

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
RODRIGO CORDEIRO DA SILVA

CULTURA *IN VITRO* DE CALOS E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS  
FENÓLICOS EM GABIROBEIRA (*Campomanesia xanthocarpa* O. Berg.)



Curitiba, 2016

RODRIGO CORDEIRO DA SILVA

CULTURA *IN VITRO* DE CALOS E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS  
FENÓLICOS EM GABIROBEIRA (*Campomanesia xanthocarpa* O. Berg.).

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção de Título de Mestre em Botânica, no Programa de Pós-Graduação em Botânica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marguerite Quoirin  
Co-orientadora: Dr.<sup>a</sup> Juliana Degenhardt-Goldbach

Curitiba, 2016

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas

Silva, Rodrigo Cordeiro da  
Cultura *in vitro* de calos e quantificação de compostos fenólicos em  
gabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa* O. Berg.). / Rodrigo Cordeiro da  
Silva. – Curitiba, 2016.  
48f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Marguerite Quoirin  
Co-orientadora: Juliana Degenhardt-Goldbach  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de  
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Botânica.

1. Quitosana. 2. Germinação. 3. Myrtaceae. I. Título II. Quoirin,  
Marguerite. III. Degenhardt-Goldbach, Juliana. IV. Universidade Federal do  
Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em  
Botânica.

CDD (20. ed.) 581



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Botânica



**Título: Mestre em Ciências Biológicas - Área de Botânica.**

**Dissertação: "CULTURA *IN VITRO* DE CALOS E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE GABIROBEIRA (*Campomanesia xanthocarpa* O.Berg.)".**

**Candidato:** Rodrigo Cordeiro da Silva

**Comissão Examinadora:**

Dr<sup>a</sup> Marguerite Germaine Ghislaine Quoirin (UFPR) – (Presidente/Orientador)  
Dr<sup>a</sup> Luciana Lopes Fortes Ribas (UFPR) – (Membro Titular)  
Dr<sup>a</sup> Cristiane Vieira Helm (Embrapa) – (Membro Titular)  
Dr. Luiz Antônio Biasi (UFPR) – (Suplente)

Parecer: A Comissão Examinadora, reunida nesta data, nas dependências do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, analisando o conteúdo, a forma, a apresentação e a defesa da Dissertação, **APROVA O TRABALHO DE CONCLUSÃO** do(a) aluno(a) RODRIGO CORDEIRO DA SILVA. É de parecer que constitui um trabalho científico e recomenda a sua publicação, após as correções sugeridas.

O candidato tem 60 (sessenta) dias para as correções propostas pela Comissão, para que se possa dar continuidade ao processo.

Curitiba, 20 de junho de 2016.

Dr<sup>a</sup> Marguerite Germaine Ghislaine Quoirin (UFPR)

Dr<sup>a</sup> Luciana Lopes Fortes Ribas (UFPR)

Dr<sup>a</sup> Cristiane Vieira Helm (Embrapa)

Ciente Candidato

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Profª Drª Marguerite Quoirin pelos anos de orientação, desde a iniciação científica e monografia até a conclusão dessa dissertação de mestrado.

Agradeço à Drª Juliana Degenhardt-Goldbach pela co-orientação, pelas ideias ao longo do mestrado e pelo apoio.

Agradeço aos membros da banca avaliadora, Profª Drª Luciana Lopes Fortes Ribas e especialmente à Drª Cristiane Helm, pelo apoio à pesquisa realizada na Embrapa florestas.

Agradeço ao Drº Fabricio Augusto Hansel e a doutoranda Tamires de Oliveira por todo apoio, colaboração e auxílio durante o trabalho desenvolvido na Embrapa florestas.

À Sheila Silveira por todo apoio, ajuda, auxílio, às conversas e desabafos, pela amizade nos momentos difíceis que passei nos últimos anos.

Aos amigos e colegas de trabalho Cassiana de Oliveira, Laudiane Zanella, Jéssica Tomasi, Franciele Koene, Hanah Ceres, Amanda Caldas, Isabelle Pansolin, Juliane Nesi, Thais e Emanuelle Lais.

Agradeço muito à Profª Drª Thelma Veiga Ludwig pelo apoio nos últimos meses do mestrado, o que me ajudou a continuar tentando.

Em especial a minha grande amiga Aniele Maraschi, que me trouxe um pouco de luz nos momentos sombrios.

