

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA**

**ROSA GOMES RISPOLI**

**EFEITO DE N-ACETILCISTEÍNA NA DESINFESTAÇÃO DE  
*EUGENIA UNIFLORA L.***

**São Gabriel**

**2014**

**ROSA GOMES RISPOLI**

**EFEITO DE N-ACETILCISTEÍNA NA DESINFESTAÇÃO DE  
*EUGENIA UNIFLORA* L.**

Monografia apresentada à Comissão de Trabalho de Conclusão do Curso de Biotecnologia na Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA, Campus São Gabriel, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Valdir Marcos Stefenon

Co-orientador: Paulo Roberto Diniz da Silva

**São Gabriel**

**2014**

**ROSA GOMES RISPOLI**

**EFEITO DE N-ACETILCISTEÍNA NA DESINFESTAÇÃO DE  
*EUGENIA UNIFLORA* L.**

Monografia apresentada à Comissão de Trabalho de Conclusão do Curso de Biotecnologia na Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA, Campus São Gabriel, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Monografia defendida e aprovada em: 21 de março de 2014

Banca examinadora:

---

Prof. Dr. Valdir Marcos Stefenon  
Orientador  
UNIPAMPA

---

Biólogo Paulo Roberto Diniz da Silva  
Co-orientador  
UNIPAMPA

---

Prof.Ms. Michele Heberle Lisboa  
UNIPAMPA

---

Biólogo Rafael Plá Matielo Lemos  
UNIPAMPA

Dedico este trabalho aos meus pais,  
Sergio Farias Rispoli e Vania Marinei  
Gomes Rispoli pela capacidade de  
acreditar e investir em mim.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao orientador Prof. Dr. Valdir Marcos Stefenon pela atenção e conhecimento transmitido.

Ao meu pai Sergio, por me dar suporte em toda a minha graduação, muito obrigada pelo estímulo e apoio nessa caminhada.

À minha mãe Vania, pelas palavras de carinho nas horas mais difíceis, me incentivando sempre a seguir em frente.

Aos meus irmãos, que fazem parte desta conquista, pelo carinho e momentos de distração.

Ao meu namorado Vitor, pelo apoio incondicional e por sempre acreditar em mim.

Aos colegas que nesses anos fizeram parte da minha vida, obrigada pelos momentos de convivência e pela amizade, especialmente ao Paulo Diniz pelos ensinamentos, atenção e dedicação na orientação desse trabalho.

## RESUMO

A pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) é uma importante espécie frutífera pertencente à família Myrtaceae apresentando potencial ornamental e fitoterápico. Uma das dificuldades na micropropagação desta espécie é a obtenção de tecidos livres de contaminação. Visando aperfeiçoar sua multiplicação *in vitro* conduziu-se um experimento para verificar o efeito de N-acetilcisteína na desinfestação de gemas de *Eugenia uniflora* L. Os estudos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais – UNIPAMPA, onde desenvolveu-se dois tratamentos, A (sem N-acetilcisteína) e B (com N-acetilcisteína). A desinfestação foi realizada em capela de fluxo laminar horizontal. No tratamento A as gemas foram mergulhadas em etanol 70% durante 1 minuto, seguido de imersão em solução de hipoclorito de sódio a 1,25% de cloro ativo durante 20 minutos com três enxágues em água destilada autoclavada e posteriormente mergulhadas em cloranfenicol durante 2 horas. No tratamento B as gemas foram mergulhadas em N-acetilcisteína 3% durante 6 horas, etanol 70% durante 1 minuto, seguido de imersão em solução de hipoclorito de sódio a 1,25% de cloro ativo durante 20 minutos com três enxágues em água destilada autoclavada e posteriormente mergulhadas em cloranfenicol durante 2 horas. Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo meio de cultura MS, com ágar e sacarose e 0,1 mg de AIB e de 0,2 mg de BAP. Após o 9º dia de cultivo avaliou-se a contaminação bacteriana e fúngica. Na desinfestação das gemas, a taxa observada de contaminação bacteriana foi de 17,30% no tratamento A e de 40,38% no tratamento B. A taxa de contaminação fúngica no tratamento A foi de 42,31% e no tratamento B foi de 57,69%. Após o 16º dia de inoculação foram observadas as taxas de sobrevivência, de 13,46% no tratamento A e de 7,69% no tratamento B.

