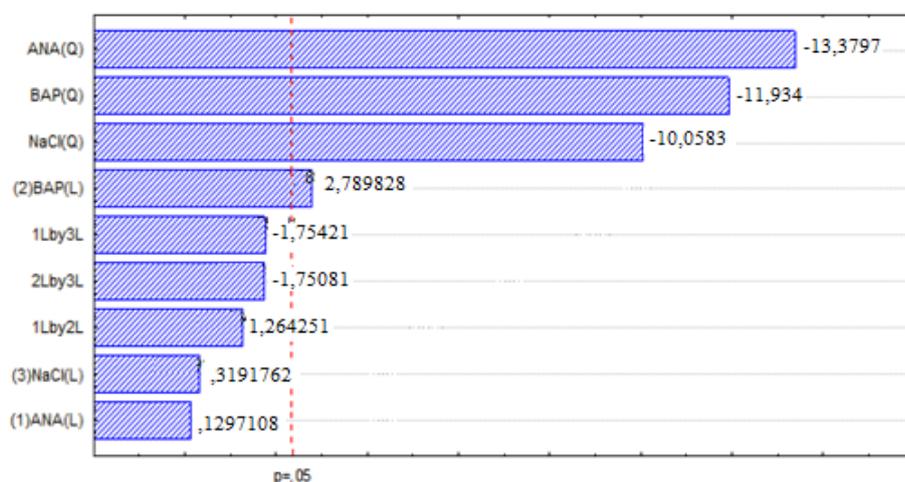


Figura 17. Diagrama de Pareto dos efeitos absolutos das variáveis independentes manipuladas para a atividade específica (U/mg) em tecidos de caule aos 90 dias de cultivo *in vitro*.

Pelos resultados obtidos de interação significativa entre os reguladores e o estresse salino nos tecidos analisados, folha e caule, bem como nos dois tempos de cultivo (60 e 90 dias), pode-se sugerir que o balanço adequado dos reguladores e a presença do NaCl tenha causado estresse positivo nas plantas de forma a otimizar a síntese de metabólitos e por consequência a atividade da bromelina. Alguns trabalhos já relacionam a presença de concentrações elevadas de citocinina e/ou auxina à hiperhidricidade, e essa, que por sua vez propicia acúmulo de peróxido de hidrogênio dentro das células, acaba por resultar em condição de estresse para a planta aumentando a síntese e produção de metabólitos (LIMA *et al.*, 1999; PICOLI *et al.*, 2001). Há relatos, também, de maior atividade da peroxidase na presença do etileno, e relacionam o aumento dessa substância a aumento do peróxido de hidrogênio (PENEL *et al.*, 1979). Assim, pode-se concluir que a condição de estresse é necessária para o aumento da atividade da bromelina.

Além disso, Franck *et al.* (2004) relataram maior atividade de peroxidase em brotações hiperhídricas de diversas espécies e que esse aumento na atividade poderia estar relacionada ao etileno. Saher *et al.* (2004) também descreveram um aumento no etileno, em tecidos hiperhídricos, e relacionaram o aumento do conteúdo dessa substância ao aumento da produção de peróxido de hidrogênio e, conseqüentemente, a um aumento na atividade da peroxidase. Fráguas *et al.* (2009), avaliando os efeitos de BAP e ANA na indução, na multiplicação *in vitro* de gemas, nas brotações de *Ananas comosus* da cultivar 'IAC Gomo-de-mel' e a correlação desses efeitos com a atividade de peroxidase e o teor de proteína solúvel total, concluíram que o teor de proteínas solúveis teve uma relação negativa com hiperhidricidade e comprimento de brotações, e que a atividade da peroxidase foi maior em plantas com maior número de brotos e com maior porcentagem de hiperhidricidade.

Deste modo, os resultados relacionados a atividade de bromelina do presente estudo estão coerentes com os encontrados na literatura, em especial no que diz respeito a maior atividade da enzima em tecidos submetidos à estresse, seja este hídrico, gerado por reguladores e/ou salino, bem como quanto a maior atividade em plantas adultas uma vez que os maiores valores de atividade enzimática e específica foram encontrados em tecidos de caule aos 90 dias de cultivo, quando em concentrações relativamente alta de NaCl.

Para Piza *et al.* (2002), o processo de diferenciação e os estágios de desenvolvimento da planta podem ter influência tanto na formação de enzimas proteolíticas quanto na síntese de proteínas. Segundo esses autores, a atividade enzimática depende de vários fatores como variedade, idade e parte da planta da qual é extraída.

Apte *et al.* (1979) observaram diferenças significativas na atividade da bromelina em folhas e caules de abacaxizeiro *in vitro*, sendo que os tecidos de folhas adultas apresentaram

maior atividade quando comparadas com calos e folhas jovens também desenvolvidas *in vitro*. Estes autores relataram que em calos a atividade variou significativamente durante as diversas fases de crescimento, com aumento da atividade aos 20, 30 e 45 dias, indicando, assim, que características de crescimento têm forte influência na formação de enzimas.

Lima *et al.* (2002), avaliando o efeito dos reguladores de crescimento vegetal BAP e ANA, na morfogênese *in vitro* da mandioca e suas relações com a atividade da peroxidase, concluíram que a atividade da peroxidase tem relação direta com a formação de calos em meio ausente de reguladores de crescimento e inversa com a organogênese no tratamento contendo BAP e com a rizogênese em meio contendo BAP ou ANA.

O comportamento obtido da atividade da bromelina para o tecido folha, onde o maior valor de atividade foi obtida na concentração mínima das três variáveis avaliadas, pode ter como provável explicação o fato do estresse salino causar diminuição drástica da clorofila e carotenóides totais das folhas e nutrientes, com redução de toda a sua cadeia metabólica e consequentemente, redução na síntese e produção de metabólitos em virtude dos efeitos de toxicidade iônica.

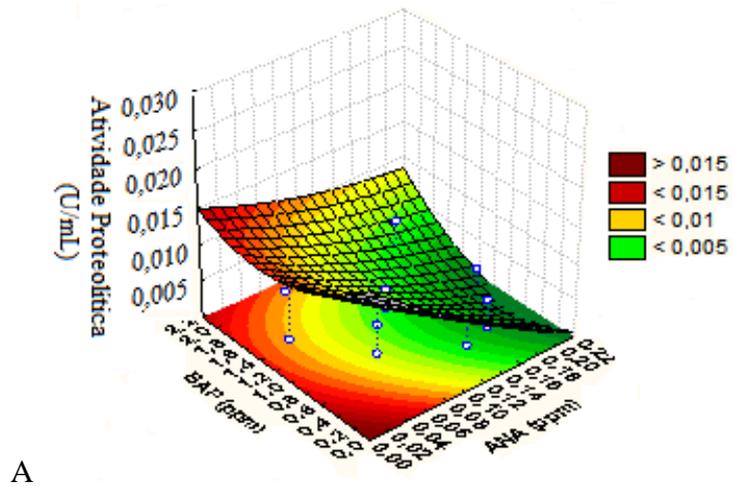
De acordo com Taiz e Zeiger (2009), sob condições não-salinas, o citosol de células de plantas superiores contém cerca de 100 mM de K^+ e um valor inferior a 10 mM de Na^+ , fornecendo um ambiente iônico em que as enzimas são operacionalmente funcionais; no entanto, uma razão anormalmente alta entre Na^+ e K^+ e concentrações altas de íons totais inativam as enzimas e inibem a síntese de proteínas. Além disso, as plantas minimizam os danos causados reduzindo a exposição ao sal de meristemas, do caule em particular, e das folhas que estão crescendo ativamente e realizando fotossíntese.

Embora se saiba que, geralmente, altos níveis de proteínas podem estar relacionados à taxa de divisão mitótica, pelo fato de a síntese de novas proteínas acarretarem mudanças morfológicas e bioquímicas durante as fases de crescimento e desenvolvimento da planta (FRANCK *et al.*, 2004), e que as citocininas juntamente com as auxinas apresentam grande habilidade na indução da divisão celular em culturas de tecido (DAVIES, 1987), bem como que a relação auxina/citocinina, o tipo e a concentração de auxina ou citocinina também afetam o crescimento e a produção de metabólitos em cultivos *in vitro* de plantas (RAMACHANDRA; RAVISHANKAR, 2002), poucos estudos relacionando o balanço hormonal e seus efeitos químicos e bioquímicos foram até o momento realizados. Nesse contexto, os resultados deste estudo sugerem a necessidade de novas pesquisas utilizando concentrações de ANA e BAP e tempos de cultivo diferentes, pois, a otimização do processo de produção de metabólitos em cultivos *in vitro* de plantas pode oferecer diversas vantagens, entre elas benefícios financeiros uma vez que agregará valor ao vegetal estudado.

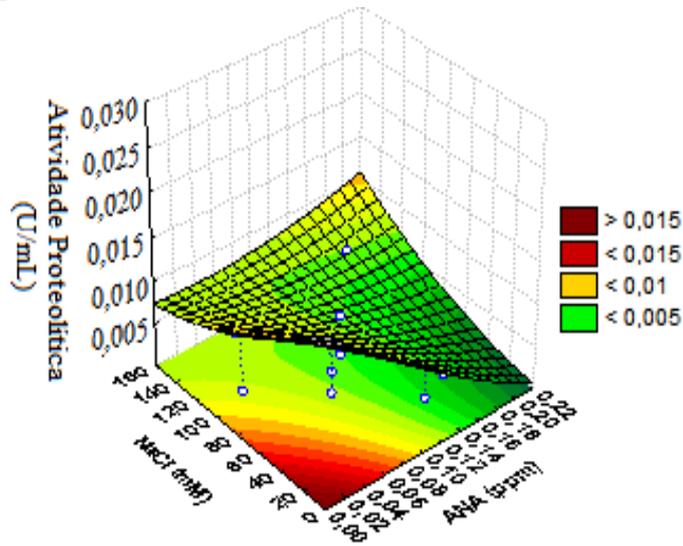
A partir de modelos empíricos estabelecidos pelo software Statistica[®] 8.0 (Figuras 18 a 25), foi possível observar os gráficos de superfície que em geral ratificam a significância das variáveis estudadas. A superfície de resposta é a descrição gráfica do modelo, o que simplifica a interpretação dos resultados. O objeto da metodologia de superfície de resposta é detectar quais parâmetros experimentais podem gerar sinais capazes de influenciar significativamente o experimento, ou seja, o relacionamento desejado entre resposta e fatores que determina uma combinação dos níveis para uma resposta ótima (BOX, 1954; RODRIGUES e IEMMA, 2005).

Entretanto, de acordo com as equações descritas anteriormente e por intermédio dos pontos críticos, dos modelos apresentados, o que mais se ajustou aos dados foram os referentes aos tecidos de caule aos 90 dias de cultivo, em virtude do ponto de máxima atividade (ponto otimizado) se encontrar dentro do intervalo da superfície gráfica analisada, sendo os outros modelos desconsiderados. Além disso, de acordo com Barros Neto *et al.* (2005), o valor do coeficiente de correlação (R) deve tender o mais próximo para o valor de uma unidade, uma vez que o valor de R^2 fornece uma medida de quão grande variabilidade nos valores de resposta observada pode ser explicada pelos parâmetros experimentais e suas interações, assim quanto mais próximos os valores de R^2 a 1, melhor esta correlação. Dentro deste contexto, neste estudo alguns valores obtidos oscilaram entre 0,78401 e 0,9342 indicando que os dados provavelmente não se ajustaram muito bem aos modelos propostos. Assim, embora estes modelos sejam estatisticamente representativos ainda precisam melhorar seus ajustes para comprovar a sua validade. Portanto, serão considerados somente os modelos referentes ao caule aos 90 dias de cultivo os quais apresentaram valores que se ajustaram ao modelo.

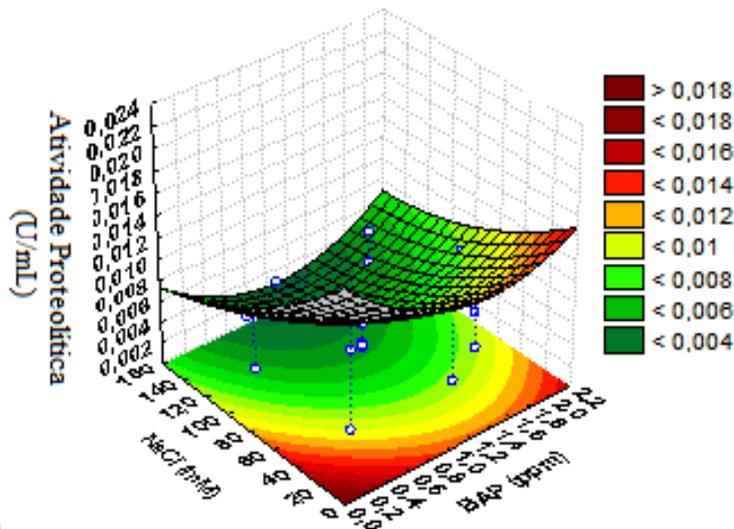
Assim pelo software Statistica[®] 8.0, a superfície correspondente ao modelo otimizado de 90 dias de cultivo foi gerada (Figuras 24 e 25), ratificando, assim, a validade do modelo proposto para representar os dados. Desta superfície de resposta foi possível extrair as condições de obtenção de maiores atividades (enzimática e específica), com proporções de 0,097 ppm de ANA, 1,129 de BAP e 76,60 mM de NaCl para a enzimática, e 0,100 ppm de ANA, 1,062 de BAP e 75,07 mM de NaCl para a específica, proporções estas que forneceriam a máxima atividade enzimática e específica previstas para 0,0096 U/mL e 0,0037 U/mg, respectivamente. Esses resultados corroboram os obtidos experimentalmente, uma vez que o valor máximo de atividade enzimática e específica (cerca de 0,0095 U/mL e 0,0037 U/mg, respectivamente) foram obtidas de caule aos 90 dias de cultivo, trabalhando com proporções de 0,100 ppm de ANA, 1,000 ppm de BAP e 75 mM de NaCl.



A



B



C

Figura 18. Superfícies de respostas representando os efeitos das diferentes interações entre as variáveis estudadas, e seus efeitos mútuos na atividade enzimática de tecidos de folha de abacaxizeiro aos 60 dias de cultivo *in vitro*: A - efeito das concentrações de ANA e BAP; B - efeito das concentrações de ANA e NaCl; C - concentrações de BAP e NaCl.

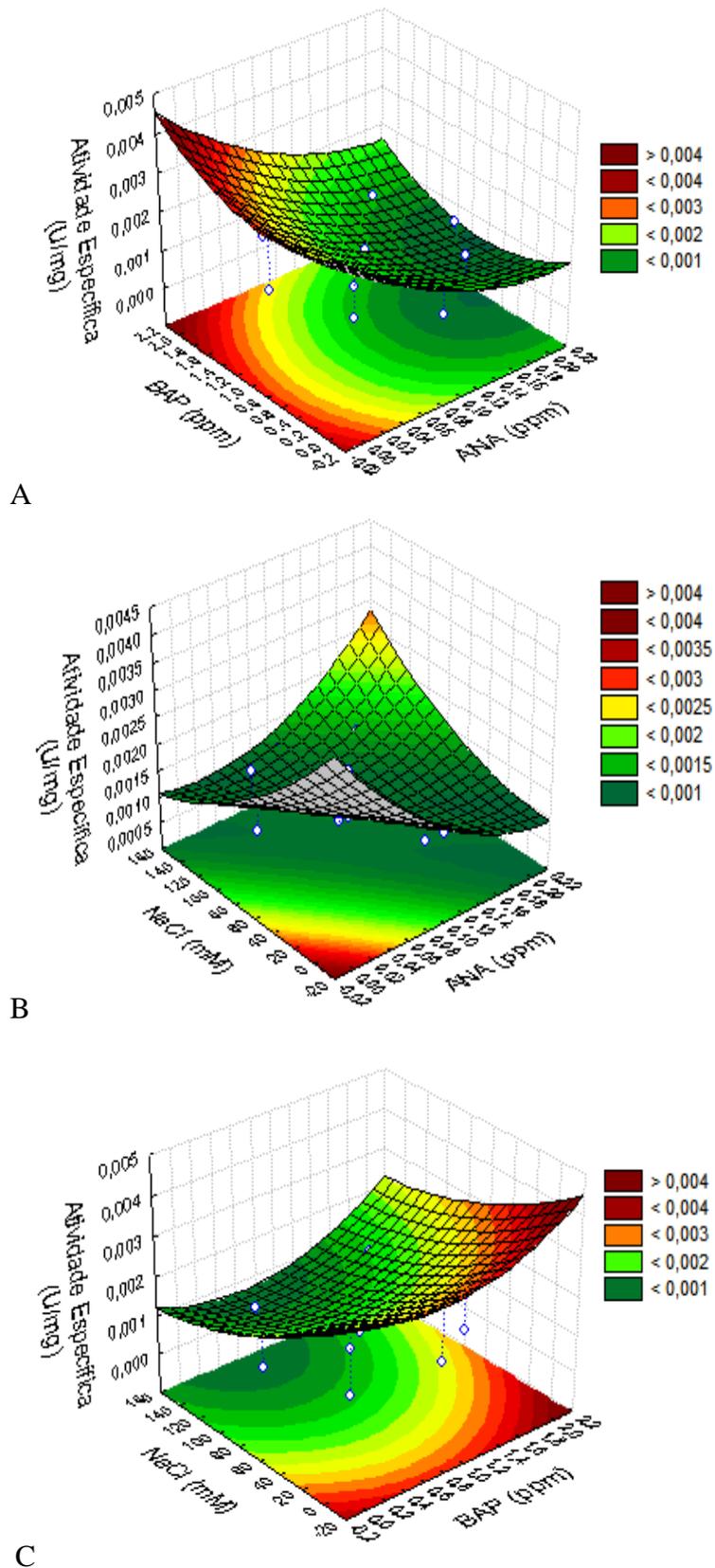
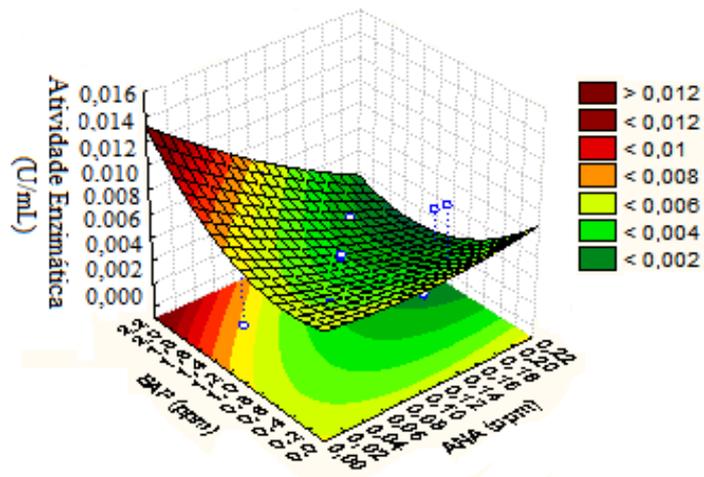
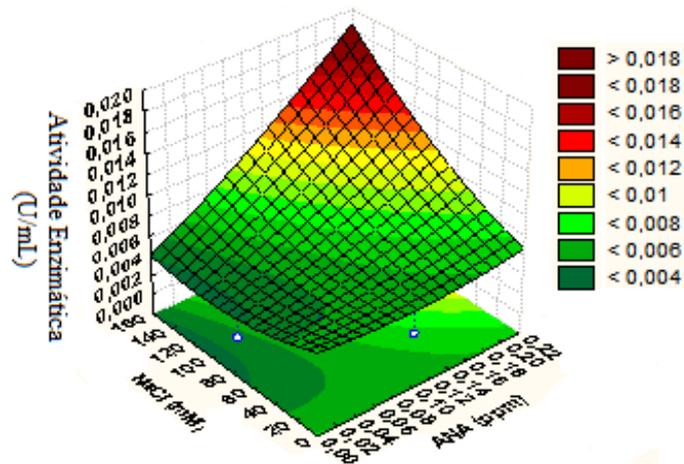