Às minhas irmãs Thais e Lais, com quem sempre pude contar e que sempre estiveram ao meu lado.

Aos meus pais Valdir e Doroti, que me apoiaram e ajudaram.

À Capes pela bolsa de mestrado e a CNPQ pelo fomento à pesquisa.

À Embrapa Florestas, por permitir o uso das instalações para o desenvolvimento da presente pesquisa.

“Til your world burns and crashes  
Til you're at the end, the end of your rope  
Til you're standing in my shoes  
I don't wanna hear a thing from you, from you, from you  
Cause you don't know”

Lady Gaga

## RESUMO

*Campomanesia xanthocarpa*, conhecida como gabirobeira, é uma árvore frutífera, de grande importância ecológica. Popularmente as folhas e cascas são usadas no tratamento de diversas doenças, principalmente do sistema digestório. O objetivo do trabalho foi desenvolver um protocolo de cultura *in vitro* de calos de gabirobeira e estudar os compostos fenólicos presentes nesses calos. Primeiro realizou-se a germinação de sementes *in vitro* em meios de cultura WPM, WPM/2, ambos sem ou com sacarose (30 g.L<sup>-1</sup>). As culturas foram realizadas em condições de luz (30 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>) com fotoperíodo de 16h ou no escuro e temperatura de 25±2°C. As plântulas obtidas foram utilizadas como fonte de explante. Discos foliares de 5 mm foram inoculados em meio de cultura MS contendo ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) nas concentrações 5, 10 e 20. Foram obtidas quatro linhagens de calos com crescimento superior as demais linhagens. A linhagem com maior crescimento foi cultivada em meio de cultura MS acrescido de 500 mg.L<sup>-1</sup> de quitosana por 60 dias. O conteúdo fenólico da linhagem 01 com e sem o tratamento com quitosana também foi comparado com a linhagem com segundo maior crescimento. A germinação ocorreu em todos os meios, não havendo diferença estatística entre os tratamentos. Também não houve diferença estatística entre os tratamentos com 2,4-D na formação de calos. Os calos tratados com quitosana apresentaram um incremento de duas vezes no conteúdo de compostos fenólicos. Quando comparadas as duas linhagens sem quitosana, a de maior crescimento também apresentou a maior concentração de compostos fenólicos. Com esse estudo foi possível estabelecer uma cultura de calos *in vitro* permitindo a avaliação do conteúdo de compostos fenólicos, que foi incrementada na presença de quitosana no meio de cultura.

Palavras chave: Quitosana, 2,4-D, germinação *in vitro*, Myrtaceae.

## **IN VITRO CULTURE OF CALLUS AND QUANTIFICATION OF PHENOLIC COMPOUNDS FOR *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg.**

### **ABSTRACT**

*Campomanesia xanthocarpa*, known as gabirobeira, is a fruit tree with ecological importance. In the medicinal folk its leaves and bark are employed for treatment of many diseases, mainly gastric illness. The aim of this study was to develop a protocol of *in vitro* callus culture of gabirobeira and to study the phenolic compounds present in the calli. Seeds were germinated *in vitro* on WPM and WPM/2 media, supplemented or not with sucrose (30 g.L<sup>-1</sup>). The cultures were maintained under light (30 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>) with a 16 h photoperiod or in the dark, at 25±2 °C. The seedlings were used as explant source. Leaf discs with 5 mm diameter were introduced on MS culture media containing 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) at concentrations of 5, 10 and 20 μM. The four lines of calli with the greatest growth rate were selected. Among these the one with the greatest growth rate was cultured in MS medium supplemented or not with 500 mg.L<sup>-1</sup> chitosan by 60 days at least. The phenolic content of line 01 with or without chitosan, was also compared with the content of the line with the second greatest growth rate. The germination of seeds occurred in all treatments and conditions and no statistical difference was observed among them. The medium supplemented with 2,4-D in all concentrations showed callus formation without statistical difference among the concentrations. The calli treated with chitosan had the double of phenolic compound content. When compared the two lines with the greatest growth rate, both cultured in media without chitosan, it was found that the second line presented half the content of phenolic compounds of line 01. In this study it was possible to establish an *in vitro* callus culture that allows the evaluation of phenolic compound content, and to show that this content was increased in the presence of chitosan in the culture medium.