**Palavras-chave:** Pitangueira, agente mucolítico, desinfestação

## ABSTRACT

The Surinam cherry (*Eugenia uniflora* L.) is an important fruit species belonging to the Myrtaceae featuring herbal and ornamental potential. One of the difficulties in the micropropagation of this kind is to obtain tissues free of contamination. In order to improve their multiplication in vitro experiment was conducted to verify the effect of N - acetylcysteine on disinfestation of *Eugenia uniflora* L. yolks Studies were conducted at the Laboratory of Plant Tissue Culture - UNIPAMPA, which developed two treatments, A (no N-acetylcysteine ) and B ( N-acetylcysteine ). The pest was held in the chapel of horizontal laminar flow. In treatment A yolks were dipped in 70% ethanol for 1 minute followed by immersion in a solution of sodium hypochlorite 1,25 % of active chlorine for 20 minutes with three rinses in autoclaved distilled water and then dipped in chloramphenicol for 2 hours. In treatment B gems were immersed in 3 % N - acetylcysteine for 6 hours , 70% ethanol for 1 minute followed by immersion in a solution of sodium hypochlorite 1,25 % of active chlorine for 20 minutes with three rinses in distilled water autoclaved and then dipped in chloramphenicol for 2 hours. The explants were cultured in test tubes containing MS medium with agar and sucrose and AIB 0,1 mg and 0.2 mg BAP. After the 9th day of culture was evaluated bacterial and fungal contamination. In the decontamination of the buds, the observed rate of bacterial contamination was 17,30% in treatment A and treatment B 40,38 % rate in treating fungal contamination was 42,31 % A and treatment B was 57,69%. After the 16th day of inoculation survival rates were observed in 13,46% in treatment A and 7,69% in treatment B.

**Keywords:** Pitangueira, mucolytic agent, disinfestation

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Exemplar de <i>Eugenia uniflora</i> L .....	11
Figura 2 - Fruto da pitangueira.....	12
Figura 3 – Explantes não contaminados após 60 dias do tratamento A (sem NAC).....	20



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Verificação de contaminação bacteriana dos explantes de *Eugenia uniflora* após nove (09) dias de inoculação nos tratamentos A (sem NAC) e B (com NAC).....19

Tabela 2 - Verificação de contaminação fúngica dos explantes de *Eugenia uniflora* após nove (09) dias de inoculação nos tratamentos A (sem NAC) e B (com NAC).....19

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>10</b>
<b>1.1 <i>Eugenia uniflora</i> L.....</b>	<b>10</b>
<b>1.2 Micropropagação.....</b>	<b>12</b>
<b>1.3 Meio de Cultura.....</b>	<b>15</b>
<b>2 OBJETIVO.....</b>	<b>16</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>16</b>
<b>3.1 Obtenção do material vegetal.....</b>	<b>16</b>
<b>3.2 Desinfestação .....</b>	<b>17</b>
<b>3.3 Meio de estabelecimento da cultura in vitro.....</b>	<b>17</b>
<b>3.4 Avaliação.....</b>	<b>18</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>21</b>
<b>6 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>22</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 *Eugenia uniflora* L.

A família Myrtaceae compreende aproximadamente 100 gêneros e 3.500 espécies, distribuídas principalmente nas regiões tropicais e subtropicais e poucas espécies ocorrem em regiões temperadas (BARROSO, 1984). Aproximadamente um terço dessas espécies pertence ao gênero *Eugenia*, que apresenta ampla distribuição, com cerca de 1000 espécies (McVAUGH, 1968; JOHSON & BRIGGS, 1984). O gênero *Eugenia* está inserido na subfamília Myrtoideae, o qual inclui todos os gêneros de Myrtaceae que apresentam frutos carnosos (LUGHADHA & PROENÇA, 1996).

A pitangueira é uma mirtácea frutífera com grande potencial para exploração econômica, principalmente em nichos de mercado ávidos por novidades. A *E. uniflora* L. tem origem na região que se estende desde o Brasil Central até o norte da Argentina, estando distribuída por quase todo o território brasileiro, e em outras partes do mundo (BEZERRA et al., 2000; DONADIO et al., 2002).

Nas Regiões Sul e Sudeste do Brasil a floração e a frutificação podem ocorrer duas ou até mais vezes durante o mesmo ano (DEMATTE, 1997). Nessas regiões, a floração ocorre, normalmente, de agosto a dezembro, podendo ocorrer, novamente, de fevereiro a julho. Já a frutificação comumente acontece entre agosto e fevereiro, podendo também ocorrer entre abril e julho.

Apesar de se adaptar ao cultivo em regiões de climas temperado e subtropical e em diferentes altitudes, o crescimento e desenvolvimento da pitangueira são ideais em regiões de clima tropical quente e úmido. Tolerante a diferentes níveis de geada, ventos fortes e temperaturas abaixo de 0°C, sem desenvolver sintomas característicos de danos. Apresenta-se tolerante à seca quando cultivada sob condições de déficit hídrico, no entanto a frutificação é prejudicada, culminando com a queda de frutos. Desenvolve-se bem em condições semiáridas, desde que haja condições mínimas de umidade no solo. (LIRA et al., 2007).

Figura 1 – Exemplar de *Eugenia uniflora* L.