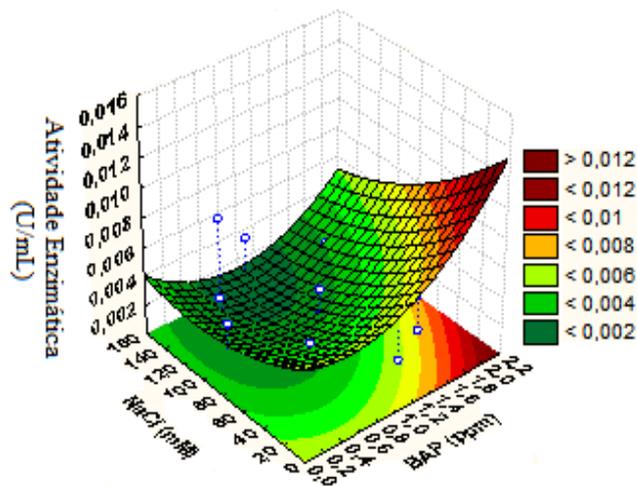
Figura 19. Superfícies de respostas representando os efeitos das diferentes interações entre as variáveis estudadas, e seus efeitos mútuos na atividade específica em tecidos de folha de abacaxizeiro aos 60 dias de cultivo *in vitro*: A - efeito das concentrações de ANA e BAP; B - efeito das concentrações de ANA e NaCl; C - concentrações de BAP e NaCl.



A



B



C

Figura 20. Superfícies de respostas representando os efeitos das diferentes interações entre as variáveis estudadas, e seus efeitos mútuos na atividade enzimática em tecidos de folha de abacaxizeiro aos 90 dias de cultivo *in vitro*: A - efeito das concentrações de ANA e BAP; B - efeito das concentrações de ANA e NaCl; C - concentrações de BAP e NaCl.

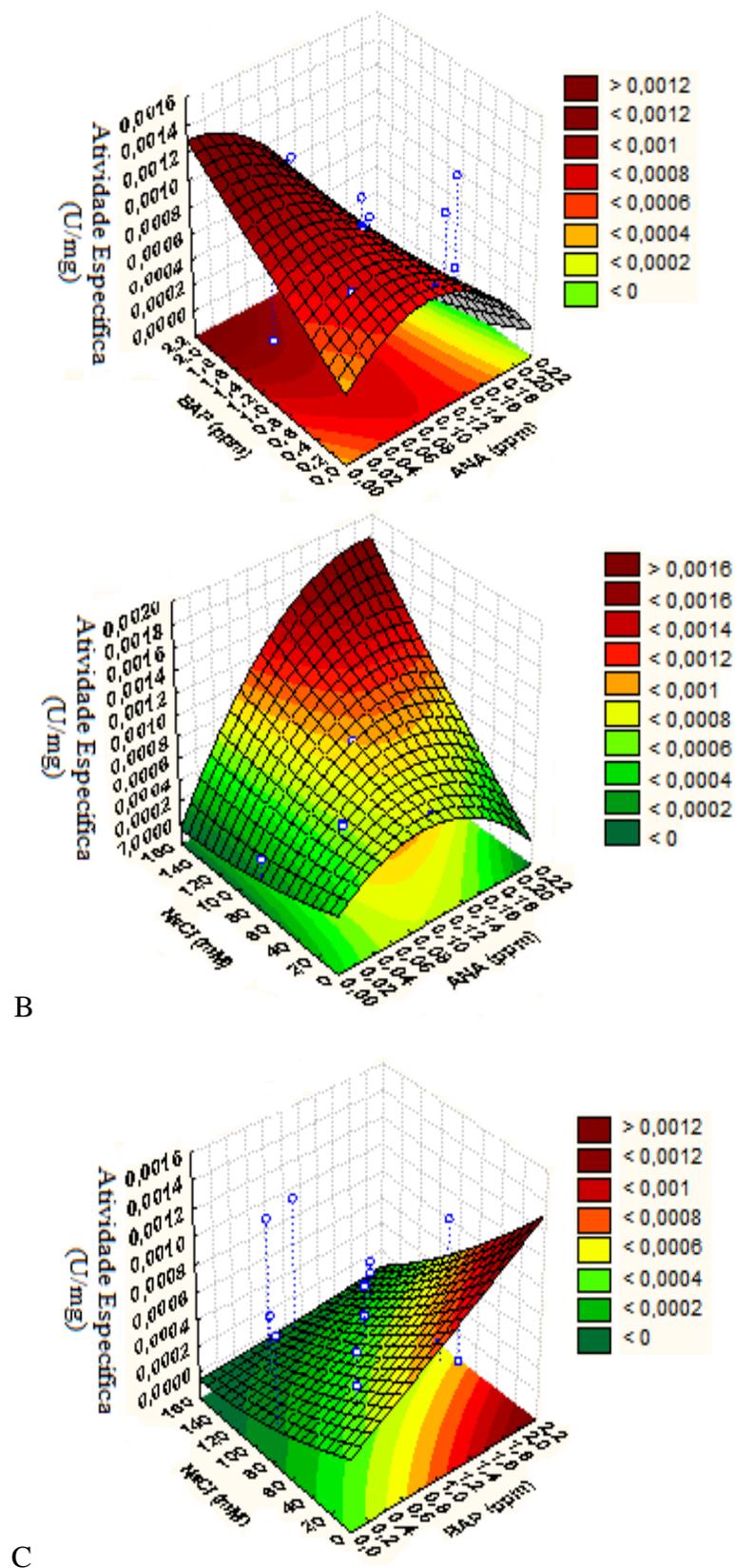
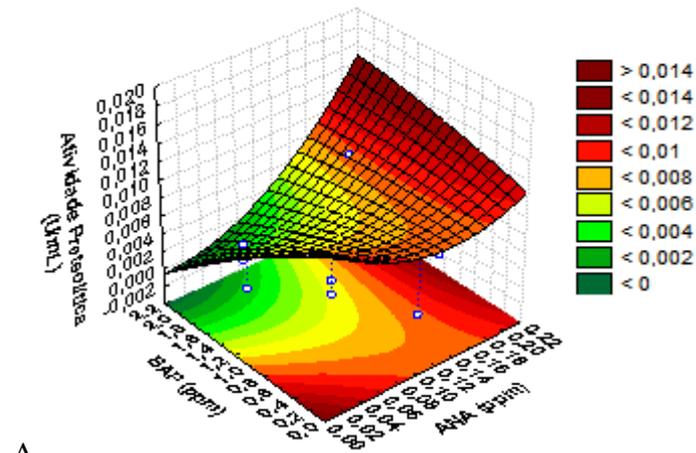
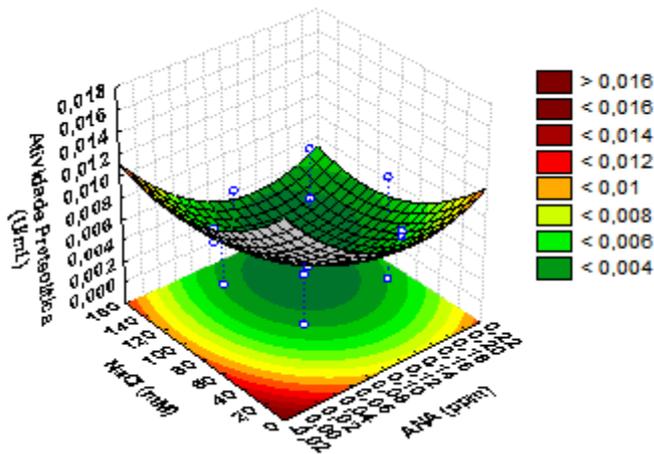


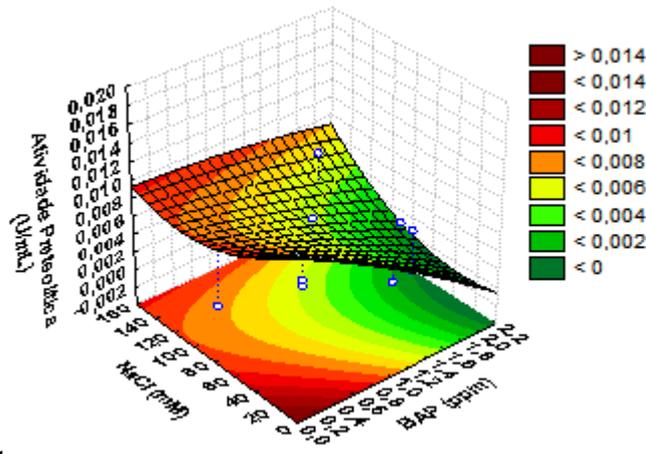
Figura 21. Superfícies de respostas representando os efeitos das diferentes interações entre as variáveis estudadas, e seus efeitos mútuos na atividade específica em tecidos de folha de abacaxizeiro aos 90 dias de cultivo *in vitro*: A - efeito das concentrações de ANA e BAP; B - efeito das concentrações de ANA e NaCl; C - concentrações de BAP e NaCl.



A

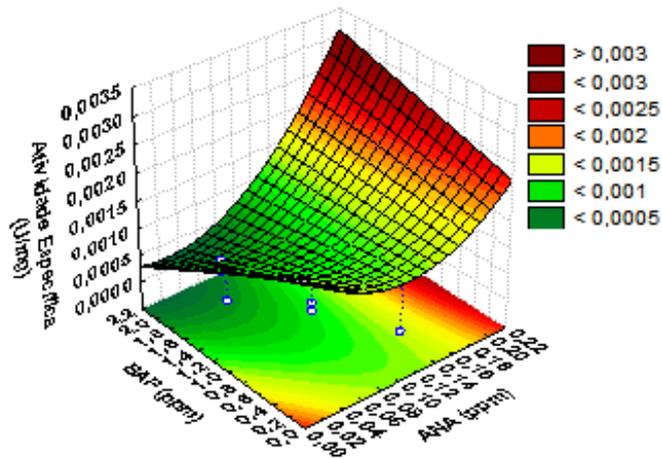


B

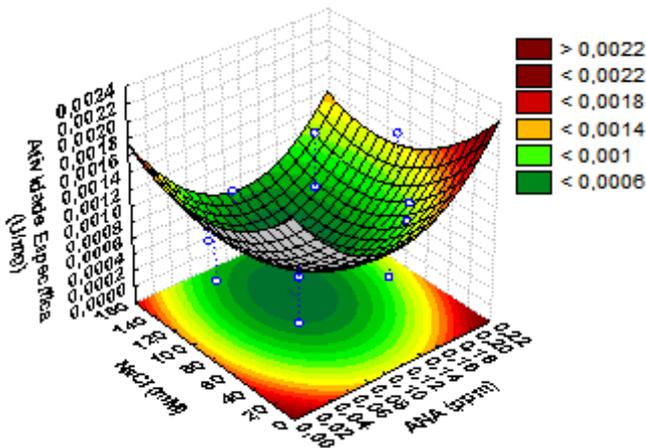


C

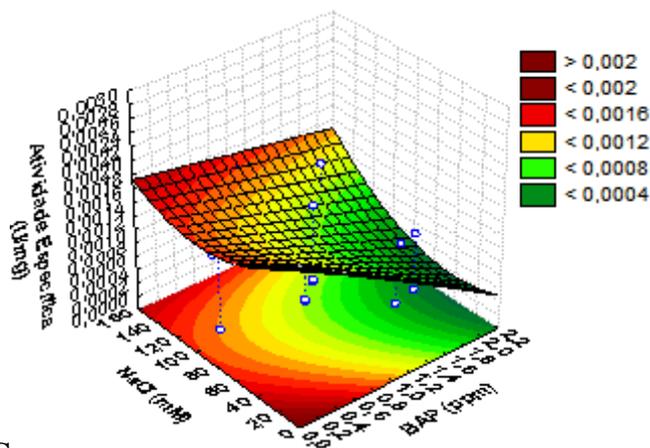
Figura 22. Superfícies de respostas representando os efeitos das diferentes interações entre as variáveis estudadas, e seus efeitos mútuos na atividade enzimática em tecidos de caule de abacaxizeiro aos 60 dias de cultivo *in vitro*: A - efeito das concentrações de ANA e BAP; B - efeito das concentrações de ANA e NaCl; C - concentrações de BAP e NaCl.



A



B



C

Figura 23. Superfícies de respostas representando os efeitos das diferentes interações entre as variáveis estudadas, e seus efeitos mútuos na atividade específica em tecidos de caule de abacaxizeiro aos 60 dias de cultivo *in vitro*: A - efeito das concentrações de ANA e BAP; B - efeito das concentrações de ANA e NaCl; C - concentrações de BAP e NaCl.