**Key words:** chitosan, 2,4-D, *in vitro* germination, Myrtaceae



## LISTA DE ABREVIATURAS

2,4-D – Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

ANA – Ácido naftalenoacético

BAP – Benzilaminopurina

Fe-EDTA – Ácido etilendiamino tetra-acético férrico

GA<sub>3</sub> – Ácido Giberélico

PPM – Plant Preservative Mixture

PVP – Polivinilpirrolidona

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – TAXA DE GERMINAÇÃO E ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) IN VITRO DE SEMENTES DE <i>Campomanesia xanthocarpa</i> COLETADAS EM 2013.....	29
Tabela 2 – TAXA DE GERMINAÇÃO E ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) IN VITRO DE SEMENTES DE <i>Campomanesia xanthocarpa</i> COLETADAS EM 2015.....	29
Tabela 3 – FORMAÇÃO DE CALOS E NECROSE EM DISCOS FOLIARES PROVENIENTES DE PLÂNTULAS DE <i>Campomanesia xanthocarpa</i> CULTIVADOS IN VITRO POR 60 DIAS EM MEIO MS CONTENDO 2,4-D, EM FUNÇÃO DA POSIÇÃO DO DISCO NO MEIO DE CULTURA.....	30

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	15
2.1 <i>Campomanesia xanthocarpa</i> .....	15
2.2 Metabólitos secundários .....	15
2.3 Metabólitos presentes em espécies de <i>Campomanesia</i> .....	16
2.4 A cultura de tecidos <i>in vitro</i> .....	18
2.5 Metabólitos secundários em culturas de tecidos <i>in vitro</i> .....	19
2.6 Elictores no cultivo <i>in vitro</i> de calos e células .....	21
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	22
3.1 Material vegetal .....	22
3.1.1 Sementes .....	22
3.1.2 Material do campo .....	22
3.2 Germinação de sementes .....	23
3.3 Cultura de discos foliares e indução de calos .....	24
3.3.1 A partir de plântulas germinadas <i>in vitro</i> .....	24
3.3.2 A partir de plantas do campo .....	25
3.3.2.1 Desinfestação .....	25
3.3.2.2 Estabelecimento <i>in vitro</i> .....	25
3.4 Elicitação .....	26
3.5 Condições de cultura .....	26
3.6 Análise estatística e delineamento experimental .....	27
3.7 Teste de Folin-Ciocalteu .....	27

<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>28</b>
<b>4.1 Germinação de sementes de <i>C. xanthocarpa</i> .....</b>	<b>28</b>
<b>4.2 Indução de calos em discos foliares de <i>C. xanthocarpa</i> cultivados <i>in vitro</i>.....</b>	<b>30</b>
<b>4.2.1 Discos foliares de plantas crescidas <i>in vitro</i>.....</b>	<b>30</b>
<b>4.2.2 Desinfestação de explantes foliares e Indução de calos a partir do material do campo .....</b>	<b>32</b>
<b>4.3 Compostos fenólicos totais.....</b>	<b>34</b>
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>34</b>
<b>5.1 Germinação de sementes de <i>Campomanesia xanthocarpa</i> ....</b>	<b>34</b>
<b>5.2 Indução de calos em discos foliares de <i>Campomanesia xanthocarpa</i>.....</b>	<b>35</b>
<b>5.2.1 Desinfestação e indução de calos a partir de discos foliares de plantas germinadas <i>in vitro</i>.....</b>	<b>35</b>
<b>5.2.2 Desinfestação e indução de calos a partir do material do campo.....</b>	<b>36</b>
<b>6. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES .....</b>	<b>38</b>
<b>7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>39</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As plantas possuem uma grande variedade de compostos provenientes do metabolismo secundário. Tais compostos não são essenciais para o desenvolvimento e crescimento da planta, mas possuem um papel nas relações ecológicas, como atração de polinizadores, resistência a parasitas e doenças e tolerância ao estresse ambiental. Os metabólitos secundários possuem uma ampla variedade estrutural, a qual é muitas vezes bastante complexa, com diversas rotas enzimáticas envolvidas na sua síntese (DATNOFF et al., 2001).

Devido às propriedades que os metabólitos secundários das plantas apresentam, eles têm sido usados pelo homem para diversas finalidades, desde a medicina popular ou natural, que utiliza extratos ou partes de plantas como remédios, como compostos aromatizantes e saborizantes, pigmentos e corantes, até fixadores e conservantes (VANISREE e TSAY, 2004).