Fonte: Site Cultura Mix

O valor comercial da pitanga resulta do seu elevado rendimento de polpa, valor nutritivo, sabor e aroma exóticos, atraindo, principalmente, os consumidores exigentes por produtos naturais e saudáveis (FERREIRA et al., 1987; BEZERRA et al., 2000; DONADIO, 2002).

Além da possibilidade de exploração para consumo in natura, os frutos da pitangueira podem ser utilizados pela agroindústria para sucos, sorvetes, bebidas lácteas, geleias, doces, licores e outros produtos.

Esta espécie, bem como outras fruteiras nativas, também vem despertando a atenção da indústria farmacêutica, pois as frutas são ricas em vitaminas e em substâncias antioxidantes, como o licopeno, que é considerado um dos antioxidantes mais potentes e tem sido associado com a diminuição do risco de doenças crônicas, tais como doenças cardiovasculares e câncer, especialmente o de próstata e o de mama (PELLISSARI et al., 2008). Óleos essenciais podem ser extraídos das folhas e de outras partes da planta (MARIN et al., 2004) que também apresenta elevadas concentrações de compostos fenólicos, os quais podem estar relacionados com o retardamento do envelhecimento celular e com a prevenção de algumas doenças (WANG et al., 1996; VELIOGLU et al., 1998). As folhas e frutos verdes apresentam um grande potencial medicinal para produção de fármacos, devido às presenças de polifênóis como as eugeniflorinas D1 e D2, que possuem

ação antimicrobiana (AURICCHIO et al., 2007; FIUZA et al., 2009; CARVALHO et al., 2012) a Pentahidroxiindolizidina, com propriedade antidiabética (SHAPOVAL et al., 1994) e a Oenotheina B, que inibe a proliferação *in vitro* dos vírus Herpes HSV-1 e HSV-2 (LEE et al., 2000). Possui também atividade antitumoral para o sarcoma em ratos (WANG et al., 1999) e potencial anti-leishmania (RODRIGUES et al., 2012).

Figura 2 – Fruto da pitangueira



Fonte: Site Viveiro Nativo

## 1.2 Micropropagação

O cultivo *in vitro* é um método viável para a propagação de diversas espécies frutíferas, podendo ser utilizado com as espécies nativas e exóticas, proporcionando a formação de pomares com populações de plantas homogêneas além de acelerar os métodos de propagação convencional (SOUZA et al., 2007).

Entre as diversas formas de propagação de plantas frutíferas, existe uma que utiliza pequenas partes ou células isoladas das mesmas, cultivando-as de forma controlada, ou seja, fornecendo a esses tecidos ou células, os elementos responsáveis pelo controle do crescimento e desenvolvimento vegetal (FACHINELLO et al., 2005).

O desenvolvimento de uma planta depende da interação de fatores internos, como as substâncias orgânicas, os hormônios, que desempenham importante

função na regulação do crescimento, e externos como a luz, a temperatura e o fotoperíodo (FACHINELLO et al., 2005).

Na cultura de tecidos vegetais, as correlações existentes entre os diversos órgãos de uma planta intacta são rompidas, sendo necessário o fornecimento dos fatores que regula o crescimento e o desenvolvimento (FACHINELLO et al., 2005).

A micropropagação baseia-se no fenômeno da totipotência das células vegetais, ou seja, cada célula possui a capacidade de gerar uma nova planta, permitindo a manutenção plena das características da planta-mãe, de modo uniforme, rápido crescimento e matéria-prima homogênea, uma vez que é possível obter várias cópias geneticamente idênticas de um mesmo indivíduo, livre de contaminações (GAMBORG & SHYLUCK, 1981; CALDAS et al., 1990).

Na micropropagação é feito o cultivo de plantas ou partes de plantas, também chamados explantes, em meio de cultura e ambiente asséptico, onde se controlam a temperatura, o fotoperíodo, a umidade em local apropriado chamado de sala de crescimento (FACHINELLO et al., 2005).

Para o estabelecimento dos cultivos *in vitro*, a escolha do explante apropriado constitui o primeiro passo. O explante é qualquer segmento de tecido oriundo de uma planta, para iniciar um cultivo *in vitro*, podendo ser gema axilar ou segmento nodal, ápice caulinar ou radicular, sendo que esses contêm o meristema ou tecidos diferenciados, como as folhas ou pedaços de uma folha, entrenó, etc (FACHINELLO et al., 2005).

O estabelecimento *in vitro*, especialmente no caso de espécies lenhosas, como a maioria das frutíferas, apresenta dois problemas principais: a contaminação e a oxidação (FACHINELLO et al., 2005).