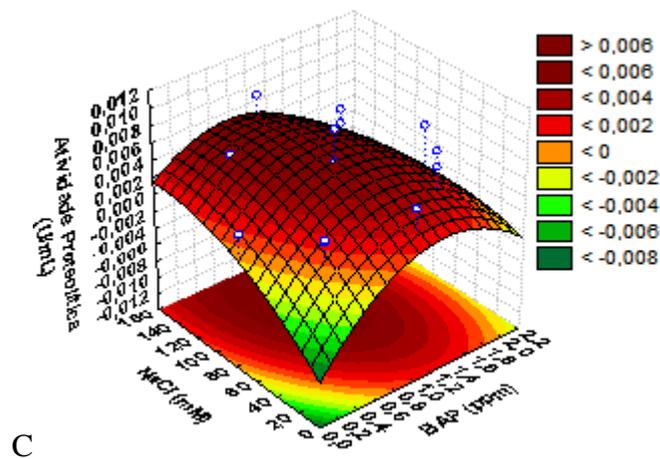
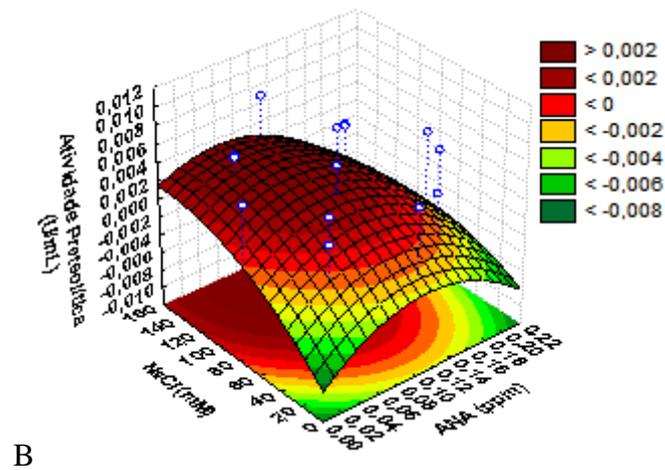
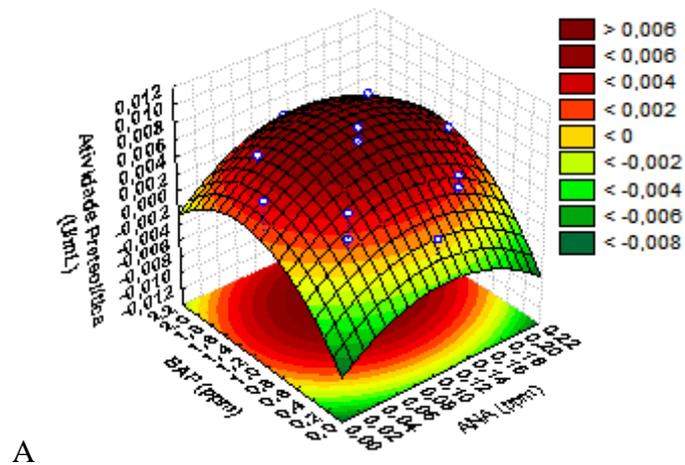
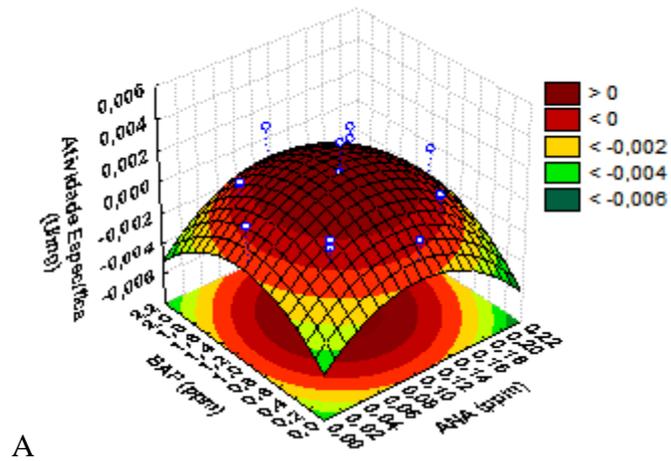
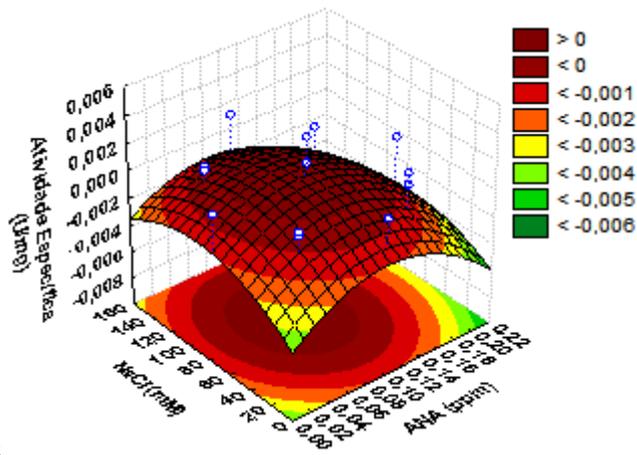


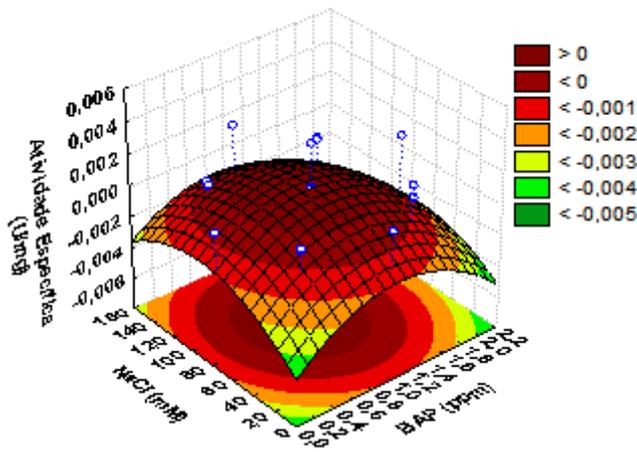
Figura 24. Superfícies de respostas representando os efeitos das diferentes interações entre as variáveis estudadas, e seus efeitos mútuos na atividade enzimática em tecidos de caule de abacaxizeiro aos 90 dias de cultivo *in vitro*: A - efeito das concentrações de ANA e BAP; B - efeito das concentrações de ANA e NaCl; C - concentrações de BAP e NaCl.



A



B



C

Figura 25. Superfícies de respostas representando os efeitos das diferentes interações entre as variáveis estudadas, e seus efeitos mútuos na atividade específica em tecidos de caule de abacaxizeiro aos 90 dias de cultivo *in vitro*: A - efeito das concentrações de ANA e BAP; B - efeito das concentrações de ANA e NaCl; C - concentrações de BAP e NaCl.

Na sequência do trabalho, análises foram realizadas dentro de um contexto estatístico de planejamento composto central (*Central Composite Design – CCD*) visando variar as concentrações de ANA (0 à 0,2 ppm), BAP (0 à 2,0 ppm) e NaCl (0 à 150 mM), para análise de atividade enzimática e atividade específica como fatores resposta a análise estatística. Deste modo, e inicialmente, foram realizadas análises de regressão nos dados obtidos tanto para a folha como para o caule, em 60 e 90 dias de cultivo *in vitro*.

As análises de regressão (Anexo I e II) para obtenção dos modelos realizadas em tecidos de folha aos 60 e 90 dias (Tabela 6 e 7), com o intuito de ajustar a função do fator resposta atividade enzimática (y_1) e atividade específica (y_2) com os dados experimentais, estão apresentados nas equações 5 a 8, sendo os fatores respostas y_1 e y_2 apresentadas em função dos valores de ANA (x_1), BAP (x_2) e NaCl (x_3):

Eq. (5)

$$y_{1F60} = 0,018441 - 0,102153x_1 - 0,009591x_2 - 0,000113x_3 + 0,096170x_1^2 + 0,003635x_2^2 + 0,023715x_1x_2 + 0,000604 x_1x_3 + 0,000009 x_2x_3$$

Eq. (6)

$$y_{2F60} = 0,003163 - 0,020823x_1 - 0,000958x_2 - 0,000023x_3 + 0,048659x_1^2 + 0,000629x_2^2 - 0,000632x_1x_2 + 0,000115x_1x_3 + 0,000001x_2x_3$$

Eq. (7)

$$y_{1F90} = 0,006160 - 0,012004x_1 - 0,002355x_2 - 0,000048x_3 + 0,062538x_1^2 + 0,002527x_2^2 - 0,024548x_1x_2 + 0,000400x_1x_3 - 0,000017x_2x_3$$

Eq. (8)

$$y_{2F90} = 0,000334 + 0,007697x_1 + 0,0418x_2 - 0,000004x_3 - 0,041650x_1^2 + 0,0000080 x_2^2 - 0,003499x_1x_2 + 0,000062 x_1x_3 - -0,000002 x_2x_3$$

As análises de regressão (Anexo III e IV) para obtenção dos modelos realizadas em tecidos de caule aos 60 e 90 dias (Tabela 8 e 9), com o intuito de ajustar a função do fator resposta atividade enzimática (y_1) e atividade específica (y_2) com os dados experimentais, estão apresentados nas equações 9 a 12, sendo os fatores respostas y_1 e y_2 apresentadas em função dos valores de ANA (x_1), BAP (x_2) e NaCl (x_3), conforme também realizadas anteriormente para o tecido folha:

Eq. (9)

$$y_{1C60} = 0,014331 - 0,085110x_1 - 0,005946x_2 - 0,000111x_3 + 0,308198x_1^2 - 0,000370x_2^2 + 0,039544x_1x_2 - 0,000010x_1x_3 + 0,000036x_2x_3$$

Eq. (10)

$$y_{2C60} = 0,002470 - 0,019101x_1 - 0,001105x_2 - 0,000019x_3 + 0,078900x_1^2 + 0,000029x_2^2 - 0,006936x_1x_2 + 0,000005x_1x_3 + 0,000006x_2x_3$$

Eq. (11)

$$y_{1C90} = -0,008697 + 0,093939x_1 + 0,015365x_2 + 0,000132x_3 - 0,418144x_1^2 - 0,005800x_2^2 + 0,005653x_1x_2 - 0,000246x_1x_3 - 0,000037x_2x_3$$

Eq. (12)

$$y_{2C90} = -0,005021 + 0,059624x_1 + 0,005782x_2 + 0,000071x_3 - 0,292363x_1^2 - 0,002663x_2^2 + 0,003294x_1x_2 - 0,000061x_1x_3 - 0,000006x_2x_3$$

5.2.2 Influência dos reguladores de crescimento e do estresse salino na atividade de bromelina em diferentes cultivos: direto (90 dias) versus subcultivo (60+30 dias)

Continuando, ainda, com o contexto de experimentos para avaliar a influência de diferentes concentrações de ANA, BAP e NaCl na atividade da bromelina obtida aos 60 e 90 dias de cultivos *in vitro*, foi realizado a partir de um cultivo de 60 dias um subcultivo de 30 dias (60+30 dias) visando conhecer o efeito deste na atividade da enzima. Assim, foram realizados ensaios dentro de uma conjuntura de planejamento experimental composto por um fatorial 2^3 com seis pontos axiais e três repetições do ponto central. Deste modo, as Tabelas 18 e 19 apresentam os valores das atividades enzimática e específica em tecidos de folha e caule, referentes aos experimentos de subcultivo estudados conforme matriz de planejamento fatorial 2^3 . Pelos dados obtidos, foi possível observar que os maiores valores de atividade enzimática e específica da bromelina, entre os respectivos tecidos, foi de 0,0083 U/mL e 0,0016 U/mg para a folha (Tabela 18), e 0,0215 U/mL e 0,0063 U/mg para o caule (Tabela 19). Esses valores, conforme observados nas Tabelas 18 e 19, foram obtidos para a folha em um dos pontos axiais do planejamento, onde a concentração de BAP foi zerada, para a atividade enzimática, e no ponto central do planejamento para a atividade específica. Nos tecidos de caule, os valores, para ambas as atividades, foram encontrados nos pontos centrais do planejamento.

Tabela 18. Matriz do planejamento fatorial 2^3 (valores codificados e reais) com respostas da atividade enzimática e específica, aos 30 dias de subcultivo *in vitro* em tecidos de folha de abacaxizeiro.

Ensaio	ANA (ppm)	BAP (ppm)	NaCL (mM)	Atividade Enzimática (U/mL)	Atividade Específica (U/mg)
1	-1 (0,040)	-1 (0,400)	-1 (30,400)	0,0078	0,0010
2	-1 (0,040)	-1 (0,400)	1 (119,59)	0,0031	0,0004
3	-1 (0,040)	+1 (1,59)	-1 (30,400)	0,0038	0,0006
4	-1 (0,040)	+1 (1,59)	1 (119,59)	0,0042	0,0005
5	+1 (0,159)	-1 (0,400)	-1 (30,400)	0,0059	0,0007
6	+1 (0,159)	-1 (0,400)	1 (119,59)	0,0039	0,0006
7	+1 (0,159)	+1 (1,59)	-1 (30,400)	0,0019	0,0003
8	+1 (0,159)	+1 (1,59)	1 (119,59)	0,0044	0,0007
9	-1,68 (0)	0 (1,00)	0 (75,00)	0,0025	0,0004
10	1,68 (0,200)	0 (1,00)	0 (75,00)	0,0031	0,0006
11	0 (0,100)	-1,68 (0)	0 (75,00)	0,0083	0,0016
12	0 (0,100)	1,68 (2,000)	0 (75,00)	0,0023	0,0005
13	0 (0,100)	0 (1,000)	-1,68 (0,00)	0,0034	0,0006
14	0 (0,100)	0 (1,000)	1,68 (150,00)	0,0021	0,0005
15	0 (0,100)	0 (1,000)	0 (75,00)	0,0052	0,0023
16	0 (0,100)	0 (1,000)	0 (75,00)	0,0052	0,0023
17	0 (0,100)	0 (1,000)	0 (75,00)	0,0052	0,0024

Tabela 19. Matriz do planejamento fatorial 2^3 (valores codificados e reais) com respostas da atividade enzimática e específica, aos 30 dias de subcultivo *in vitro* em tecidos de caule de abacaxizeiro.

Ensaio	ANA (ppm)	BAP (ppm)	NaCl (mM)	Atividade Enzimática (U/mL)	Atividade Específica (U/mg)
1	-1 (0,040)	-1 (0,400)	-1 (30,400)	0,0061	0,0009
2	-1 (0,040)	-1 (0,400)	+1 (119,59)	0,0045	0,0007
3	-1 (0,040)	+1 (1,59)	-1 (30,400)	0,0069	0,0010
4	-1 (0,040)	+1 (1,59)	1 (119,59)	0,0037	0,0006
5	+1 (0,159)	-1 (0,400)	-1 (30,400)	0,0065	0,0015
6	+1 (0,159)	-1 (0,400)	+1 (119,59)	0,0035	0,0006
7	+1 (0,159)	+1 (1,59)	-1 (30,400)	0,0029	0,0004
8	+1 (0,159)	+1 (1,59)	+1 (119,59)	0,0043	0,0005
9	-1,68 (0)	0 (1,00)	0 (75,00)	0,0058	0,0010
10	1,68 (0,200)	0 (1,00)	0 (75,00)	0,0091	0,0016
11	0 (0,100)	-1,68 (0)	0 (75,00)	0,0077	0,0014
12	0 (0,100)	1,68 (2,000)	0 (75,00)	0,0127	0,0024
13	0 (0,100)	0 (1,000)	-1,68 (0,00)	0,0125	0,0042
14	0 (0,100)	0 (1,000)	1,68 (150,00)	0,0025	0,0009
15	0 (0,100)	0 (1,000)	0 (75,00)	0,0215	0,0063
16	0 (0,100)	0 (1,000)	0 (75,00)	0,0212	0,0063
17	0 (0,100)	0 (1,000)	0 (75,00)	0,0214	0,0063

Os valores das atividades enzimáticas obtidos em tecidos de folha mostram uma relação inversa da atividade da bromelina versus concentração de BAP, uma vez que o maior valor foi encontrado na ausência dessa citocinina e os valores mais baixos quando na presença desta (Tabela 18). Esses resultados corroboram com os resultados obtidos aos 60 e 90 dias de cultivo direto, Tabelas 6 e 7, onde verificou-se que o maior valor foi encontrado na concentração mínima dessa substância, sugerindo, assim, que a atividade da bromelina, em tecidos de folha, possui uma relação inversa frente à concentração de BAP.

Na literatura há relatos dessa relação inversa entre a atividade de algumas enzimas, como a peroxidase, e o uso do BAP. Lima *et al* (2002) relataram uma relação inversa da atividade da peroxidase em meios contendo BAP atribuindo esse episódio ao processo de diferenciação da planta uma vez que a atividade da peroxidase foi baixa durante o alongamento (desenvolvimento) de brotos, e alta em calos submetidos a tratamento com BAP, aos 21 dias.

As Tabelas 20 e 21 apresentam os valores encontrados para as análises de ANOVA para a atividade enzimática e as Tabelas 22 e 23 para as análises de atividade específica, sendo indicados com o símbolo asterisco (*) os fatores significativos obtidos a partir do teste de *Fisher*. As Figuras 26 e 27 apresentam os efeitos absolutos das variáveis independentes utilizadas neste estudo de atividade enzimática da bromelina. Enquanto que as Figuras 28 e 29 mostram os efeitos absolutos do estudo de atividade específica da bromelina. Estes efeitos são mostrados pelos diagramas de Pareto, através do teste de *Student* que por sua vez demonstra a significância da variável quando seu valor é maior que o valor de p (0,05).

Neste estudo, por meio de análise estatística, foi possível verificar, para a atividade enzimática, em ambos os tecidos, um efeito significativo das variáveis estudadas bem como da interação BAP e NaCl, somente para folhas, com $p < 0,05$ (Tabelas 20 e 21; Figuras 26 e 27). Para a atividade específica notou-se, também, efeito significativo das variáveis estudadas tanto em tecidos de folha como de caule porém, sem efeito significativo da interação entre elas. (Tabelas 22 e 23; Figuras 28 e 29).

Esses resultados foram significativos ao nível de confiança de 95% a partir da análise de variância, denotada pela importância do modelo quando $p < 0,05$, sendo, estes resultados confirmados pelo coeficiente de determinação (R^2), com valores, para folha, de $R^2 = 0,88589$ e $R^2 = 0,97365$, para atividade enzimática e específica, respectivamente; enquanto para o caule, os valores foram de $R^2 = 0,90563$ e $R^2 = 0,92502$, também para atividade enzimática e específica, respectivamente.

Tabela 20. ANOVA para atividade enzimática (U/mL) em tecidos de folha aos 30 dias de subcultivo *in vitro*.