As plantas com propriedades medicinais têm grande aceitação no mercado, devido principalmente ao uso histórico na medicina popular e pela busca de formas mais naturais de tratamento em relação aos medicamentos sintéticos (BENZIE e WACHTEL-GALOR, 2011). Atualmente, as ervas medicinais são utilizadas como medicamentos em muitos países, além de servir como fonte de novos fármacos, como fitoterápicos, ou ainda na forma de infusões e extratos brutos (VANISREE e TSAY, 2004).

Outra forma de aproveitamento, além dos extratos e infusões, é o uso das plantas como alimentos funcionais, que por definição são aqueles com altos níveis de compostos bioativos. Os frutos e outras partes de plantas com propriedades farmacológicas, podem fornecer quantidades significativas de compostos antioxidantes, anticancerígenos, antimutagênicos, além do valor nutricional em si (MALTA et al., 2012 e 2013). Muitas espécies utilizadas popularmente ou pela indústria não são cultivadas, sendo retiradas de forma extrativista de seus ambientes naturais (CECHINEL-FILHO E YUNES, 1998; DATNOFF et al., 2001; VANISREE e TSAY, 2004). Devido à falta de controle na exploração dos recursos vegetais, muitas espécies de plantas podem sofrer reduções nas populações locais, perda da variabilidade genética, destruição dos ecossistemas locais e até serem colocadas em risco de extinção (VANISREE e

TSAY, 2004). Essas perdas resultam também na diminuição da diversidade de substâncias que podem ser encontradas e exploradas.

*Campomanesia xanthocarpa* (O. Berg) pertence à família Myrtaceae e é conhecida popularmente como gabirola, gabirola, guavirova, entre outros nomes. É uma espécie nativa da América do Sul ocorrendo praticamente em todo o território brasileiro (LANDRUM, 1986). A planta produz frutos amarelados, às vezes esverdeados a alaranjados, com sabor adocicado e uma leve acidez, que são apreciados pela fauna e pelo homem nas áreas onde ocorrem (LORENZI, 2002).

Além do valor ecológico e do potencial para comércio dos frutos, a espécie apresenta propriedades farmacológicas, sendo usada popularmente no tratamento de diversos distúrbios do sistema digestório e no controle do peso, com algumas de suas propriedades comprovadas cientificamente (BIAVATTI et al., 2004; COUTINHO et al., 2008; KLAFEK et al., 2010; FERNANDES et al., 2015). Sua madeira apresenta textura suave e coloração clara, tornando-a atrativa para a fabricação de móveis, ferramentas, brinquedos e utensílios domésticos (LORENZI, 2002).

Apesar de ser apreciada pelo sabor característico dos frutos, não existem plantios comerciais da espécie e sua exploração se dá por extrativismo nas regiões onde ocorre (LORENZI, 2002). A atividade extrativista possui forte impacto ambiental, tanto na espécie como para a fauna local que dela depende.

Assim como para outras espécies frutíferas do Cerrado brasileiro, estudos estão sendo realizados para a identificação de propriedades medicinais da gabirola e de seus princípios ativos, bem como o uso dos frutos como alimentos funcionais, com propriedades antioxidantes, buscando mudanças positivas na qualidade de vida das pessoas (MALTA et al., 2012 e 2013).

Devido à sua importância ecológica, ao potencial comercial e por se tratar de uma espécie não domesticada, é necessário o desenvolvimento de métodos que permitam a exploração da espécie, sem que haja impacto ecológico. Uma forma de uso dos recursos vegetais disponíveis na nossa flora são as técnicas de cultivo *in vitro*. Essas técnicas permitem a propagação vegetativa para produção de mudas em larga escala por micropropagação e o melhoramento genético. Além disso, o cultivo de células e calos pode ser

utilizado para obtenção de biomassa e compostos do metabolismo com interesse comercial, permitindo a padronização e o controle de qualidade.

Muitas espécies possuem protocolos estabelecidos de micropropagação e cultura de células e tecidos, porém são plantas selecionadas pelo homem por muitos anos, sendo consideradas domesticadas (GEORGE *et al.*, 2008). As plantas cultivadas em geral têm genótipos já conhecidos e, devido à uniformidade clonal, possuem uma resposta semelhante dos explantes cultivados *in vitro* aos tratamentos aplicados, facilitando o desenvolvimento de protocolos de propagação (HARTMANN *et al.*, 2010). As plantas não domesticadas, como a gabirobeira, tendem a apresentar várias respostas dos tecidos quando esses são cultivados *in vitro* devido à variabilidade genética (HARTMANN *et al.* 2010). Por outro lado, essa diversidade genética é muito interessante por possibilitar a obtenção de produtos, como fármacos e corantes, com características diversas, dentro de uma mesma espécie (HARTMANN *et al.*, 2010).