Uma das dificuldades da micropropagação está na fase do estabelecimento *in vitro* de espécies lenhosas, devido às contaminações endógenas das espécies vegetais. Entretanto os fungos e bactérias podem ser endossimbióticos, podem disputar pelos nutrientes do meio de cultura com explantes, diminuindo o seu crescimento (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Mesmo que plantas apresentem competência para totipotência (KERBAUY, 1999). Deste modo, existe a necessidade de utilização de fungicidas e antibióticos para desinfestação. Contudo, muitos

microrganismos endógenos não são expostos aos produtos desinfestantes (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998; ESPOSITO-POLESI, 2011), e devem ser controlados nas plantas matrizes (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Contudo, o fungicida pode ter efeito como regulador de crescimento para algumas espécies como o Benomyl (FREITAS et al., 2011). Assim, o uso deste pode comprometer os resultados da micropropagação de algumas espécies vegetais.

As mirtáceas são intensamente colonizadas por microorganismos como as bactérias e os fungos micorrízicos arbusculares, como os gêneros *Glomus* e *Acaulospora* para *E. uniflora* L. (LOPES, 2009). Essas bactérias podem ter sistemas de proteção do tipo biofilme como a bactéria *Xylella fastidiosa* (WAG & WOOD, 2011; NURANAKA et al., 2013). Essas são mais resistentes aos tratamentos de desinfestação do que demais plântulas da propagação natural (MARTINS et al., 2011). Facilitando a obtenção dos segmentos nodais e ápices caulinares, servindo de fontes de explantes para a micropropagação.

A substância (R)-2-acetamido-3-acido mercaptopropanóico é conhecida comercialmente como N-acetilcisteína (NAC), é um análogo da cisteína, uma das menores moléculas de fármacos utilizados na medicina. Além do baixo custo, NAC não causa qualquer dano ambiental conhecido. O NAC diminui a formação do biofilme de uma variedade de bactérias e reduz a produção de uma matriz de polissacarídeo extracelular, promovendo a ruptura de biofilmes maduros (ZHAO & LIU, 2010).

N-acetilcisteína é considerada uma droga com propriedades antibacterianas e tem características que inibem o crescimento de bactérias gram-positivas e gram-negativas, incluindo *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* (PARRY & NEU, 1977). No entanto, seu efeito nunca foi testado em bactérias planta-patógeno.

Na desinfestação dos explantes, são utilizadas várias substâncias com ação germicida. A mais comum é o etanol, geralmente utilizado a 70% e os compostos à base de cloro como o hipoclorito de sódio nas concentrações de 0,5% a 2% de cloro ativo. A ação germicida das soluções de hipoclorito é devida à sua alta capacidade oxidante, que destrói a atividade das proteínas celulares. (FACHINELLO et al. 2005).

Ainda, existe a ocorrência de oxidações em *E. uniflora* L. pela liberação de compostos fenólicos (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). A oxidação é a reação do oxigênio com íons metálicos (+) dos outros compostos do meio de cultivo. Os explantes ao serem inoculados no meio de cultura podem liberar exudatos que tornam o meio de cultivo escuro. Este tipo de escurecimento é consequência da liberação de fenóis dos ferimentos ocasionados no processo de extração dos explantes (SANTOS, 2001). A poliamina PVP possui também a capacidade de adsorver os compostos fenólicos evitando que estes oxidem e polimerizem. Esta substância é geralmente adicionada ao meio de cultura em concentrações que variam de 0,01- 4,0 %.

### 1.3 Meio de cultura

Meios de cultura são combinações de sais minerais (macro e micronutrientes), carboidratos, vitaminas e reguladores de crescimento. Podem ser semi-sólidos (adicionando-se ágar ou outro agente para geleificação) ou líquidos, de acordo com o protocolo para o sistema de cultivo.

Os meios nutritivos utilizados para as culturas fornecem as substâncias essenciais para o desenvolvimento dos tecidos e controlam, em grande parte, o padrão do desenvolvimento *in vitro* (TORRES, 1998). A constituição do meio é baseada nas exigências das plantas quanto aos nutrientes minerais, com algumas modificações para atender em necessidades específicas. O meio MS (MURASHIGE E SKOOG, 1962) foi uma das primeiras formulações melhoradas usadas em cultura de tecidos de plantas, apresentando altos níveis de nitrato, potássio e amônio.

Os meios nutritivos são formados por múltiplos componentes, sendo bastante variáveis em função da espécie vegetal e da origem do explante. É constituído de componentes essenciais e opcionais. Os essenciais compreendem a água, os sais inorgânicos, a fonte de carbono e energia, vitaminas e substâncias reguladoras de crescimento (TORRES, 1998).

A água é o componente em maior quantidade do meio de cultura. A qualidade da água é muito importante em cultura de tecidos vegetais. Pode ser uma fonte potencial de impurezas. Para melhor controle deve-se usar água destilada, bidestilada e deionizada (TORRES, 1998).