Fatores	SQ	GL	MQ	F	p
(1)ANA (ppm) (L)	0,000000	1	0,000000	0,26718	0,621153
ANA (ppm) (Q)	0,000005	1	0,000005	5,67279	0,048756*
(2)BAP (ppm) (L)	0,000020	1	0,000020	22,14109	0,002195*
BAP (ppm) (Q)	0,000000	1	0,000000	0,54220	0,485459
(3)NaCl (mM) (L)	0,000003	1	0,000003	3,11518	0,120919
NaCl (mM) (Q)	0,000005	1	0,000005	6,13264	0,042432*
1L by 2L	0,000000	1	0,000000	0,05790	0,816744
1L by 3L	0,000003	1	0,000003	3,35560	0,109651
2L by 3L	0,000011	1	0,000011	12,52147	0,009488*
Error	0,000006	7	0,000001		
Total SS	0,000055	16			

$R^2 = 0,89$; GL = GRAUS DE LIBERDADE; SQ = SOMA QUADRÁTICA; MQ = MÉDIA QUADRÁTICA;
 F = TESTE DE FISHER; P = PROBABILIDADE
 Nível de significância: *95%

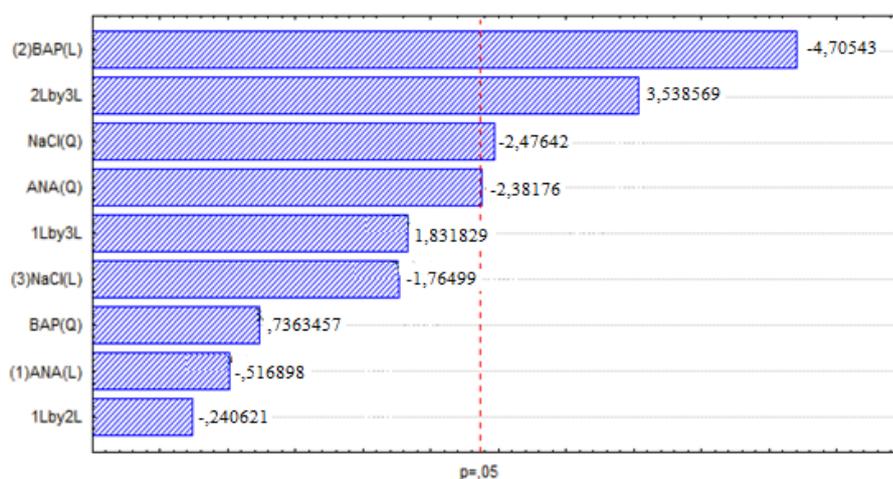


Figura 26. Diagrama de Pareto dos efeitos absolutos das variáveis independentes manipuladas para a atividade enzimática (U/mL) em tecidos de folha aos 30 dias de subcultivo *in vitro*.

Tabela 21. ANOVA para atividade enzimática (U/mL) em tecidos de caule aos 30 dias de subcultivo *in vitro*.

Fatores	SQ	GL	MQ	F	p
(1)ANA (ppm) (L)	0,000000	1	0,000000	0,03842	0,850164
ANA (ppm) (Q)	0,000346	1	0,000346	36,75161	0,000510*
(2)BAP (ppm) (L)	0,000003	1	0,000003	0,28089	0,612506
BAP (ppm) (Q)	0,000235	1	0,000235	25,01094	0,001563*
(3)NaCl (mM) (L)	0,000039	1	0,000039	4,19493	0,079748
NaCl (mM) (Q)	0,000343	1	0,000343	36,46400	0,000522*
1L by 2L	0,000001	1	0,000001	0,10527	0,755070
1L by 3L	0,000001	1	0,000001	0,13310	0,726013
2L by 3L	0,000001	1	0,000001	0,10815	0,751879
Error	0,000066	7	0,000009		
Total SS	0,000697	16			

$R^2 = 0,90$; GL = GRAUS DE LIBERDADE; SQ = SOMA QUADRÁTICA; MQ = MÉDIA QUADRÁTICA;
 F = TESTE DE FISHER; P = PROBABILIDADE
 Nível de significância: *95%

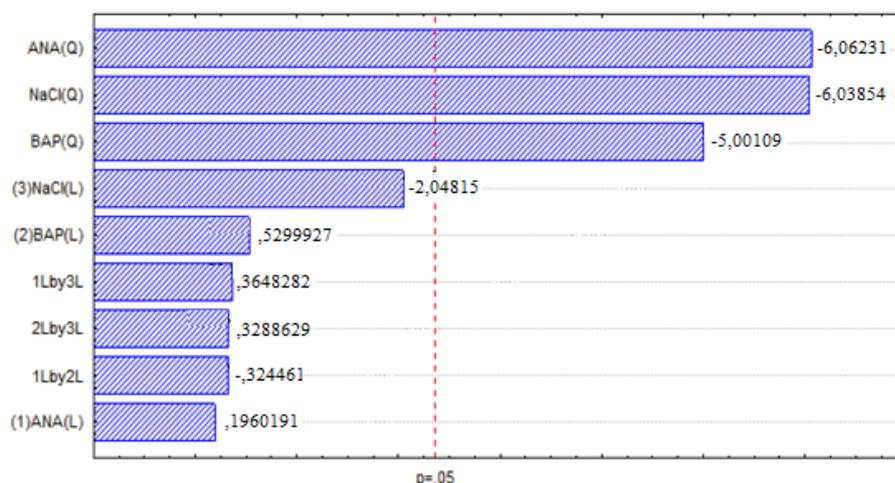


Figura 27. Diagrama de Pareto dos efeitos absolutos das variáveis independentes manipuladas para a atividade enzimática (U/mL) em tecidos de caule aos 30 dias de subcultivo *in vitro*.

Tabela 22. ANOVA para atividade específica (U/mg) em tecidos de folha aos 30 dias de subcultivo *in vitro*.

Fatores	SQ	GL	MQ	F	p
(1)ANA (ppm) (L)	0,000000	1	0,000000	0,1445	0,715087
ANA (ppm) (Q)	0,000005	1	0,000005	145,0943	0,000006*
(2)BAP (ppm) (L)	0,000001	1	0,000001	15,9043	0,005270*
BAP (ppm) (Q)	0,000002	1	0,000002	73,3002	0,000059*
(3)NaCl (mM) (L)	0,000000	1	0,000000	0,1691	0,693192
NaCl (mM) (Q)	0,000005	1	0,000005	143,6693	0,000006*
1L by 2L	0,000000	1	0,000000	0,0005	0,983284
1L by 3L	0,000000	1	0,000000	3,9209	0,088165
2L by 3L	0,000000	1	0,000000	4,3597	0,075194
Error	0,000000	7	0,000000		
Total SS	0,000008	16			

$R^2 = 0,97$; GL = GRAUS DE LIBERDADE; SQ = SOMA QUADRÁTICA; MQ = MÉDIA QUADRÁTICA;
 F = TESTE DE FISHER; P = PROBABILIDADE
 Nível de significância: *95%

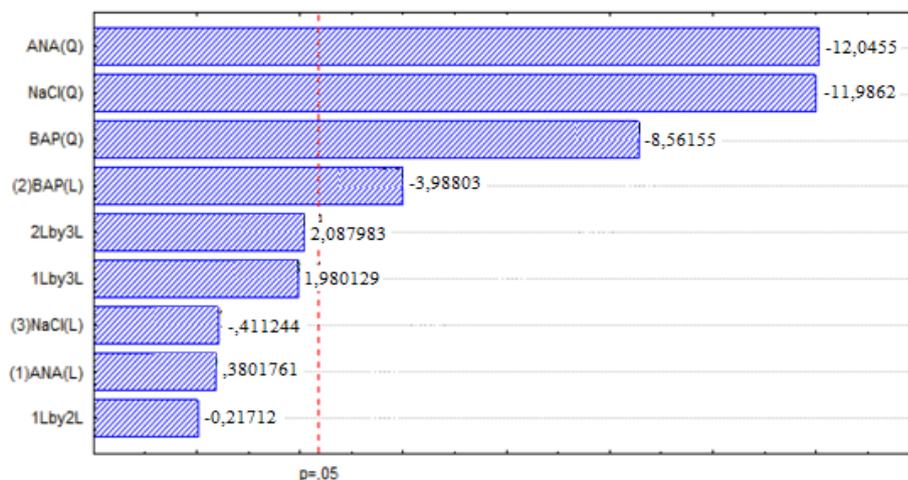


Figura 28. Diagrama de Pareto dos efeitos absolutos das variáveis independentes manipuladas para a atividade específica (U/mg) em tecidos de folha aos 30 dias de subcultivo *in vitro*.

Tabela 23. ANOVA para atividade específica (U/mg) em tecidos de caule aos 30 dias de subcultivo *in vitro*.

Fatores	SQ	GL	MQ	F	p
(1)ANA (ppm) (L)	0,000000	1	0,000000	0,09352	0,768644
ANA (ppm) (Q)	0,000044	1	0,000044	53,74467	0,000158*
(2)BAP (ppm) (L)	0,000000	1	0,000000	0,06185	0,810734
BAP (ppm) (Q)	0,000034	1	0,000034	42,37603	0,000331*
(3)NaCl (mM) (L)	0,000004	1	0,000004	4,44648	0,072932
NaCl (mM) (Q)	0,000026	1	0,000026	31,56215	0,000801*
1L by 2L	0,000000	1	0,000000	0,21308	0,658368
1L by 3L	0,000000	1	0,000000	0,01032	0,921934
2L by 3L	0,000000	1	0,000000	0,10679	0,753382
Error	0,000006	7	0,000001		
Total SS	0,000076	16			

$R^2 = 0,92$; GL = GRAUS DE LIBERDADE; SQ = SOMA QUADRÁTICA; MQ = MÉDIA QUADRÁTICA;
 F = TESTE DE FISHER; p = PROBABILIDADE
 Nível de significância: *95%

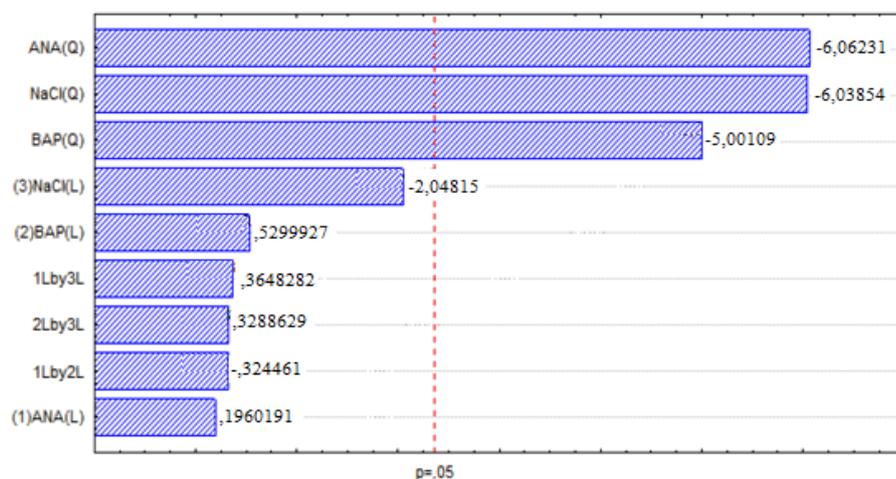


Figura 29. Diagrama de Pareto dos efeitos absolutos das variáveis independentes manipuladas para a atividade específica (U/mg) em tecidos de caule aos 30 dias de subcultivo *in vitro*.

Como foi possível observar neste estudo, a atividade da bromelina variou em função das concentrações das variáveis estudadas, da parte da planta utilizada e do tempo de cultivo, uma vez que foram obtidos valores diferentes para cada condição acima explicitada. Contudo, ao analisarmos de forma geral os dados obtidos, torna-se plausível inferir que ao compararmos os tecidos analisados bem como os períodos e as forma de cultivo, o caule obtido do subcultivo apresentou melhor resposta de atividade nestes experimentos.

Até o presente momento, nas pesquisas de levantamento bibliográfico realizadas, não foram encontrados registros que relacionassem a atividade de enzimas a subcultivos *in vitro*, no entanto, os resultados deste estudo, quanto à maior atividade da enzima no subcultivo e não no cultivo direto, são coerentes uma vez que de acordo com Grattapaglia e Machado (1998), no livro intitulado Cultura de Tecidos e Transformações Genéticas de Plantas, sucessivas subculturas podem rejuvenescer os tecidos, tornando a cultura mais reativa. Além disso, a troca do meio de cultura volta a fornecer a planta nutrientes essenciais ao seu desenvolvimento, somente fornecidos no início do cultivo. Dessa forma, esse processo de rejuvenescimento *in vitro* pode sim influenciar a atividade da enzima pelo simples fato de reativar todo o seu metabolismo.

Na sequência do trabalho, e a partir de modelos empíricos estabelecidos pelo software Statística[®] 8.0 (Figura 30 a 33), foi possível observar os gráficos de superfície de resposta que ratificaram a significância das variáveis estudadas. No entanto, em função do perfil das superfícies de resposta as quais não apresentam o ponto de maior atividade dentro da região tida como de máxima atividade, os modelos estatísticos que representam a atividade enzimática em tecidos de folha nos experimentos de subcultivo serão desconsiderados, em virtude da possibilidade desses modelos não serem válidos para representar os sistemas em estudo. Nesse sentido, somente os modelos referentes ao caule serão considerados.

Dessa forma, pelo software Statística[®] 8.0, a superfície correspondente ao modelo otimizado de 90 dias de cultivo foi gerada (Figuras 32 e 33), ratificando, assim, a validade do modelo proposto para representar os dados. Estas superfícies sugerem como condições para obtenção de maiores atividades (enzimática e específica) proporções de 0,099 ppm de ANA, 1,019 ppm e 68,20 mM para a atividade enzimática e, 0,100 ppm de ANA, 1,00 ppm e 67,40 mM de NaCl para a atividade específica. Condições estas que forneceriam a máxima atividade enzimática e específica previstas para 0,0217 U/mL e 0,0064 U/mg, respectivamente. Esses resultados confirmam os resultados obtidos experimentalmente, onde o valor máximo de atividade enzimática e específica (cerca de 0,0215 U/mL e 0,0063 U/mg, respectivamente) foram obtidas em tecidos de caule aos 30 dias de cultivo, trabalhando com concentrações de ANA, BAP e NaCl no ponto central do planejamento, 0,100 ppm de ANA, 1,000 ppm de BAP e 75 mM de NaCl.

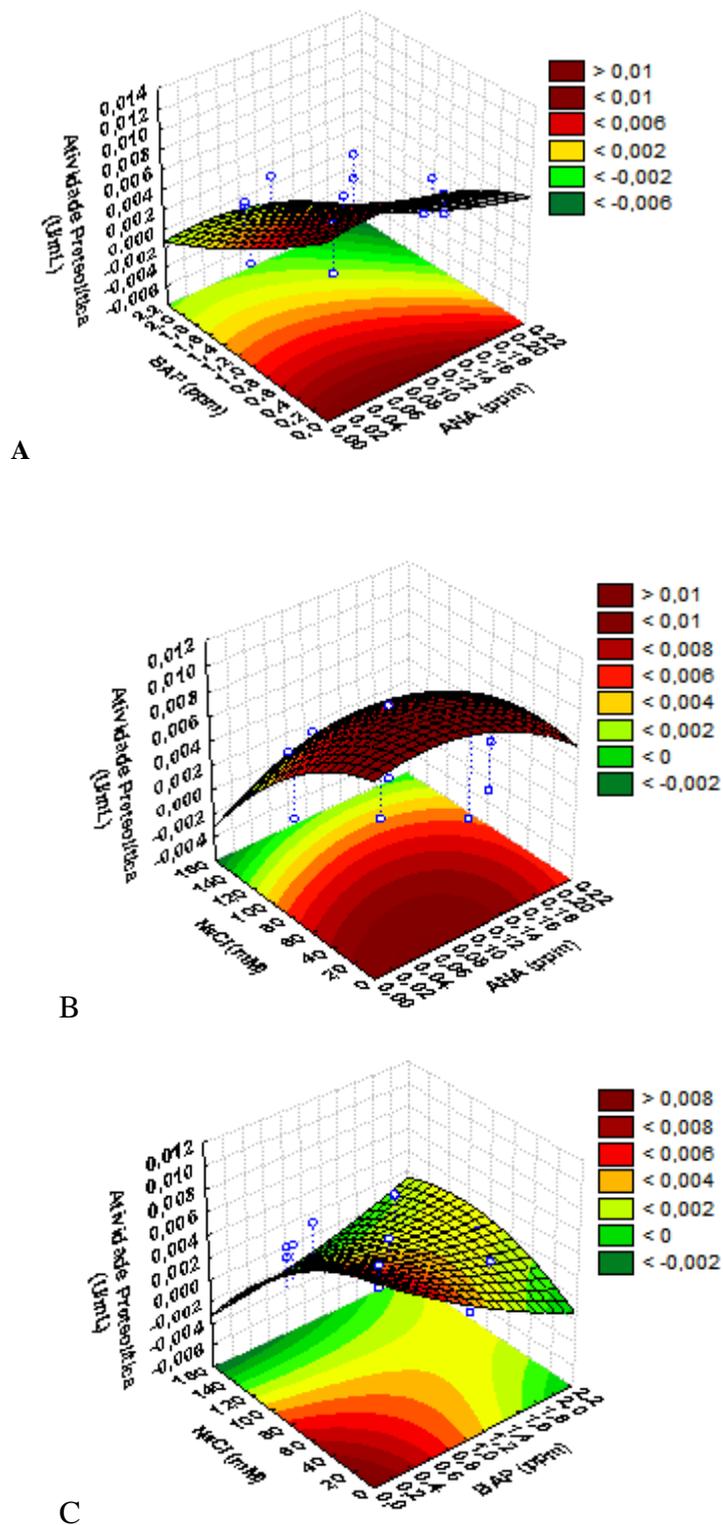


Figura 30. Superfícies de respostas representando os efeitos das diferentes interações entre as variáveis estudadas, e seus efeitos mútuos na atividade enzimática em tecidos de folha de abacaxizeiro aos 30 dias de cultivo *in vitro* a partir dos 60 dias: A - efeito das concentrações de ANA e BAP; B - efeito das concentrações de ANA e NaCl; C - concentrações de BAP e NaCl.