Os objetivos gerais desse estudo foram o estabelecimento da germinação *in vitro* da espécie, o desenvolvimento de um protocolo de cultura de calos, a medição do teor de compostos fenólicos nos calos e o estudo da ação elicitora da quitosana.

Os objetivos específicos são:

- Avaliar o efeito de duas concentrações de sais do meio de cultura WPM, da sacarose e da luz na germinação de sementes *in vitro*;
- Avaliar o efeito do 2,4-D na formação de calos em discos foliares;
- Analisar o teor de compostos fenólicos produzidos pelos calos, comparando duas linhagens;
- Observar os efeitos da quitosana adicionada ao meio de cultura na síntese de compostos fenólicos nos calos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *Campomanesia xanthocarpa*

*Campomanesia xanthocarpa* O. Berg, pertencente à família Myrtaceae, possui ampla distribuição, ocorrendo na América do Sul desde a Argentina, até o Equador ao norte e o Brasil ao leste (LANDRUM, 1986; LORENZI, 2002). O gênero *Campomanesia* contém cerca de 60 espécies, sendo que a maioria delas são tratadas pelo mesmo nome popular em diversas regiões do país (LANDRUM, 1986). No Paraná foi descrita a ocorrência de 11 espécies de *Campomanesia*, entre elas *C. xanthocarpa* (LIMA *et al.*, 2011).

No Brasil, as espécies de *Campomanesia* ocorrem principalmente nas regiões de Cerrado, porém também nos diversos biomas (LANDRUM, 1986). O comportamento vegetativo vai de pequenos arbustos lenhosos, dos quais alguns apresentam uma porção subterrânea, até árvores com cerca de 15 m de altura (LANDRUM, 1986; LIMA *et al.*, 2011).

As folhas e a casca de *C. xanthocarpa*, bem como de outras espécies do gênero *Campomanesia*, são usadas popularmente no tratamento de diarreias, como antirreumático, para redução do colesterol sanguíneo e perda de peso, contra ulcerações, problemas estomacais e desordens hepáticas (BIAVATTI *et al.*, 2004; BONILLA *et al.*, 2005; MARKMAN *et al.*, 2004; CARDOSO *et al.*, 2010; MADALOSSO *et al.*, 2012).

### 2.2 Metabólitos secundários

Os compostos do metabolismo secundário são usados pelas plantas como defesa contra patógenos e proteção contra fatores abióticos do ambiente, e podem ser utilizados na indústria devido às suas propriedades químicas, desde medicamentos e cosméticos, até corantes, fixadores e conservantes (BOURGAUD *et al.*, 2001; HELDT e HELDT, 2005). Os metabólitos secundários podem ser classificados em compostos fenólicos, terpenos e compostos nitrogenados ou alcaloides, entre outros, baseado na estrutura química que apresentam (HELDT e HELDT, 2005).



Não só os grupos funcionais dos metabólitos secundários são importantes, como o arranjo e a disposição dos mesmos nas moléculas. A diversidade genética garante a diversidade de metabólitos nas plantas. A variação entre espécimes de uma mesma espécie garante que sempre haja organismos resistentes aos patógenos e às condições que a planta enfrenta durante o seu desenvolvimento (BOURGAUD *et al.*, 2001).

Os compostos produzidos pelas plantas para a defesa e resistência, em sua grande maioria, são constitutivos dos organismos, embora muitas substâncias possam ser produzidas após a planta sofrer algum ataque por patógenos ou quando há herbivoria da mesma ou em fases específicas do desenvolvimento, como durante a floração quando produz compostos para atrair polinizadores (WINK, 2003). Quando compostos são produzidos após o ataque, sua síntese é ativada pelo que é denominado elicitor. Os elicitores são proteínas, sacarídeos, ou qualquer outro composto do patógeno que é percebido por receptores da parede celular da planta, desencadeando sistemas de sinalização que ativam os genes responsáveis pela síntese dos compostos de defesa, denominados fitoalexinas (HELDT e HELDT, 2005).