Hormônios são substâncias produzidas pelas plantas que em baixas concentrações regulam seus processos fisiológicos. Usualmente eles se movem na planta de um sítio de produção para um sítio de ação (CECILIO FILHO et al., 1993). Já reguladores de crescimento são substâncias sintéticas, produzidas em laboratórios e não produzidas pelas plantas, mas que, quando aplicadas às plantas, produzem efeitos semelhantes aos hormônios vegetais (FERRI, 1979).

Algumas técnicas são utilizadas para tentar maximizar o porcentual de enraizamento de estacas, e entre as mais utilizadas destaca-se a aplicação exógena de hormônios sintéticos de crescimento da planta. O ácido indolbutírico (AIB) é um dos mais empregados e mais eficientes (DUNN et al., 1996; TONIETTO et al., 1997; DUTRA et al., 1998), por ser fotoestável e ser imune à ação biológica (HOFFMANN et al., 1996; ONO & RODRIGUES, 1996). Das citocininas comercialmente disponíveis, o BAP (6-benzilaminopurina) é a que, em geral, apresenta melhores resultados in vitro para promover a multiplicação de diversas espécies, sendo utilizada em aproximadamente 60% dos meios de cultivo (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

O pH dos meios nutritivos em culturas de células vegetais é normalmente ajustado com HCl ou NaOH, depois de adicionar todos os componentes para um valor ligeiramente ácido, entre 5 e 6 (normalmente 5,8) (TORRES, 1998). Em meios gelificados com ágar, o pH deve ser ajustado em 5,7, pois em pH 5,0, ocorre a hidrólise de polissacarídeos, enquanto que em pH 6,0-6,2 verifica-se a precipitação de sais (GEORGE, 1996).

## **2 OBJETIVO**

Verificar o efeito de N-acetilcisteína (NAC) na desinfestação de gemas apicais de *E. uniflora* L.

## **3 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 Obtenção do material vegetal**

As coletas das gemas apicais foram realizadas durante a primavera e o verão dos anos 2013 e 2014, sempre no período da tarde. As gemas apicais foram

coletadas em pelo menos três indivíduos adultos de *E. uniflora* L. com drupas pretas, crescendo em condições naturais, no município de São Gabriel, RS. Foram coletadas 80 gemas e divididas em dois lotes e levadas ao Laboratório em uma caixa de isopor.

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, Centro Interdisciplinar de Pesquisas em Biotecnologia, UNIPAMPA.

### 3.2 Desinfestação

Cada lote de gemas foi mergulhado em solução de água destilada e detergente neutro 0,003% durante três horas e quatro enxágues de água destilada. A desinfestação foi realizada em capela de fluxo laminar horizontal.

Para o tratamento A, as gemas foram mergulhadas em etanol 70% durante 1 minuto, seguido de imersão em solução de hipoclorito de sódio a 1,25% de cloro ativo durante 20 minutos, com três enxágues em água destilada autoclavada e mergulhadas em solução de (D)-treo-1-(p-nitrofenil)-2-2-dicloroacetamido-1,3-propanodiol (cloranfenicol) 0,03% durante 2 horas.

Para o tratamento B as gemas foram mergulhadas N-acetilcisteína 0,1% durante 6 horas, seguido de imersão em etanol 70% durante 1 minuto, seguido de solução de hipoclorito de sódio a 1,25% de cloro ativo durante 20 minutos com três enxágues em água destilada autoclavada e mergulhadas em solução de cloranfenicol 0,03% durante 2 horas.

A partir das gemas foram selecionados explantes de 1,5 cm de comprimento. Os explantes dos dois tratamentos foram inoculados em tubos de ensaio (180 x 20 mm) e mantidos em câmara de germinação a 25° C com fotoperíodo de 12 horas.

### 3.3 Meio de estabelecimento da cultura *in vitro*

Os explantes foram inseridos em tubos de ensaio com 10 mL de meio de cultura MS. Este meio foi confeccionado com 2,2 g de sais do meio MS (Sigma

Aldrich), 6,00 g de ágar (Vetec), 30,0 g de sacarose (Vetec) e 970mL de água destilada com 0,1 mg de AIB e de 0,2 mg de BAP com cozimento em placa aquecedora, o pH foi ajustado em 5,8. Este foi distribuído em 10 mL por tubo de ensaio. Os tubos foram autoclavados durante 17 minutos sob temperatura de 121°C e pressão de 1,2 atm.

### 3.4 Avaliação

Após o 9º dia de inoculação, os dados foram avaliados visualmente quanto a contaminação bacteriana e fúngica.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na desinfestação das gemas, as taxas de contaminação bacteriana observadas no tratamento sem N-acetilcisteína e com N-acetilcisteína foram 17,30% e 40,38%, respectivamente, e uma diferença significativa do outro tratamento ( $\chi^2 = 0,373$ ), que foi evidenciado pelo aumento da contaminação bacteriana (Tabela 01).