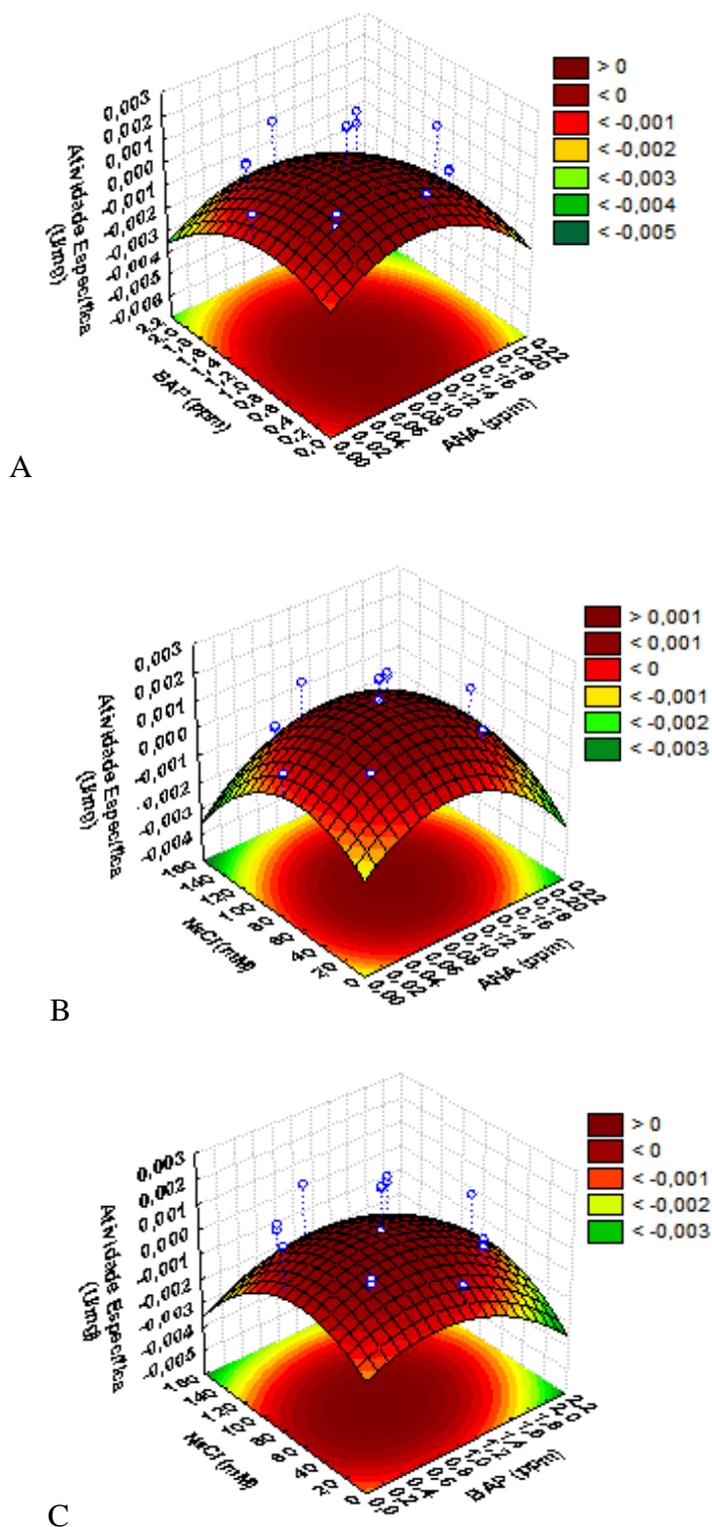
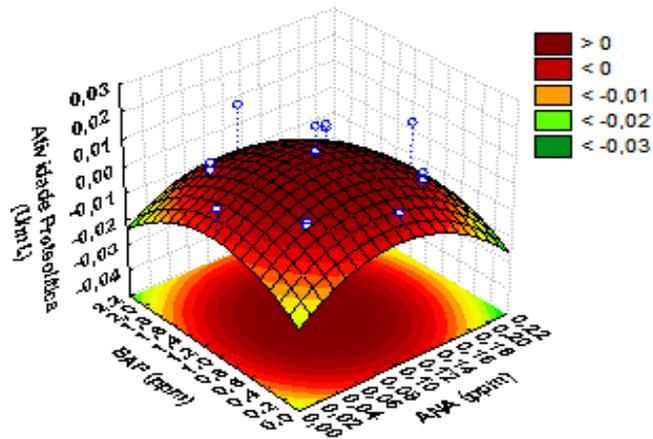
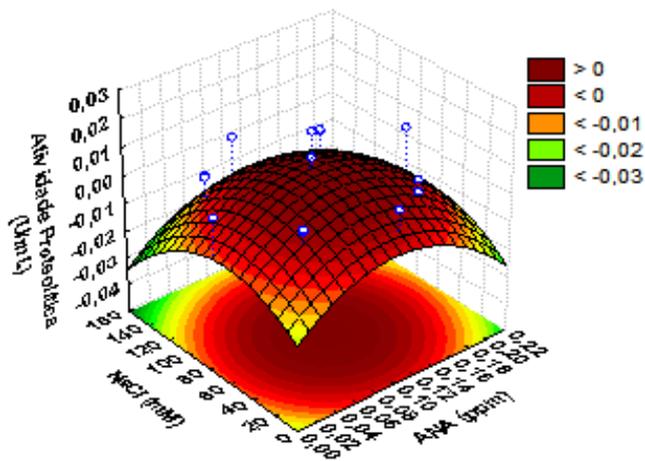


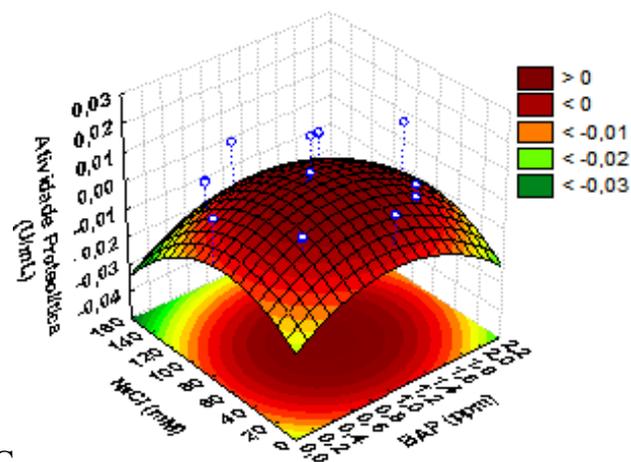
Figura 31. Superfícies de respostas representando os efeitos das diferentes interações entre as variáveis estudadas, e seus efeitos mútuos na atividade específica em tecidos de folha de abacaxizeiro aos 30 dias de cultivo *in vitro* a partir dos 60 dias: A - efeito das concentrações de ANA e BAP; B - efeito das concentrações de ANA e NaCl; C - concentrações de BAP e NaCl.



A

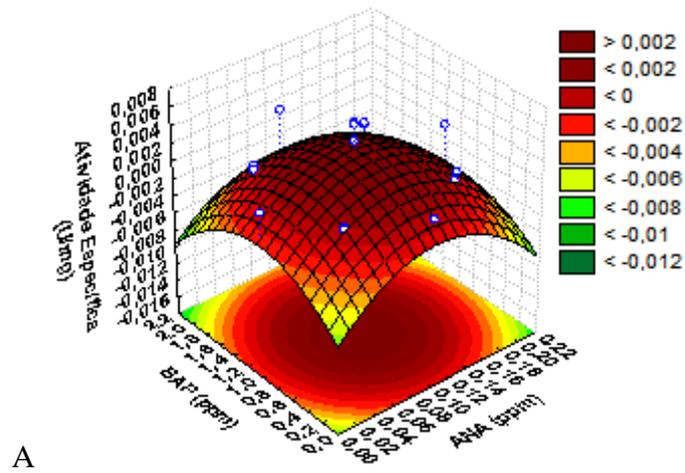


B

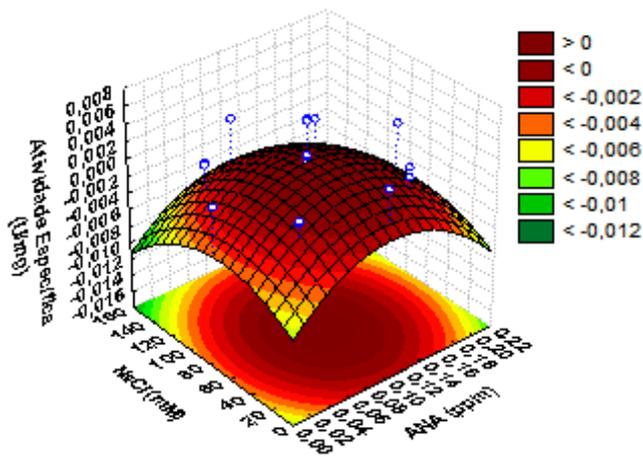


C

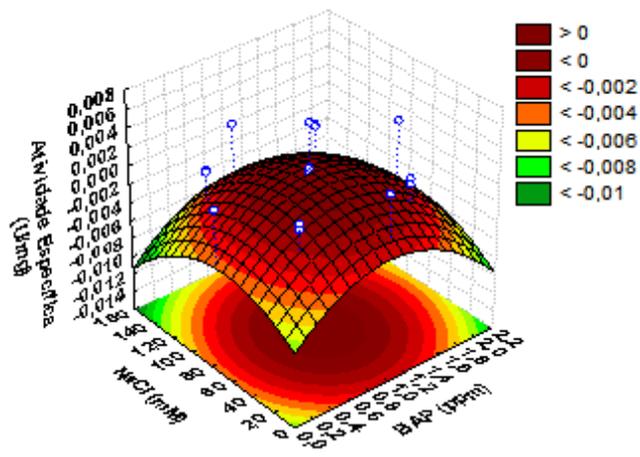
Figura 32. Superfícies de respostas representando os efeitos das diferentes interações entre as variáveis estudadas, e seus efeitos mútuos na atividade enzimática em tecidos de caule de abacaxizeiro aos 30 dias de cultivo *in vitro* a partir dos 60 dias: A - efeito das concentrações de ANA e BAP; B - efeito das concentrações de ANA e NaCl; C - concentrações de BAP e NaCl.



A



B



C

Figura 33. Superfícies de respostas representando os efeitos das diferentes interações entre as variáveis estudadas, e seus efeitos mútuos na atividade específica em tecidos de caule de abacaxizeiro aos 30 dias de cultivo *in vitro* a partir dos 60 dias: A - efeito das concentrações de ANA e BAP; B - efeito das concentrações de ANA e NaCl; C - concentrações de BAP e NaCl.

As análises de regressão (Anexo V e VI) para obtenção dos modelos realizadas em tecidos de folha nos experimentos de subcultivo (Tabela 18), com o intuito de ajustar a função do fator resposta atividade enzimática (y_1) e atividade específica (y_2) com os dados experimentais, estão apresentados nas equações 13 e 14, sendo os fatores respostas y_1 e y_2 apresentadas em função dos valores de ANA (x_1), BAP (x_2) e NaCl (x_3):

Eq. (13)

$$y_{1F60+30} = 0,009733 + 0,020460x_1 - 0,006306x_2 - 0,000025x_3 - 0,189578x_1^2 - 0,000586x_2^2 - 0,002271x_1x_2 + 0,000231x_1x_3 + 0,000045$$

Eq. (14)

$$y_{2F60+30} = -0,001494 + 0,033211x_1 - 0,001913x_2 + 0,000037x_3 - 0,183357x_1^2 - 0,001287x_2^2 + 0,000037x_3^2 - 0,000015x_1x_2 + 0,000047x_1x_3 + 0,000005x_2x_3$$

As análises de regressão (Anexo VII e VIII) para obtenção dos modelos realizadas em tecidos de caule nos experimentos de subcultivo (Tabela 19), novamente com o intuito de ajustar a função do fator resposta atividade enzimática (y_1) e atividade específica (y_2) com os dados experimentais, estão apresentados nas equações 15 e 16, sendo os fatores respostas y_1 e y_2 apresentadas em função dos valores de ANA (x_1), BAP (x_2) e NaCl (x_3):

Eq. (15)

$$y_{1C60+30} = -0,01936 + 0,31294x_1 + 0,02642x_2 + 0,00035x_3 - 1,5653x_1^2 - 0,0129x_2^2 - 0,00994x_1x_2 + 0,00015x_1x_3 + 0,00015x_1x_3$$

Eq. (16)

$$y_{2C60+30} = -0,007877 + 0,116949x_1 + 0,010046x_2 + 0,000099x_3 - 0,556033x_1^2 - 0,004937x_2^2 - 0,000001x_3^2 - 0,004152x_1x_2 - 0,000012x_1x_3 + 0,000004x_2x_3$$

7. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos neste trabalho, onde foi estudado o efeito de reguladores de crescimento e do estresse salino na atividade da bromelina, em diferentes tecidos de plantas de abacaxizeiro cultivados *in vitro*, bem como em diferentes tempos e formas de cultivo, direto ou com subcultivo conclui-se que:

- Em testes preliminares a atividade da bromelina, concentração de proteínas totais e atividade específica obtidas em plantas de abacaxizeiro cv. Pérola mostraram variação em relação aos níveis de salinidade e ao tecido vegetal analisado (caule ou folha); sendo os níveis mais expressivos de atividade obtidos em tecidos de caules na concentração de 100 mM de NaCl, enquanto que para os tecidos de folhas nos experimentos controle, sem adição de NaCl.
- Na metodologia estatística aplicada ao estudo da influência de diferentes concentrações de ANA, BAP e NaCl na atividade da bromelina aos 60 e 90 dias de cultivo, sugere que o balanço adequado dos mesmos ocasiona estresse positivo nas plantas de forma a aumentar a atividade dessa enzima.
- O tempo de cultivo e a parte da planta utilizada, são fatores que interferem na atividade da bromelina. Sendo o caule aos 90 dias de cultivo direto, quando em comparação ao de 60 dias, o tecido com níveis mais expressivos de atividade.
- Na Metodologia estatística aplicada ao estudo da influência de diferentes concentrações de ANA, BAP e NaCl na atividade da bromelina nos experimentos de subcultivo, foi obtida maior atividade em tecidos de caule. Além disso, ao compararmos as formas de cultivo, direto e subcultivo, à maior atividade da enzima foi encontrada nos experimentos com subcultivo.
- Deste modo, e pelos resultados aqui apresentados, pode ser sugerido a necessidade de novas pesquisas utilizando não somente concentrações de ANA e BAP e tempos de cultivo diferentes, mais também, o efeito dos sucessivos subcultivos que são realizados durante a fase de multiplicação das plantas, pois, a otimização do processo de produção de metabólitos em cultivos *in vitro* de plantas, pode oferecer diversas vantagens, entre elas benefícios financeiros uma vez que agregará valor ao vegetal estudado.

Capítulo 8

8. PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos mostraram a viabilidade da utilização de reguladores de crescimento e do NaCl no desenvolvimento de plantas de abacaxizeiro com maior teor de bromelina e mais resistentes à salinidade utilizando técnicas de cultura de tecidos. No entanto, alguns pontos ainda podem ser explorados, tais como:

- Avaliar diferentes concentrações de ANA e BAP em tempos maiores de cultivo *in vitro*;
- Avaliar o efeito dos sucessivos subcultivos frente as variáveis estudadas;
- Realizar estudos relacionando o balanço hormonal e seus efeitos químicos e bioquímicos na bromelina;
- Estudar a influência de outros hormônios, como por exemplo, o etileno na atividade.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL LATEF, A. A. Changes of antioxidative enzymes in salinity tolerance among different wheat cultivars. *Cereal Res. Comm.* v.38, p.43–55, 2010.
- ABÍLIO, G. M. F; HOLSCHUH, H. J; BORA P. S; OLIVEIRA, E. F. Extração, atividade da bromelina e análise de alguns parâmetros químicos em cultivares de abacaxi. *Rev. Bras. Fruticultura*, v.31, p. 1117-1121, 2009.
- AEHLE, W. (2007). *Enzymes in industry: Production and applications*. Chichester: Wiley. 3rd. Germany: Wiley-VCH 2007.
- AGASTIAN, P., KINGSLEY, S.J., VIVEKANANDAN, M., Effect of salinity on photosynthesis and biochemical characteristics in mulberry genotypes. *Photosynthetica*, v.38, p.287–290, 2000.
- AGHION, D., BEAUCHESNE, G. Utilization de la technique de culture sterile d’organes pour des clones d’Ananas. *Fruits* v. 15, p.464–466, 1960.
- ALAMGIR, A. N. M.; ALI, M. Y. Effect of salinity on leaf pigments, sugar and protein concentrations and chloroplast ATPase activity of rice (*Oryza sativa*L.). *Journal Bot.* v.28, p.145–149, 1999
- ALMEIDA, W. A. B. *et al.* Optimization of a protocol for the micropropagation of pineapple. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.24, n.2, p.296-300, 2002.
- AMID, A. *et al.* Expression, purification, and characterization of a recombinant stem bromelain from *Ananas comosus* *Process Biochemistry* v. 46 p. 2232–2239, 2011.
- APTE, P.V., KAKLIJ, G.S., HEBLE, M.R. Proteolytic enzymes (Bromelains) in tissue cultures of ananas sativus (pineapple). *Plant Science Letter.* v. 14, p. 57-62, 1979.
- AQUINO, M. C. de; Desenvolvimento de uma desfibradeira para obtenção da fibra da folha do abacaxi. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, RN, Brasil, 2006.
- ARAÚJO, P. S.; SILVA, J. M. O. D.; NECKEL, C. A.; IANSSEN, C.; OLTRAMARI, A. C.; PASSOS, R.; TIEPO, E.; BACH, D. B.; MARASCHIN, M. A unified method for purification of basic proteins. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, 25, p. 54-57, 2002.
- ARAÚJO, R. F.; SIQUEIRA, D. L.; CECON, P. R.; Multiplicação *in vitro* do abacaxizeiro ‘smooth cayenne’ utilizando benzilaminopurina (BAP) e ácido naftalenoacético (ANA). *Revista Ceres*, v. 55(5), p. 455-460, 2008.
- AYALA-ZAVALA, J. F., VEGA-VEGA, V., ROSAS-DOMÍNGUEZ, C., PALAFOX-CARLOS, H.; VILLA-RODRIGUEZ, J. A.; WASIM SIDDIQUI, M. D.; DÁVILA-AVIÑA, J. E.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives. *Food Research International.* v. 44, p. 1866–1874, 2011.