Quanto à extração de compostos a partir de plantas, o maior problema está na concentração de metabólitos nos tecidos e células, que normalmente é muito baixa (DICOSMO e MISAWA, 1995). Outro problema é a síntese de compostos por tecidos e órgãos específicos, que torna ainda mais difícil extrair tais substâncias em quantidades suficientes para o uso comercial (DICOSMO e MISAWA, 1995).

### **2.3 Metabólitos presentes em espécies de *Campomanesia***

A diversidade de compostos produzidos pelo metabolismo secundário das espécies do gênero *Campomanesia* é ampla, desde fenóis, taninos, cumarinas, saponinas, flavonoides, até óleos. Estas substâncias apresentam diversas atividades biológicas, como captação e neutralização de radicais (ação antioxidante), atividade antimicrobiana, antitumorigênica, entre outras (COUTINHO *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2013).

Já foram identificados pigmentos exclusivos para o gênero *Campomanesia*. Bonilla *et al.* (2005) identificaram pigmentos amarelos,

extraídos das sementes de *C. lineatifolia*, os quais foram denominados champanonas, com coloração entre o amarelo e o laranja. Compostos exclusivos produzidos por espécies e grupos específicos podem ainda ser utilizados como ferramenta taxonômica (CECHINEL-FILHO e YUNES, 1998; BOURGAUD *et al.*, 2001).

Os flavonoides, pertencentes ao grupo dos compostos fenólicos, são um dos grupos mais estudados dentro das espécies do gênero *Campomanesia*. Schmeda-Hirschmann (1995) identificou compostos com propriedades farmacológicas como quercetina, miricetina e rutina, com ações anti-inflamatórias, anticarcinogênica, imunomodulatórias e captura de radicais livres. Kataoka e Cardoso (2013) compararam os fenóis totais e flavonoides entre *C. xanthocarpa* e *C. sessiliflora*, encontrando grande semelhança na composição química das duas espécies.

Em outras espécies do mesmo gênero, já foram identificados diversos flavonoides, como em *C. adamantium* onde Coutinho *et al.* (2008) identificaram cinco flavanonas e três chalconas em extrato foliar. Nesta mesma espécie, Ferreira *et al.* (2013) encontraram os compostos miricitrina, miricetina e quercetina e verificaram o potencial antioxidante dos extratos da planta.

Fernandes *et al.* (2015) observaram a presença de flavonoides em extratos da polpa dos frutos e sementes de *C. lineatifolia*, tais extratos apresentando poder antioxidante em células hepáticas. Madalosso *et al.* (2012) verificaram a composição química de extratos de *C. lineatifolia* quanto a fenóis totais, conteúdo de flavonoides e de taninos, entre os quais foram identificados a catequina e a quercitrina. Santos *et al.* (2013) encontraram aproximadamente 131 mg de fenóis totais por grama da polpa de frutos, além de outros compostos como carotenos, licopeno,  $\beta$ -criptoxantina, violaxantina, entre outros.

Entre os compostos identificados por Coutinho *et al.* (2008) estão flavononas e chalconas como 7-hidroxi-5-metoxi-flavanona, 7-hidroxi-5-metoxi-6-metilflavanona, 5,7-dihidroxi-6-metilflavanona, 5,7-dihidroxi-8-metilflavanoni, 2,4-dihidroxi-6-metoxichalcona, 5,7-dihidroxi-6,8-dimetilflavanona, 2,4-dihidroxi-6-metoxi-5-metilchalcona, 2,4-dihidroxi-6-metoxi-3-metilchalcona e a 2,4-dihidroxi-6-metoxi-3,5-dimetilchalcona. Verificou-se ainda que diferentes populações de gabirobeira apresentavam diversidade quantitativa dos componentes nos extratos obtidos (COUTINHO *et al.*, 2008). Há grande

diversidade de óleos essenciais entre as espécies do gênero *Campomanesia* como mostrado nos estudos de Cardoso *et al.* (2009) com extração de óleos dos frutos de *C. xanthocarpa* e *C. adamantina*. Além disso, Cardoso *et al.* (2010) extraíram óleos essenciais de flores de *C. xanthocarpa* e *C. sessiliflora*, obtendo cerca de 0,1 e 0,08% de óleos essenciais, em relação a massa fresca, respectivamente. Adati *et al.* (2006) obtiveram 0,3% de óleos essenciais a partir de folhas de *C. phaea*. Os componentes principais dos óleos essenciais das espécies do gênero *Campomanesia* são sesquiterpenos.