A taxa de contaminação fúngica apresentou uma diferença significativa do outro tratamento ( $\chi^2 = 0,015$ ) para 9º dia de inoculação, com 42,31% no tratamento sem N-acetilcisteína e 57,69% no tratamento com N-acetilcisteína. (Tabela 2).

Após o 16º dia de inoculação foram observadas as taxas de sobrevivência, de 13,46% no tratamento sem N-acetilcisteína e de 7,69% no tratamento com N-acetilcisteína. As taxas de contaminação bacteriana no tratamento sem N-acetilcisteína de 3,85% e 1,92% no tratamento com N-acetilcisteína. A contaminação fúngica é de 96,15% no tratamento sem N-acetilcisteína e de 98,10% no tratamento com N-acetilcisteína.

Segundo Lopes (2009), as mirtáceas são intensamente colonizadas por bactérias e fungos micorrízicos arbusculares, entre esses como os gêneros *Glomus* e *Acaulospora* para *Eugenia uniflora*.

**Tabela 1.** Verificação de contaminação bacteriana dos explantes de *Eugenia uniflora* após nove (09) dias de inoculação nos tratamentos A (sem NAC) e B (com NAC).

<b>CONTAMINAÇÃO</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>Total</b>
Contaminação Bacteriana	09	21	30
Não contaminado	43	31	74
<b>Total</b>	<b>52</b>	<b>52</b>	<b>104</b>

n = 104,  $\chi^2 = 0,373$  e  $0,1 < p < 3,86$ .

**Tabela 2 -** Verificação de contaminação fúngica dos explantes de *Eugenia uniflora* após nove (09) dias de inoculação nos tratamentos A (sem NAC) e B (com NAC).

<b>CONTAMINAÇÃO</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>Total</b>
Contaminação Fúngica	33	30	63
Não contaminado	19	22	41
<b>Total</b>	<b>52</b>	<b>52</b>	<b>104</b>

n = 104,  $\chi^2 = 0,015$  e  $0,1 < p < 3,86$ .

Esposito-Polesi (2011) argumentou à existência dos microrganismos endógenos em vegetais. Os autores Grattapaglia e Machado (1998) argumentaram existência desses, que não são expostos aos produtos, mesmo após a desinfestação. Os procedimentos devem acontecer, no pré-tratamento, nessas

plantas matrizes. De modo, esses fatos corroboram para entendimento dos resultados do trabalho.

A NAC atuou na formação das pontes de sulfeto entre as proteínas responsáveis pelas interações das células bacterianas e superfícies do xilema. Fato observado pela liberação de mais bactérias para meio de cultura devido degradação do biofilme, conforme descrito no “Modelo hipotético de ação de NAC na redução do biofilme de *Xylella fastidiosa*”. Deste modo, Muranaka et al. (2012) conseguiram a diminuição do biofilme após tratamentos com 7mM de cobre e 800 µg/mL de tetraciclina e neste trabalho, foi observado que a concentração de 100 µL/100mL N-acetilcisteína (NAC) agiu sobre a formação do biofilme após 6 horas de imersão das gemas.

Inicialmente, a ação da solução de cloranfenicol sobre as bactérias foi lenta no meio de cultura para os primeiros dias de inoculação. Assim, se evidenciou um sistema toxina-antitoxina na formação do biofilme e de células persistentes contribuindo Wang e Wood (2011).

Por ser poderosa substância antioxidante, a NAC evitou a formação de polifênóis no meio de cultura durante o experimento. (Figura 3)

Após 16º dia de inoculação, apresentou baixo nível de contaminação bacteriana e houve domínio da contaminação fúngica causada pelo microrganismo endossimbiótico.

Figura 3 – Explantos não contaminados após 60 dias do tratamento A (sem NAC)



## 5 CONCLUSÃO

O estudo da utilização da N-acetilcisteína mostrou-se promissor, devido que é uma substância antioxidante, não apresenta uma ação antibiótica, porém facilita a ação de alguns desses. A NAC pode ser utilizada nas horas antecedentes ao pré-tratamento de *Eugenia uniflora* L. Deste modo, estes fatos sugerem para esta espécie vegetal utilização de um fungicida.