- BALDINI, V. L. S.; IADEROSA, M.; FERREIRA, E. A.; SALES, A. M.; DRAETTA, I.S.; GIACOMELLI, E. J. Ocorrência da bromelina em cultivares de abacaxizeiro. *Coletânea ITAL*, v.53, n. 1, p. 44-55, Campinas, 1993.
- BARBOZA, S. B. S. C.; CALDAS, L. S.; SOUZA, L. A. C. Micropropagação do híbrido PExSC-52 e da cultivar Smooth Cayenne de abacaxizeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. v. 39, n.8, p.725-733, 2004.
- BARROSO, P. A. V.; MOURA, G. E. D. D.; BRITO, L. K. F.; MARTINS, C. P.; MACÊDO, C. E. C.; LOPES, D. B.; ALLOUFA, M. A. I. Efeito do cultivo *in vitro* na presença de NaCl em plantas de abacaxizeiro na fase de aclimação. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 7, n. 3, p. 473-477, 2003.
- BENHAYYIM, G., FALTIN, Z., GEPSTEIN, S., CAMOIN, L., STROSBERG, A.D., ESHDAT, Y. Isolation and characterization of salt-associated protein in Citrus. *Plant Science*, v.88, p.129–140, 1993.
- BENUCCI, I; LIBURDI, K; GARZILLO, A. M. V; ESTI, M. Bromelain from pineapple stem in alcoholic–acidic buffers for wine application. *Food Chemistry*. v. 124, p. 1349–1353. 2011.
- BERNSTEIN, N.; SHORESH, M.; XU, Y.; HUANG, B. Involvement of the plant antioxidative response in the differential growth sensitivity to salinity of leaves vs roots during cell development. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 49, p 1161– 1171, 2010.
- BHATTACHARYA, R.; BHATTACHARYYA, D. *Biochimica et Biophysica. Acta Horticulturae*. v. 1794, p. 698–708, 2009.
- BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. *Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado*. 1ª ed. Rio de Janeiro: Interciência: UFRJ: CAPES: FAPERJ: FCT [Portugal], 2008.
- BORÉM, A. *Melhoramento de plantas*. 3.ed. Viçosa: UFV, 500p. 2001
- BORDE, M.; DUDHANE, M.; JITE, P. Growth photosynthetic activity and antioxidant responses of mycorrhizal and non-mycorrhizal bajra (*Pennisetum glaucum*) crop under salinity stress condition. *Crop Protection*. v. 30, p. 265-271, 2011.
- BOSCAIU, M.; BAUTISTA, I.; DONAI, P.; LINDON, A.; LLINARES, J.; Lull, C.; MAYORAL, O.; VICENTE, O. Plant responses to abiotic stress. *Current Opinion in Biotechnology*. v.22S, p.150-S152. 2011.
- BOX, G. E. P. *Statistics for experimenters*. Editora J. Wiley & Sons, New York, 1998.
- BRADFORD, M. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding, *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248, 1976.
- BRILHANTE, J. C. A.; SILVEIRA, J. A. G.; RO-CHA, I. M. A.; MORAIS, D. L.; VIEGAS, R. A. Influência do tempo de aclimação na resposta do cajueiro à salinidade. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 11, n. 2, p. 173-179, 2007.
- BRITO, L. K. F. L de B.; MOURA, G. E. D. D.; MARTINS, C. P.; ALLOUFA, M. A.I.; MACEDO, C. E. C.; LOPES, D. B.; BARROSO, P. A. V. Cultivo *in vitro* de somaclones de abacaxizeiro na presença de NaCl. *Revista Brasileira de Engenharia*

Agrícola e Ambiental. v.11, n.3, p.279–283, 2007.

- BROETTO, F. Efeito de estresse salino e biológico sobre o metabolismo de calos e suspensão de células de feijão. Tese de Doutorado, Escola Superior de Agricultura “Luís de Queiroz, Universidade de São Paulo. Piracicaba, SP, Brasil, 1995.
- CABRAL, J. R. Cultivares de abacaxi. Cruz das Almas: Embrapa-CNPMP(Circular Técnica, 33), 20 p. 1999.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (eds). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas . Brasília: Embrapa. p. 87-132. 1998.
- CASTRO, Paulo R. C.; VIEIRA, Elvis L. Aplicação de reguladores vegetais na agricultura tropical. 1ªed. Guaíba: Agropecuária, 132 p. 2001.
- CATO, S. C.; CASTRO, Paulo R. C. Redução da altura de plantas de soja causada pelo ácido 2,3,5 - triiodobenzóico. Ciência Rural, v.36, n.3, 2006.
- CÉSAR, A. C. W.; SILVA, R.; LUCARINI, A. C. Recuperação das enzimas proteolíticas presentes nas casca e talo do abacaxi. São Carlos: RIC, 1999.
- CÉSAR, A. C. W. Otimização dos parâmetros de extração líquido-líquido em duas fases aquosas na recuperação da bromelina presente no abacaxi. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, SP, Brasil, 2002.
- CÉSAR, A. C. W. Análise da viabilidade econômica de um processo de extração e purificação da bromelina do abacaxi. Tese Doutorado, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil, 2005.
- CHAVES, M. M.; FLEXAS, J.; PINHEIRO, C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany*, v. 103, p. 551-560, 2009.
- CHEEMA, G. S.; SHARMA, D. P. *In vitro* propagation of apple rootstocks-EMLA. *Acta Horticulturae*, v. 131, p. 75-88, 1983.
- CHOBOTOVA, K; VERNALLIS, A. B; MAJID, F. A. A. Bromelain’s activity and potential as an anti-cancer agent: Current evidence and perspectives. *Cancer Letters*, v.290, p. 148–156. 2010.
- CONVERSO, D. A.; FERNÁNDEZ, M. E.; TOMARO, M. L. Effect of development and salt stress on the activity and expression of wheat peroxidases. *Phyton*, v. 6, p. 147-156, 1997.
- CORZO, C. A; WALISZEWSKI, K. N; WELTI-CHANES, J. Pineapple fruit bromelain affinity to different protein substrates. *Food Chemistry* xxx (2011) xxx–xxx.
- COSTA. H. B. da; FORTUNATO, F. da S.; DELBONI, S. G.; VENTURA, J. A. Atividade proteolítica em caules de abacaxizeiro cvs. Vitória, Smooth Cayenne e Pérola. In: Simpósio Internacional do Abacaxi, 6, João Pessoa, PB. Anais... p. 264, 2007.

- COSTA, F. H. S.; PEREIRA, M. A. A.; OLIVEIRA, J. P.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Efeito de agentes geleificantes alternativos no meio de cultura no cultivo *in vitro* de abacaxizeiro e bananeira. *Ciência Agrotec.* v.31, p.41–46, 2007.
- CUNHA, G. A. P.; CABRAL, J. R. S.; SOUZA, L. F. S. O abacaxizeiro: cultivo, agroindústria e economia. Brasília: EMBRAPA, 1999. 480 p.
- DAVIES, P.J. Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action. 3.ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2004. 750p
- DEBIASI *et al.* Estudo das poliaminas na morfogênese *in vitro* de *Hemerocallis* sp. *Ciência Rural*, v.37, n.4, p.1014-1020, 2007.
- DEVAKATE, R.V; PATIL, V.V; WAJE, S.S; THORAT, B.N. Purification and drying of bromelain. *Separation and Purification Technology* 64, p. 259–264, 2009.
- DE WALD, M.G., MOORE, G. A., SHERMAN, W. B., EVANS, M. H. Production of pineapple plants *in vitro*. *Plant Cell Rep* v.7, p.535–537, 1988.
- DI CAGNO, R.; CARDINALI, G.; MINERVINI,G.; ANTONIELLI, L.; RIZZELLO, C. G.; RICCIUTI, P.; GOBBETTI, M. Taxonomic structure of the yeasts and lactic acid bacteria microbiota of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) and use of autochthonous starters for minimally processing. *Food Microbiology*, v. 27. p. 381 -389. 2010.
- DOKO, M.B; BASSANI, V; CASADEBAIG, J; CAVAILLES, L; JACOB, M. Preparation of proteolytic enzyme extracts from *Ananas comosus* L., Merr. fruit juice using semipermeable membrane, ammonium sulfate extraction, centrifugation and freeze-drying processes, *International Journal of Pharmaceutics* 76, p. 199–206, 1991.
- DUBEY, V. K., PANDE, M., SINGH, B. K., & JAGANNADHAM, M. V. Papain-like proteases: applications of their inhibitors. *African Journal of Biotechnology*, v. 6, p. 1077–1086, 2007.
- DUNCAN, R. R. Tissue culture-induced variation and crop improvement. *Advances in Agronomy*, New York, v.58, n.2, p.201-239, 1997.
- ESCALONA, M.; LORENZO, J. C.; GONZALEZ, B.; DAQUINTA, M.; GONZALEZ, J. L.; DESJARDINS, Y. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Reports*, n.18, p.743-748, 1999.
- FAGERIA, N. K.; GHEYI, H. R. Melhoramento genético das culturas e seleção de cultivares. In: Gheyi, H,R.; Queiroz, J.E. de; Medeiros, J.F. de (eds.) Manejo e controle da salinidade na agricultura irrigada. Campina Grande: SBEA/UFPB, p.363-383. 1997.
- FAO, disponível em www.fao.org.br.
- FEIJOO-SIOTA, L.; VILLA T. G. Native and Biotechnologically Engineered Plant Proteases with Industrial Applications. *Food Bioprocess Technol* v. 4, p.1066–1088, 2011.
- FERNANDEZ, G.; POMILIO, A. B. Optimized growth conditions and determination of the catalytic type of the peptidase complex from a novel callus culture of pineapple (*Ananas comosus*). *Mol Med Chem* v. 1, p.39-49, 2003.

- FERREIRA, J. F.; SANTANA, J. C. C.; TAMBOURGI, E. B. The Effect of pH on Bromelain Partition from Ananas comosus by PEG4000/Phosphate ATPS. *Braz. Arch. Biol. Technol.* v.54 n.1: pp. 125-132, 2011. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 54, n.1: pp. 125-132, Jan/Feb 2011.
- FILETI, A. M. F.; FISCHER, G. A.; SANTANA, J. C. C.; TAMBOURGI, E. B. Batch and Continuous Extraction of Bromelain Enzyme by Reversed Micelles. *Braz. Arch. Biol. Technol.* v.52, n.5, p. 1225-1234, Sept/Oct 2009.
- FRÁGUAS, C. B.; DORNELLES, C. M. da V.; LIMA, G. P. P. Benzilaminopurina e ácido naftaleno acético na indução e multiplicação *in vitro* de gemas de abacaxizeiro da cultivar 'IAC Gomo-de-mel'. *Ciência Rural*, v.39, n.6, p.1682-1687, set, 2009.
- FRANCK, T. *et al.* Hyperhydricity of *Prunus avium* shoots cultured on gelrite: a controlled stress response. *Plant Physiology and Biochemistry*, v.42, p.519-527, 2004.
- FREIMAN, L. O.; SRUR, A. U. O. Determinação de proteína total e escore de aminoácidos de bromelina extraídas dos resíduos do abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merrill). *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*, 19(2), 170-3, 1999.
- FTTCHET, M. Clonal propagation of Queen and Smooth Cayenne pineapple. *Acta Horticulturae*, v. 275, p.261-66, 1990.
- GADALLAH, M. A. A. Effects of proline and glycine betaine on *Vicia faba* response to salt stress. *Biol. Plant.* v.42, p.249–257, 1999.
- GEORGE, E.F. Plant propagation by tissue culture. Part 1. England: Exegetics, 327p. 1996.
- GEORGE, E. F. *et al.* (eds.), Micropropagation: Uses and Methods. In: *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition*, Editora Springer, p.29–64. 2008.
- GODOI, P. H. Estudo da atividade enzimática da bromelina pura em solução em diferentes temperaturas e pH. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP, Brasil, 2007.
- GONZÁLES, R.; LAUDAT, T.; ARZOLA, M.; MÉNDEZ, R.; MARRERO, P.; PULIDO, L. E.; DIBUT, B.; LORENZO, J. C. Effect of *Azotobacter chroococcum* on *in vitro* pineapple plants growth during acclimatization. *In vitro Cell Dev Biol Plant.* v.47, p.387–390, 2011.
- GOTTSCHALK, U. Overview of Downstream Processing in the Biomanufacturing Industry. *Comprehensive Biotechnology.* v.3, p.669-682. 2011.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. V.1(ed.) *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*, Brasília, EMBRAPA-SPI/ EMBRAPA-CNPq, p.183-260, 1998.
- GUERRA, M. P.; DAL VESCO, L. L.; PESCADOR, R.; SCHUELTER, A. R.; NODARI, R. O. Estabelecimento de um protocolo regenerativo para a micropropagação do abacaxizeiro. *Pesq. agropec. brasileira.*, v.34, n.9, p.1557-1563, 1999.
- GUEVEN, A., KNORR, D. Isoflavonoid production by soy plant callus suspension culture. *Journal of Food Engineering* v.103, n.3, p. 237-243, 2011.
- HALE, L. P.; GREER, P. K.; TRINH C. T.; JAMES, C. L. Proteína activity and stability of

- natural bromelain preparations. *International Immunopharmacology*, 2, p.783-793, 2005.
- HASEGAWA, P. M.; BRESSAN, R. A.; ZHU, J.; BOHNERT, H. J. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v.51, n.1, p.463-499, 2000.
- HEINICKE, R. M.; GORTNER, W. A. Stem bromelain: A new protease preparation from pineapple plants. *Economic Botany*, p.11 e 225, 1957.
- HEMAVATHI, A.B., HEBBAR, U.H., RAGHAVARAO, K.S.M.S. Reverse micellar extraction of bromelain from *Ananas comosus* L. *Merryl Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v.82, n.11, p.985-992, 2007.
- HERNANDEZ, J.A., CAMPILLO, A., JIMENEZ, A., ALACON, J.J., SEVILLA, F. Response of antioxidant systems and leaf water relations to NaCl stress in pea plants. *New Phytol.* v.141, p.241–25, 1999.
- HOLANDA, A. C.; SANTOS, R. V.; SOUTO, J. S. ALVES, A. R. Desenvolvimento inicial de espécies arbóreas em ambientes degradados por sais. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, v. 7, n. 1, p. 39 – 50, 2007.
- IBGE - Produção Brasileira de Abacaxi produzido pelo Instituto Brasileiro de Geografia Estatística. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br>. Acesso em 26/02/2012.
- JACOBS, A.; VAN WYK, P. S.; MARASA, W. F. O.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J.; COUTINHO, T. A. *Fusarium ananatum* sp. nov. in the *Gibberella fujikuroi* species complex from pineapples with fruit rot in South Africa. *Fungal Biology*, v.11, n.4, p. 515-527, 2010.
- KALRA N, BHUI K, ROY P, SRIVASTAVA S, GEORGE J, PRASAD S.; SHUKLA, Y. Regulation of p53, nuclear factor kappaB and cyclooxygenase-2 expression by bromelain through targeting mitogen-activated protein kinase pathway in mouse skin. *Toxicol Appl Pharmacol*, v.226, p.30–7, 2008.
- KIELING, D. D. Enzimas – aspectos gerais. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2002.
- KIERAN, P. Bioreactor design for plant cell suspension cultures. In: Cabral JMS editors. Principles of multiphase reactor design. Harwood Academic Publishers; p. 391-426. 2001.
- KILIKIAN, B. V.; BASTAZIN, M. R.; NINAMI, N. M.; GONÇALVES, E. M. R.; JUNIOR, A. P. Liquid-Liquid Extraction by Reversed Micelles in Biotechnological Process. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v.17, n.1, p.29-38, 2000.
- KISS, E.; KISS, J.; GYULAI, G.; HESZKY, L. E. A novel method for rapid micropropagation of pineapple. *HortScience*, v. 30, n. 1, p. 127-129, 1995.
- KUMAR, S; HEMAVATHI, A.B; HEBBAR, H. U. Affinity based reverse micellar extraction and purification of bromelain from pineapple (*Ananas comosus* L. Merryl) waste. *Process Biochemistry*, v. 46, p. 1216–1220, 2011.

- KETNAWA, S., *et al.*, Pineapple wastes: A potential source for bromelain extraction. *Food Bioprod Process* (2012), doi:10.1016/j.fbp.2011.12.006
- KILIKIAN, B. V., PESSOA-JR, A. Purificação de produtos biotecnológicos. Barueri, SP, Manole, 2005.
- KRIKORIAN, A. D. 1991. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. In: ROCA WH; MROGINSKI LA. (eds.). Cultivo de tejidos em la agricultura - Fundamentos y aplicaciones. Cali: CIAT. p. 41-78.
- LARCHER, W. Regulação do crescimento e desenvolvimento. In: *Ecofisiologia Vegetal*. São Carlos, SP: Rima Artes e Textos, p. 297. 2000.
- LAKSHMI, S. G., SIMGH R., IYER, C. P. A. Plantlets Through Shoot-Tip culture in pineapple. *Current Science*, 43:22:724-725, 1974.
- LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. Princípios de bioquímica. 3. ed. São Paulo: Sarvier Editora de Livros Médicos LTDA, 2002.
- LEITE, N. S.; LIMA, A. A. B.; SANTANA, J. C. C.; LOPES, F. L. G. Determination of Optimal Condition to Obtain the Bromelain from Pineapple Plants Produced by Micropropagation. *Brazilian Archives of Biology and Technology* v. 55, p. 647-652, 2012.
- LI, Y., ZHANG, Y., FENG, F., LIANG, D., CHENG, L., MA, F., SHI, S., Overexpression of a *Malus vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene (MdNHX1)* in apple rootstock M.26 and its influence on salt tolerance. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* v. 102, p. 337–345, 2010.
- LIMA, G.P.P. *et al.* Poliaminas e atividade da peroxidase em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivado sob estresse salino. *Scientia Agrícola* , v.56, p.21-25, 1999.
- LIMA, C. S. M.; BANDEIRA, J. M. B.; RUBIN, S.; RIBEIRO, M. V.; BENITEZ, L.; PETERS, J. A.; BRAGA, E J B. Influência de fitorreguladores no crescimento *in vitro* de partes aérea de *Mentha viridis*. *Nota Científica. Revista Brasileira de Biociências*, v. 5, p. 669-671, 2007.
- LIN, C.C.; KAO, C.H. Regulation of ammonium-induced proline accumulation in detached rice leaves. *Plant Growth Regulation*, v.35, p. 69-74, 2001.
- LIN, C.C., HSU, Y.T., KAO, C.H., 2002. The effect of NaCl on proline accumulation in rice leaves. *Plant Growth Regul.* v.36, p.275–285, 2002.
- LOPES, F. L. G; SEVERO, J. B. J; SANTANA, J. C. C; SOUZA, R. R; TAMBOURGI, E. B. Utilização de membranas planas na concentração de enzimas bromelinas da polpa de abacaxi (*Ananas comosus* L.). *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, 7, n.1, p.33-38, 2005.
- LOPES, F. L. G.; SEVERO, J. B. J.; SOUZA, R. R.; EHRHARDT, D. D.; SANTANA, J. C. C.; TAMBOURGI, E. B. Concentration by Membrane Separation Processes of a Medicinal Product Obtained from Pineapple Pulp. *Braz. Arch. Biol. Technol.* v.52, p. 457-464, 2009.
- LOPEZ, F.; VANSUYT, G.; FOURCROY, P.; CASSE-DELBART, F. Accumulation of a 22-kDa protein in the leaves of *Raphanus sativus* in response to salt stress or water deficit. *Physiology Plant*, v. 91, p.605–614, 1994.

- LUTTS, S.; KINET, J.M.; BOUHARMONT, J. NaCl impact on somaclonal variation exhibited by tissue culture-derived fertile plants of rice (*Oryza sativa* L.) *Journal of Plant Physiology*, v.152. p.92-103, 1998.
- MACÊDO, C. E. C.; SILVA, M. G.; NÓBREGA, F. S.; MARTINS, C. P.; BARROSO, P. A. V.; ALLOUFA, M. A. Concentrações de ANA e BAP na micropropagação de abacaxizeiro L. Merrill (*Ananas comosus*) e no cultivo hidropônico das plântulas obtidas *in vitro*. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 25, n.3, p.501-504. 2003.
- MACÊDO, C. E. C.; BARROSO, P. A. V.; MOURA, G. E. D. D.; ALLOUFA, A. I. A. Efeito do NaCl sobre o crescimento e a multiplicação *in vitro* de bananeira. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 27, n. 2, p. 194-197, 2005.
- MAPES, M. O. Tissue culture of bromeliads. *Proc Int Plant Prop Soc.* v.23, p.47–55, 1973.
- MARCIANI-BENDEZÚ, J.; PINTO, J. E. B. P.; PASQUAL, M. (1990) Efeito de benzilaminopurina (BAP) sobre a proliferação de brotos de abacaxizeiro, a partir de plântulas produzidas *in vitro*. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.12, p.135-39, 1990.
- MARTINEZ, V.; CERDA, A. Nitrate reductase activity in tomato and cucumber leaves as influenced by NaCl and N source. *Journal Plant Nutrition* , v. 12, p. 1335-1350, 1989.
- MAURER, H.R. Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 58(9), p. 1234-1245, 2001.
- MAZZOLA, P.G., LOPES, A.M., HASMANN, F.A., JOZALA, A.F., PENNA, T.C.V., Magalhaes, P.O., Rangel-Yagui, C.O., Pessoa-JR, A. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 83(2), p. 143–157, 2008.
- MEDEIROS D. N.; MACÊDO, C. E. C.; ALLOUFA, M. A. I. Efeito do NaCl sobre a multiplicação *in vitro* de abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merrill). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 23:1:01-05. 2001.
- MEDINA, J. C.; BLEIINTROTH, W. E.; HASHIZUME, T. ABACAXI – da cultura ao processamento e comercialização. ITAL, 1978.
- MELANDER, W.; HORVATH, C. Salt effects on hydrophobic interactions in precipitations and chromatography of proteins: An interpretation of the lyotropic series. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v.170, p.200-15, 1977.
- MELETTI, L. M. M.; SAMPAIO, A. C.; RUGGIERO, C. Avanços na fruticultura tropical no Brasil. *Revista Bras. Fruticultura.*, Volume Especial, E. p. 73-75, 2011.
- MELO, Y. L.; GOMES, I. A.; DANTAS, C. V. S.; BRITO, L. K. F.; OLIVEIRA, M. D. de MELLO.; MACÊDO, C. E. C. Indicadores de estresse salino em abacaxizeiro cultivado na ausência e presença de fitoreguladores. *Revista Brasileira de Fruticultura.* v. 33, n. 3, p. 698-705, 2011.
- MEINIG, G. E. Bromelain. *Phytomedicine*, v. 2, p. 1-2, 1999.
- MERCIER, H.; YOSHIDA, M. K. Bromelain activity in the leaf tissue of *Bromelia antiacantha*. *Journal Bromeliad Society.* v.48, n.1, p. 6-10, 1998.
- MOREIRA, M. A.; PASQUAL, M.; CARVALHO, J. G.; FRÁGUAS, C. B. Estiolamento na

- micropropagação do abacaxizeiro CV. Pérola. *Ciência e Agrotecnologia*, v.27, n.5, p.1002-1006, 2003.
- MOURA, M. N. C. Estudo da atividade enzimática da Bomelina pura em resíduo de abacaxi em diferentes pHs e temperatura constante. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, SP, Brasil, 2010.
- MUNNS R, TESTER M. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*. v.59, p.651-681, 2008.
- MURACHI, T. Bromelain enzymes. In: LORAND, L. *Methods in Enzymology*, p. 475-485, v. XLV, New York: Academic Press, 1976.
- MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue culture. *Annual Review of Plant Physiology*. v. 25, p. 135-66, 1974.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v.15, p.473-497, 1962.
- MUTHUKUMARASAMY, M., GUPTA, S.D., PANNERSELVAM, R., Enhancement of peroxidase, polyphenol oxidase and superoxide dismutase activities by triadimefon in NaCl stressed *Raphanus sativus* L. *Biol. Plant*. v.43, p.317-320, 2000.
- MYNOTT, T.L., LADHAMS, A., SCARMATO, P., ENGWERDA, C.R. Bromelain, from pineapple stems, proteolytically blocks activation of extracellular regulated kinase-2 in T cells. *The Journal of Immunology*; v. 163, p. 2568-75, 1999.
- OLIVEIRA, M. Gênese, classificação e extensão de solos afetados por sais. In: Gheyi, H. R.; Queiroz, J. E.; Medeiros, J.F. de (eds.) *Manejo e controle da salinidade na agricultura irrigada*. Campina Grande: SBEA/UFPB, p.1-35, 1997.
- ONAY, A., YILDIRIM, H., TOKATLI, Y.O., AKDEMIR, H., SUZERER, V. Plant tissue culture techniques —Tools in plant micropropagation. *Current Opinion in Biotechnology*. 22S, S15-S152. 2011.
- PANDOLFINI, T.; MOLESINI, B.; SPENA, A. Molecular dissection of the role of auxin in fruit initiation. *Trends in Plant Science*. V. 12, n. 8, p. 237-238, 2007.
- PARK, Y. K. Purificação de enzimas industriais de origem vegetal. In: *Biotecnologia industrial*. Volume 3. Processos fermentativos e enzimáticos. Cood: BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. 1. ed. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 2001.
- PARIDA, A. K.; DAS, A. B. NaCl stress causes changes in photosynthetic pigments, proteins and other metabolic components in the leaves of a true mangrove, *Bruguiera parviflora*, in hydroponic cultures. *Journal Plant Biol*. v.45, p. 28-36. , 2002.
- PARIDA, A. K.; DAS, A. B. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 60, p.324-349, 2005.
- PASQUAL, M.; HOFFMANN, A.; RAMOS J. D. *Cultura de tecidos - tecnologia e aplicações*. Introdução: Situação e Perspectivas. Lavras: UFLA/FAEPE. 72 p. 2001.
- PENEL, C. *et al.* Role du calcium dans l'association des peroxidases à des membranes de

- raciness de lentille. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, v.289, p.29-33, 1979.
- PEREIRA, J. E. S., LIMA, E. DA C. A., SILVA, T. L. S., MESQUITA, A. G. G., MACIEL, S. A., COSTA, F. H. da S. Double-phase culture system for large scale production of pineapple. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, v. 109, p.263–269, 2012.
- PESCADOR, R.; KOLLER, O. C. Propagação *in vitro* do abacaxizeiro (*Ananas comosus* L.) Merrill. cv. Pérola. *Revista Brasileira Fruticultura*, 14: 1-4. 1994.
- PICOLI, E. A. T. *et al.* Hyperhydricity in *in vitro* eggplant regenerated plants: structural characteristics and involvement of BiP (Binding Protein). *Plant Science*. v.160, p.857-868, 2001.
- PIZA, I. M. T.; LIMA, G. P. P.; BRASIL, O. G. Reguladores vegetais na micropropagação do abacaxizeiro. *Revista Ceres*. v. 48, n. 280, p.681-690, 2001.
- PIZA, I. M. T.; LIMA, G. P. P.; BRASIL, O. G.; PIZA, P. L. B. T. Atividade da enzima bromelina em plantas de abacaxi (*Ananas comosus* L. Merrill), sob condições de salinidade *in vitro*. *Revista Brasileira Plantas Mediciniais*, v.5, n. 1, p. 68-73, 2002.
- PIZA, I. M. T.; LIMA, G. P. P.; BRASIL, O. G. Atividade de peroxidase e níveis de proteínas em plantas de abacaxizeiro micropropagadas em meio salino. *Revista Brasileira de Agrociência*, v. 9, n. 4, p. 361-366, 2003.
- QASIM, M.; ASHRAF, M.; ASHRAF, M. Y.; REHMAN, S. U.; RHA, E. S. Saltinduced changes in two canola cultivars differing in salt tolerance. *Biologia Plantarum*. v.46, p.629-632, 2003.
- RABELO, A.P.B., TAMBOURGI, E.B., A. PESSOA JR. Bromelain partitioning in two-phase aqueous systems containing PEO–PPO–PEO block copolymers, *Journal of Chromatography B*, 807, p. 61–68, 2004.
- RAMACHANDRA RAO, S.; RAVISHANKAR, G.A. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, v.20, p.101-153, 2002.
- RAVEN, P. H. *Biologia Vegetal In Regulando o Crescimento e o Desenvolvimento: Os Hormônios Vegetais*. 6ª. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., pg. 649 a 675, 2001.
- RAVINDRA BABU, B., RASTOGI, N.K., RAGHAVARAO, K.S.M.S. Liquid–liquid extraction of bromelain and polyphenol oxidase using aqueous two-phase system. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. v.47, p.83–89, 2008.
- REINHARDT, D. H. R. C. Manejo e produção de mudas de abacaxi. *Informe Agropecuário*, v. 19, n. 195, p. 13-19, 1998.
- REINHARDT, D. H.; SOUZA, J. da S. Pineapple industry and research in Brazil. *Acta Horticulturae*, n. 529, p. 57-71, 2000.
- REINHARDT, D. H.; SOUZA, L. F. D. S.; CABRAL, J. R. S. Abacaxi ir-rigado em condições semi-áridas. 1.ed. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2001.108p.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Planejamento de experimentos e otimização de processos, Editora Casa do Pão, São Paulo, 2005.
- ROWAN, A. D.; BUTTLE, D. J.; BARRETT, A. J. The cysteine proteinases of the pineapple

- plant. *Biochemical Journal*, 266, n. 3, p. 869-75, 1990.
- SAHER, S. *et al.* Hyperhydricity in micropropagated carnation shoots: the role of oxidative stress. *Physiologia Plantarum*, v.120, p.152-161, 2004.
- SAID, S.; PIETRO, R. Enzimas de interesse industrial e biotecnológico. Rio de Janeiro: Editora Eventos, 2002.
- SAKHANOKHO, H. F.; KELLEY, R. Y. Influence of salicylic acid on *in vitro* propagation and salt tolerance in *Hibiscus acetosella* and *Hibiscus moscheutos*(cv 'Luna Red'). *Afr. J. Biotechnol.* v.8, p.1474–1481, 2009.
- SALAS, C.E.; Gomes, M. T. R.; HERNANDEZ, M.; LOPES, M. T. P. Plant cysteine proteinases: Evaluation of the pharmacological activity. *Phytochem*, v.69, p. 2263-9, 2008.
- SANTANA, L. L de A. *et al.* Altas densidades de plantio na cultura do abacaxi cv. Smooth Cayenne, sob condições de sequeiro. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.23, n.2, p.353-358, 2001.
- SBRUZZI, D. Análise da viabilidade econômica da purificação da bromelina das folhas de curauá em sistema bifásico aquoso PEG/Fosfato. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2010.
- SOUZA, A. S.; COSTA, M. A. P. C.; SANTOS-SEREJO, J. A. dos.; JUNGHANS, T.G.; SOUZA, F. V. D. Introdução à cultura de tecidos de plantas. In: Introdução micropropagação de plantas. Cruz das Almas. Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. p. 11-37, 2006.
- SILVA, A. B.; PASQUAL, M.; TEIXEIRA, J. B.; ARAÚJO, A. G. Métodos de micropropagação de abacaxizeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. v.42, p.1257–1260, 2008.
- SPIRONELLO, ADEMAR *et al.* Avaliação agrotecnológica de variedades de abacaxizeiro, conforme os tipos de muda, Cordeirópolis (SP). *Bragantia*, Campinas, v. 56, n. 2, p. 333-342, 1997.
- SRIWATANAPONGSE, A; BALABAN, M; TEIXEIRA, A. Thermal inactivation kinetics of bromelain in pineapple juice. *Transactions of the ASAE*, v.43, n.6, p. 1703–1708, 2000.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. Porto Alegre: Artmed, 2009.
- TEIXEIRA, J. B.; CRUZ, A. R. R.; FERREIRA, F. R.; CABRAL, J. R. Biotecnologia aplicada à produção de mudas: produção de mudas micropropagadas de abacaxi. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, v. 3, p. 42-47, 2001.
- TEIXEIRA, S. L.; RIBEIRO, J. M.; TEIXEIRA, M. T. Influence of NaClO on nutrient medium sterilization and on pineapple (*Ananas comosus* cv. smooth cayenne) behavior. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* v.86, p.375–378, 2006.
- THORPE, T. A. History of plant tissue culture. *Molecular Biotechnology*, v.37, p.169-80, 2007.
- TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J.A. *Cultura de Tecidos e Transformação Genética*

de Plantas. Volume I. Embrapa/Brasília. 509p. 1998.