## 6 REFERÊNCIAS

- AURICCHIO, M. T.; BUGNO, A.; BARROS, S. B. M. & BACCHI, E. M. **Atividades de antimicrobiana e antioxidante e toxicidade de *Eugenia uniflora***. Lat. Am. J. Pharm. 26 (1): 76-81, 2007.
- BARROSO, G.M.; PERON, M. V. Myrtaceae. In: LIMA, M.P.M.; GUEDES-BRUNI, R.R. (orgs.). **Aspectos florísticos das espécies vasculares**. Nova Friburgo: Reserva Ecológica de Macaé de Cima, RJ, 1994. v.1, p.261-302.
- BEZERRA, J. E. F.; SILVA JUNIOR, J. F.da; LEDERMAN, I. E. **Pitanga (*Eugenia uniflora* L.)**. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 30p. (Série Frutas Nativas, 1).
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. **Meios nutritivos**. In: Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Brasília: ABCTP : EMBRAPA.CNPH, 1990. p.37-70.
- CARVALHO, J. V.; DA SILVA, L. R. A.& CARDOSO, M. A. G. **Elaboração de gel dental contendo óleo essencial de pitanga com propriedade antimicrobiana e antiseptica**. XII Encontro latino Americano de Iniciação Científica e VIII Encontro Latino Americano de Pós-graduação. Universidade do Vale do Paraíba. 2012.
- CECILIO FILHO, A.B., SOUZA, J.C.; ALVARENGA, A.A. **Enraizamento de estacas**. ESAL, Lavras, 1993. 28 p.
- DONADIO, L. C., MÔRO, F. V.; SERVIDONE, A. A. **Frutas brasileiras**. Jaboticabal: Ed. Novos Talentos, 2002. 288p.

DEMATTE, M.E.R.P. **Ornamental use of Brazilian Myrtaceae**.ActaHorticulturae. n. 452, p.143-179, 1997.

DUNN, D. E.; COLE, J. C.; SMITH, M. W. **Position of cut, bud retention and auxins influence rooting of *Pistaciachinensis***.ScientiaHorticulturae, Amsterdam, v. 67, n. 1/2, p. 105-110, Nov. 1996.

DUTRA, L. F.; TONIETTO, A.; KERSTEN, E. **Efeito da aplicação de ethefon em ameixeira (*Prunussalicina*Lindl) e do AIB no enraizamento de suas estacas**.ScientiaAgricola, Piracicaba, v. 55, n. 2, p. 296-304, maio/ago. 1998.

ESPOSITO-POLESI, N. P. **Microrganismos endofíticos e a cultura de tecidos vegetais: quebrando paradigmas**. Revista Brasileira de Biociências. Porto Alegre, v.9, n.4, p.533-541, out/dez 2011.

FERREIRA, B. G. A.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; CARPANEZZI, A. A.; TAVARES, F. R.; BOEGER, M. R. T.; KOEHLER, H. S. **Enraizamento de *Sapiumglandulatum* (Vell.) Pax. pela aplicação de ácido indolbutírico e ácido bórico**. Leandra, Rio de Janeiro, n.16, p.11-16, 2001.

FERRI, M.G. **Fisiologia vegetal**. EPU/USP, v. 2, São Paulo, 1979. 392 p.

FIÚZA, T.S.; SABOIA-MORAIS, S. M. T.; PAULA, J. R.; TRESVENZOL, L. M. F.; PIMENTA, F. C. . **Evaluation of antimicrobial activity of the crude ethanol extract of *Eugenia uniflora* L. leaves** .Rev. Cienc. Farm. Básic. Apl. v.29, n.3, p.245-250, 2009.



FREITAS, D. P.; CONTIM, L. A. S.; DIAS, D. P.; FERREIRA, W. C.; SANTOS, R. C. **Estabelecimento in vitro de Pau-Rosa (*Anibarosae odora*Ducke): Efeito do Benomyl como regulador de crescimento.** Enciclopédia Biosfera. Centro Científico Conhecer. Goiânia, v.7, n.13, p. 491-493, 2011.

GAMBORG, L.; SHYLUCK, J.P. **Nutrition, media and characteristics of plant cell and tissue cultures** In: THORPE, T.O. Plant tissue culture methods and applications in agriculture. New York: Academic Press, 1981. p.21-44.

GEORGE, E. F. 1996. **The derivation, preparation, and use of culture media.** In: Plant propagation by tissue culture. Exegetics, Edington. X, p. 344-419.

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

HOFFMANN, A.; CHALFUN, N. N. J.; ANTUNES, L. E. C.; RAMOS, J. D.; PASQUAL, M.; SILVA, C. R. de R. e. **Fruticultura comercial: propagação de plantas frutíferas.** Lavras: Ufla/Faepe, 1996. 319 p.

JOHNSON, L.A.S.; BRIGGS, B.G. **Myrtales and Myrtaceae phylogenetic analysis.** Annals of the Missouri Botanical Garden. St. Louis, p.700-756, 1984.

KERBAUY, G. B. **Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas.** In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. & BUSO, J. A. (Ed.). Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas. Brasília: EMBRAPA – Produção de Informação/Centro Brasileiro Argentino de Biotecnologia, 1999. v.2, p. 519-531.

LEE, M.H.; CHIOU, J.F.; YEN, K.Y. **EBV DNA polymerase inhibition of tannins from *Eugenia uniflora***.Cancerletters 154, 131-136, 2000.