- TORRES, B. B. Elementos de enzimologia. In: Biotecnologia industrial. Volume I. Fundamentos. Cood: BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. 1. ed. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 2001.
- ULISSES, C.; ROCHA, P.; ALBURQUERQUE, C. et. al., Determinação de prolina em yemas de plátano (*Musa SP. cv Nanição - AAA*) selecionadas *in vitro* em cuanto a La tolerancia a La salinidad. Encuentro Latinoamericano de Biotecnologia, v.1, p. 334-5, 1998.
- UMESH HEBBAR, H., SUMANA, B., RAGHAVARAO, K.S.M.S. Use of reverse micellar systems for the extraction and purification of bromelain from pineapple wastes. *Bioresource Technology*, v. 99, n.11, p. 4896–4902, 2007.
- VENTURA, J. A. Fusariose do abacaxizeiro caracterização do patógeno, epidemiologia da doença, resistência e micropropagação do hospedeiro *in vitro*. Tese de doutorado. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa. 111p. 1994.
- VILLA, F.; PASQUAL, M.; ARAÚJO, A. G.; PIO, L. A. P. Micropropagação da amoreira-preta (*Rubus spp.*) e efeito de substratos na aclimatização de plântulas. *Acta Scientific Agronomy*, v. 28, n. 1, p. 47-53, Jan./March, 2006.
- VILANOVA-NETA, J. L.; LÉDO, A. da S.; LIMA, A. A. B. SANTANA, J. C. C.; RUZENE, D. S.; SILVA, D. P. Bromelain Enzyme from Pineapple: *In vitro* Activity Study under Different Micropropagation Conditions. *Appl Biochem Biotechnol.* v 168, p. 234–246, 2012.
- WANG, Y.; NIL, N. Changes in chlorophyll, ribulose biphosphate carboxylase–oxygenase, glycine betaine content, photosynthesis and transpiration in *Amaranthus tricolor* leaves during salt stress. *Journal Hortic. Sci. Biotechnol.*, v. 75, p. 623–627, 2000.
- XIAO Y, NIU G, KOZAI T. Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* v.105, p.149–158, 2011.
- WEBER, O. B.; CORREIA, D.; ROCHA, M. W.; ALVEZ, G. C.; OLIVEIRA, E. M. O.; SÁ, E. G. Resposta de plantas micropropagadas de abacaxizeiro à inoculação de bactérias diazotróficas em casa de vegetação. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 38, n. 12, p. 1419-1426, 2003.
- XIONG, L.; ZHU, J. Molecular and genetic aspects of plant respon-ses to osmotic stress. *Plant, Cell and Environment*, v.25, n.2, p.131-139, 2001.
- YANG, C.W.; KAO, C.H. Ammonium in relation to proline accumulation in detached rice leaves. *Plant Growth Regulation, Dordrecht*, v.30, n.2, p.139-144, 2000.

ANEXOS I e II

Tabela 1. Análise de regressão para o fator resposta atividade enzimática (y_1) obtido a partir dos tecidos de folha aos 60 dias de cultivo quando em planejamento fatorial 2^3 com seis pontos axiais e três repetições do ponto central.

Efeitos	Coefficiente	Erro Padrão	t valor	p valor	-95% Confiança	+95% Confiança
Média	0,018441	0,001790	10,30257	0,000018	0,014208	0,022673
x_1	-0,102153	0,017316	-5,89948	0,000600	-0,143098	-0,061208
x_1^2	0,096170	0,065117	1,47688	0,183224	-0,057807	0,250146
x_2	-0,009591	0,001732	-5,53908	0,000870	-0,013686	-0,005497
x_2^2	0,003635	0,000651	5,58217	0,000831	0,002095	0,005175
x_3	-0,000113	0,000023	-4,88873	0,001776	-0,000168	-0,000058
x_3^2	0,000000	0,000000	2,37089	0,049541	0,000000	0,000001
$x_1 x_2$	0,023715	0,007723	3,07088	0,018045	0,005454	0,041977
$x_1 x_3$	0,000604	0,000103	5,86332	0,000622	0,000361	0,000848
$x_2 x_3$	0,000009	0,000010	0,86472	0,415839	-0,000015	0,000033

Tabela 2. Análise de regressão para o fator resposta atividade específica (y_2) obtido a partir dos tecidos de folha aos 60 dias de cultivo quando em planejamento fatorial 2^3 com seis pontos axiais e três repetições do ponto central.

Efeitos	Coefficiente	Erro Padrão	t valor	p valor	-95% Confiança	+95% Confiança
Média	0,003163	0,000504	6,26911	0,000416	0,001970	0,004356
x_1	-0,020823	0,004880	-4,26674	0,003716	-0,032364	-0,009283
x_1^2	0,048659	0,018353	2,65127	0,032881	0,005261	0,092057
x_2	-0,000958	0,000488	-1,96242	0,090496	-0,002112	0,000196
x_2^2	0,000629	0,000184	3,42646	0,011038	0,000195	0,001063
x_3	-0,000023	0,000007	-3,48541	0,010192	-0,000038	-0,000007
x_3^2	0,000000	0,000000	1,75715	0,122311	0,000000	0,000000
$x_1 x_2$	-0,000632	0,002177	-0,29017	0,780092	-0,005778	0,004515
$x_1 x_3$	0,000115	0,000029	3,95173	0,005520	0,000046	0,000183
$x_2 x_3$	0,000001	0,000003	0,30675	0,767960	-0,000006	0,000008

Tabela 3. Análise de regressão para o fator resposta atividade enzimática (y_1) obtido a partir dos tecidos de folha aos 90 dias de cultivo quando em planejamento fatorial 2^3 com seis pontos axiais e três repetições do ponto central.

Efeitos	Coeficiente	Erro Padrão	t valor	p valor	-95% Confiança	+95% Confiança
Média	0,006160	0,002481	2,48328	0,042008	0,000294	0,012026
x_1	-0,012004	0,023999	-0,50019	0,632280	-0,068752	0,044744
x_1^2	0,062538	0,090249	0,69295	0,510671	-0,150867	0,275943
x_2	-0,002355	0,002400	-0,98116	0,359202	-0,008029	0,003320
x_2^2	0,002527	0,000902	2,79972	0,026535	0,000393	0,004661
x_3	-0,000048	0,000032	-1,48510	0,181097	-0,000123	0,000028
x_3^2	0,000000	0,000000	1,33063	0,225019	-0,000000	0,000001
$x_1 x_2$	-0,024548	0,010703	-2,29351	0,055519	-0,049857	0,000761
$x_1 x_3$	0,000400	0,000143	2,80257	0,026427	0,000063	0,000738
$x_2 x_3$	-0,000017	0,000014	-1,19477	0,271082	-0,000051	0,000017

Tabela 4. Análise de regressão para o fator resposta atividade específica (y_2) obtido a partir dos tecidos de folha aos 90 dias de cultivo quando em planejamento fatorial 2^3 com seis pontos axiais e três repetições do ponto central.

Efeitos	Coeficiente	Erro Padrão	t valor	p valor	-95% Confiança	+95% Confiança
Média	0,000334	0,000404	0,82797	0,435006	-0,000620	0,001289
x_1	0,007697	0,003904	1,97131	0,089318	-0,001536	0,016929
x_1^2	-0,041650	0,014683	-2,83665	0,025165	-0,076369	-0,006931
x_2	0,000418	0,000390	1,06938	0,320380	-0,000506	0,001341
x_2^2	0,000008	0,000147	0,05459	0,957989	-0,000339	0,000355
x_3	-0,000004	0,000005	-0,82512	0,436518	-0,000017	0,000008
x_3^2	0,000000	0,000000	0,44149	0,672173	-0,000000	0,000000
$x_1 x_2$	-0,003499	0,001741	-2,00922	0,084463	-0,007616	0,000619
$x_1 x_3$	0,000062	0,000023	2,64782	0,033046	0,000007	0,000116
$x_2 x_3$	-0,000002	0,000002	-1,01523	0,343794	-0,000008	0,000003

ANEXOS III e IV

Tabela 5. Análise de regressão para o fator resposta atividade enzimática (y_1) obtido a partir dos tecidos de caule aos 60 dias de cultivo quando em planejamento fatorial 2^3 com seis pontos axiais e três repetições do ponto central.

Efeitos	Coefficiente	Erro Padrão	t valor	p valor	-95% Confiança	+95% Confiança
Média	0,014331	0,001400	10,23568	0,000018	0,011021	0,017642
x_1	-0,085110	0,013545	-6,28352	0,000411	-0,117138	-0,053081
x_1^2	0,308198	0,050937	6,05063	0,000516	0,187752	0,428644
x_2	-0,005946	0,001354	-4,38974	0,003196	-0,009149	-0,002743
x_2^2	-0,000370	0,000509	-0,72665	0,491017	-0,001575	0,000834
x_3	-0,000111	0,000018	-6,16267	0,000462	-0,000154	-0,000069
x_3^2	0,000000	0,000000	5,50277	0,000904	0,000000	0,000001
$x_1 x_2$	0,039544	0,006041	6,54601	0,000320	0,025260	0,053829
$x_1 x_3$	-0,000010	0,000081	-0,12975	0,900416	-0,000201	0,000180
$x_2 x_3$	0,000036	0,000008	4,42572	0,003060	0,000017	0,000055

Tabela 6. Análise de regressão para o fator resposta atividade específica (y_2) obtido a partir dos tecidos de caule aos 60 dias de cultivo quando em planejamento fatorial 2^3 com seis pontos axiais e três repetições do ponto central.

Efeitos	Coefficiente	Erro Padrão	t valor	p valor	-95% Confiança	+95% Confiança
Média	0,002470	0,000318	7,77510	0,000109	0,001719	0,003221
x_1	-0,019101	0,003073	-6,21627	0,000438	-0,026367	-0,011835
x_1^2	0,078900	0,011555	6,82796	0,000247	0,051576	0,106224
x_2	-0,001105	0,000307	-3,59697	0,008775	-0,001832	-0,000379
x_2^2	0,000029	0,000116	0,25298	0,807555	-0,000244	0,000302
x_3	-0,000019	0,000004	-4,52920	0,002702	-0,000028	-0,000009
x_3^2	0,000000	0,000000	4,05907	0,004815	0,000000	0,000000
$x_1 x_2$	0,006936	0,001370	5,06137	0,001461	0,003696	0,010177
$x_1 x_3$	0,000005	0,000018	0,27919	0,788166	-0,000038	0,000048
$x_2 x_3$	0,000006	0,000002	3,04758	0,018647	0,000001	0,000010

Tabela 7. Análise de regressão para o fator resposta atividade enzimática (y_1) obtido a partir dos tecidos de caule aos 90 dias de cultivo quando em planejamento fatorial 2^3 com seis pontos axiais e três repetições do ponto central.

Efeitos	Coefficiente	Erro Padrão	t valor	p valor	-95% Confiança	+95% Confiança
Média	-0,008697	0,000865	-10,0501	0,000021	-0,010744	-0,006651
x_1	0,093939	0,008372	11,2208	0,000010	0,074143	0,113735
x_1^2	-0,418144	0,031483	-13,2815	0,000003	-0,492590	-0,343699
x_2	0,015365	0,000837	18,3535	0,000000	0,013386	0,017345
x_2^2	-0,005800	0,000315	-18,4222	0,000000	-0,006544	-0,005055
x_3	0,000132	0,000011	11,7728	0,000007	0,000105	0,000158
x_3^2	-0,000000	0,000000	-7,6976	0,000116	-0,000001	-0,000000
$x_1 x_2$	0,005653	0,003734	1,5139	0,173827	-0,003177	0,014482
$x_1 x_3$	-0,000246	0,000050	-4,9438	0,001668	-0,000364	-0,000128
$x_2 x_3$	-0,000037	0,000005	-7,4030	0,000149	-0,000049	-0,000025

Tabela 8. Análise de regressão para o fator resposta atividade específica (y_2) obtido a partir dos tecidos de caule aos 90 dias de cultivo quando em planejamento fatorial 2^3 com seis pontos axiais e três repetições do ponto central.

Efeitos	Coefficiente	Erro Padrão	t valor	p valor	-95% Confiança	+95% Confiança
Média	-0,005021	0,000615	-8,1694	0,000080	-0,006475	-0,003568
x_1	0,059624	0,005946	10,0275	0,000021	0,045564	0,073684
x_1^2	-0,292363	0,022361	-13,0749	0,000004	-0,345238	-0,239489
x_2	0,005782	0,000595	9,7248	0,000026	0,004376	0,007188
x_2^2	-0,002663	0,000224	-11,9099	0,000007	-0,003192	-0,002134
x_3	0,000071	0,000008	8,9601	0,000044	0,000052	0,000090
x_3^2	-0,000000	0,000000	-9,8149	0,000024	-0,000000	-0,000000
$x_1 x_2$	0,003294	0,002652	1,2422	0,254168	-0,002977	0,009565
$x_1 x_3$	-0,000061	0,000035	-1,7218	0,128773	-0,000145	0,000023
$x_2 x_3$	-0,000006	0,000004	-1,7185	0,129402	-0,000014	0,000002

ANEXOS V e VI

Tabela 9. Análise de regressão para o fator resposta atividade enzimática (y_1) obtido a partir dos tecidos de folha aos 30 dias de subcultivo quando em planejamento fatorial 2^3 com seis pontos axiais e três repetições do ponto central.

Efeitos	Coefficiente	Erro Padrão	t valor	p valor	-95% Confiança	+95% Confiança
Média	0,009733	0,002188	4,44847	0,002977	0,004559	0,014906
x_1	0,020460	0,021166	0,96667	0,365909	-0,029589	0,070510
x_1^2	-0,189578	0,079596	-2,38176	0,048756	-0,377792	-0,001364
x_2	-0,006306	0,002117	-2,97943	0,020532	-0,011311	-0,001301
x_2^2	0,000586	0,000796	0,73635	0,485459	-0,001296	0,002468
x_3	-0,000025	0,000028	-0,87925	0,408434	-0,000092	0,000042
x_3^2	-0,000000	0,000000	-2,47642	0,042432	-0,000001	-0,000000
$x_1 x_2$	-0,002271	0,009440	-0,24062	0,816744	-0,024593	0,020050
$x_1 x_3$	0,000231	0,000126	1,83183	0,109651	-0,000067	0,000529
$x_2 x_3$	0,000045	0,000013	3,53857	0,009488	0,000015	0,000074

Tabela 10. Análise de regressão para o fator resposta atividade específica (y_2) obtido a partir dos tecidos de folha aos 30 dias de subcultivo quando em planejamento fatorial 2^3 com seis pontos axiais e três repetições do ponto central.

Efeitos	Coefficiente	Erro Padrão	t valor	p valor	-95% Confiança	+95% Confiança
Média	-0,001494	0,000425	-3,5153	0,009789	-0,002499	-0,000489
x_1	0,033211	0,004112	8,0773	0,000086	0,023489	0,042934
x_1^2	-0,183357	0,015462	-11,8583	0,000007	-0,219920	-0,146795
x_2	0,001913	0,000411	4,6521	0,002336	0,000941	0,002885
x_2^2	-0,001287	0,000155	-8,3229	0,000071	-0,001653	-0,000921
x_3	0,000037	0,000005	6,7843	0,000257	0,000024	0,000050
x_3^2	-0,000000	0,000000	-11,5381	0,000008	-0,000000	-0,000000
$x_1 x_2$	-0,000015	0,001834	-0,0080	0,993845	-0,004351	0,004322
$x_1 x_3$	0,000047	0,000024	1,9264	0,095421	-0,000011	0,000105
$x_2 x_3$	0,000005	0,000002	1,9262	0,095455	-0,000001	0,000010

ANEXOS VII e VIII

Tabela 11. Análise de regressão para o fator resposta atividade enzimática (y_1) obtido a partir dos tecidos de caule aos 30 dias de subcultivo quando em planejamento fatorial 2^3 com seis pontos axiais e três repetições do ponto central.

Efeitos	Coefficiente	Erro Padrão	t valor	p valor	-95% Confiança	+95% Confiança
Média	-0,01936	0,007097	-2,72810	0,029419	-0,03615	-0,002580
x_1	0,31294	0,068660	4,55776	0,002612	0,15058	0,475293
x_1^2	-1,56530	0,258202	-6,06231	0,000510	-2,17586	-0,954752
x_2	0,02642	0,006866	3,84750	0,006313	0,01018	0,042653
x_2^2	-0,01291	0,002582	-5,00109	0,001563	-0,01902	-0,006807
x_3	0,00035	0,000092	3,81200	0,006611	0,00013	0,000566
x_3^2	-0,00000	0,000000	-6,03854	0,000522	-0,00000	-0,000002
$x_1 x_2$	-0,00994	0,030622	-0,32446	0,755070	-0,08235	0,062474
$x_1 x_3$	0,00015	0,000409	0,36483	0,726013	-0,00082	0,001115
$x_2 x_3$	0,00001	0,000041	0,32886	0,751879	-0,00008	0,000110

Tabela 12. Análise de regressão para o fator resposta atividade específica (y_2) obtido a partir dos tecidos de caule aos 30 dias de subcultivo quando em planejamento fatorial 2^3 com seis pontos axiais e três repetições do ponto central.

Efeitos	Coefficiente	Erro Padrão	t valor	p valor	-95% Confiança	+95% Confiança
Média	-0,007877	0,002085	-3,77834	0,006907	-0,012807	-0,002947
x_1	0,116949	0,020169	5,79856	0,000665	0,069258	0,164641
x_1^2	-0,556033	0,075846	-7,33108	0,000158	-0,735380	-0,376685
x_2	0,010046	0,002017	4,98109	0,001599	0,005277	0,014815
x_2^2	-0,004937	0,000758	-6,50969	0,000331	-0,006731	-0,003144
x_3	0,000099	0,000027	3,69160	0,007740	0,000036	0,000163
x_3^2	-0,000001	0,000000	-5,61802	0,000801	-0,000001	-0,000000
$x_1 x_2$	-0,004152	0,008995	-0,46160	0,658368	-0,025422	0,017118
$x_1 x_3$	-0,000012	0,000120	-0,10159	0,921934	-0,000296	0,000272
$x_2 x_3$	0,000004	0,000012	0,32679	0,753382	-0,000024	0,000032