LIRA, J. S. J; BEZERRA, J.E.F.; LEDERMAN, I. E.; SILVA, J. F. J.;**Pitangueira**. Recife : Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária-IPA, 87p, 2007.

LOPES, P. Z. **Propagação vegetativa e interação com endomicorrizas arbusculares em mirtáceas nativas do Sul do Brasil**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. 120 p. Março de 2009.

LUGHADHA, E.N.; PROENÇA, C.A **A survey of the reproductive biology of the *Myrtoideae (Myrtaceae)***.Annals of the Missouri Botanical Garden, St. Louis, v.83, n.4, p.480-503, 1996.

MARIN, R.; PIZZOLI, G.; LIMBERGER, R.; APEL, M.; ZUANAZZI, J. A. S.; HENRIQUES, A. T. **Propriedades nutracêuticas de algumas espécies frutíferas nativas do sul do Brasil**. In: RASEIRA, M. C. B.; ANTUNES, L. E. C.; TREVISAN, R.; GONÇALVES, E. D. Espécies frutíferas nativas do Sul do Brasil. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2004. p. 107-122. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 129).

McVAUGH, R. **The genera of American Myrtaceae**.Interim Report.Taxon, v. 17, n.8, p.354-418, 1968.

MURANAKA, L. S.; TAKITA, M. A.; OLIVATO, J. C.; KISHI, L. T. ; de SOUZA, A. A. **Global expression profile of biofilm resistance to antimicrobial compounds in the plant-pathogenic bacterium *Xylella fastidiosa* reveals evidence of persister cells**.Journal of Bacteriology, v.194, n.17, p.4561-4569, september 2012.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. **A revised medium of rapid growth and bioassay with tobacco cultures.** *Physiologia Plantarum*. Copenhagen, v.15, n.2, p.473-497, 1962.

ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D. **Aspectos da fisiologia do enraizamento de estacas caulinares.** Botucatu: Unesp/Funep, 1996. 83 p

PELLISSARI, F.M.; RONA, M.S.S.; MATIOLI G. **O licopeno na prevenção de doenças.** *ArqMudi*. 2008;12(1):5-11.

PARRY, M.F.; NEU, H.C. **Effect of N-acetylcysteine on antibiotic activity and bacterial growth in vitro.** *J Clin Microb*. 1977;5:58–61. [PubMed]

RODRIGUES, K. A. F.; AMORIM, L. V.; OLIVEIRA, J. M. G.; DIAS, C. N.; MORAES, D. F. C.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S.; CARNEIRO, S. M. P. & CARVALHO, F. A. A. ***Eugenia uniflora* L. essential oil as a anti-leishmania agent: Effect on *Leishmania amazonenses* and possible mechanisms of action.** Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.

SANTOS, R. B.; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O.; SANTANA, J. R. F.; **Problemas no cultivo in vitro: Cultura de tecidos.** Paiva e Paiva, UFLA, Lavras, M.G. 9:73-79, 2001.

SHAPOVAL, E. E.S. **Evolution of some pharmacological activities of *Eugenia uniflora* L.** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 44, n.3, p.137-142, 1994.

SOUZA, J.A.; SCHUCH, M.W.; SILVA, L.C.; FERRI, J.; SOARES, G.C.; **Solidificante no meio de cultura e tamanho do explante no estabelecimento da propagação in vitro de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.)**. Revista Brasileira Agrociências, Pelotas, v.13, n.1, p.115-118, 2007.

VELIOGLU, Y.S.; MAZZA, G.; GAO, L.; OOMAH, B.D. **Antioxidant activity and totalphenolics in selected fruits, vegetables, and grain products**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.46, p.4113-4117, 1998.

WANG, C. C.; CHEN, L. G. & YANG, L. L. **Antitumor activities of four macrocyclivellagitannins from *Cupheahyssopifolia***. Cancer letters 140, 195-200, 1999.

WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, R.L. Total antioxidant capacity of fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.44, p.701-705, 1996.

WANG, X. ; WOOD, T. K. **Toxin-antitoxin systems influence biofilm and persister cell formation and the general stress response**. Applied and Environmental Microbiology, v.77, n. 16, p.5577-5583, Aug. 2011.

ZHAO, T; LIU, Y. **N acetylcysteine inhibit biofilms produced by *Pseudomonas aeruginosa***. BMC Microbiol. 2010.

Cultura Mix. ***Eugenia uniflora*, tudo sobre a pitangueira**. Disponível em <<http://flores.culturamix.com/flores/naturais/eugenia-uniflora-tudo-sobre-a-pitangueira>> Acessado em 27/03/2014.

Viveiro Nativo. **Tipos de plantas.** Disponível em  
<<http://viveironativo.blogspot.com.br/p/tipos-de-plantas.html>> Acessado em  
27/03/2014.