Além das espécies já citadas, outras tiveram seus óleos essenciais analisados, como *C. adamantium* (COUTINHO *et al.*, 2009) e *C. sessiliflora* (GNOATTO *et al.*, 2010) encontrando-se como componentes majoritários (E)-salveno, (Z)- $\beta$ -ocimeno, mirtenal, viridifloreno, a-tujopsan-2-ol, leptospermona iso e, em *C. guaviroba*, t-pinocarveol, mirtenal e mirtenol (PASCOAL *et al.*, 2011).

## 2.4 A cultura de tecidos *in vitro*

A cultura de células, tecidos e órgãos vegetais *in vitro* consiste na manutenção dessas estruturas em meios artificiais sob condições controladas, principalmente temperatura e luminosidade, permitindo a propagação e cultivo, bem como o estudo fisiológico e celular (GEORGE *et al.*, 2008). Os primeiros cultivos de tecidos vegetais estabelecidos com sucesso foram os de White (1934) que cultivou ápices de raízes de tomateiro em solução nutritiva. Muitos outros autores desenvolveram trabalhos com as culturas *in vitro*, estabelecendo formulações de meios de cultura. O meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), desenvolvido para a cultura de tecidos de tabaco, é utilizado para muitas espécies, principalmente herbáceas, e o meio WPM (LLOYD e McCOWN, 1980) especialmente em espécies lenhosas.

Os calos são estruturas sem organização definida e com células indiferenciadas muito semelhantes a células meristemáticas (TORRES *et al.*, 1998). Seu cultivo pode ser realizado em meio líquido ou semi-sólido e se inicia, de forma geral, com a indução da calogênese em tecidos vegetais como segmentos de folhas, caules e raízes. Essas culturas podem servir para a regeneração de plantas via organogênese indireta, embriogênese somática

indireta, manutenção de culturas de protoplastos, início de culturas de células e ainda podem ser utilizadas para a obtenção de compostos metabólitos secundários. Protocolos de cultura de calos já foram desenvolvidos para diversas espécies com esse objetivo (BOURGAUD *et al.*, 2001; SHARP e DORAN, 2001; RAO e RAVISHANKAR, 2002; TAPIA e MONROY, 2007).

A indução da formação do calo é obtida através do cultivo dos explantes em meio contendo algum regulador vegetal, principalmente auxinas fortes como o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), o picloram e o ácido naftalenoacético (ANA) (HEIJDEN *et al.*, 1986; LEWINSOHN *et al.*, 1994; MATHUR *et al.*, 2010; GIRI *et al.*, 2012). Muitos autores ainda utilizam combinações de auxina com citocinina, como Mathur *et al.* (2010) que usaram 4,5 µM de 2,4-D com 1,2 µM de cinetina, para aumentar a proliferação dos calos de *Panax sikkimensis* em meio MS modificado. Já Giri *et al.* (2012) induziram calos em *Habenaria edgeworthii* no meio MS ou MS/2 com 1 µM de ANA, por duas semanas, e após esse período, subcultivaram os calos em meio contendo 0,1 µM de benzilaminopurina (BAP) a cada quatro semanas. Em algumas espécies já foram obtidas culturas de calos sem a adição de auxinas aos meios de cultura, como no caso de sementes de *Olea europea* cultivadas em meio MS adicionado de 4,44 µM de BAP e 1,44 µM de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) (GENTILE e UCCELLA, 2014).

## **2.5 Metabólitos secundários em culturas de tecidos *in vitro***

Para a extração dos metabólitos secundários das plantas, é necessária uma grande quantidade de matéria prima, que é destruída no processo. Tal extração pode ser inviável devido à falta de plantas, seja por questões de sazonalidade ou pela raridade dessas plantas, que não são cultivadas, mas retiradas do meio ambiente (TAPIA e MONROY, 2007). Um bom exemplo disso é o composto taxol, produzido pelas plantas do gênero *Taxus*, que foi um dos primeiros compostos a ser produzido *in vitro* em larga escala, por meio do uso de biorreatores (DÖRNENBURG e KNORR, 1995). Antes da produção em biorreatores, as plantas desse gênero sofreram risco de extinção devido à extração descontrolada do taxol diretamente de indivíduos na natureza (DÖRNENBURG e KNORR, 1995). Poucos protocolos são comercialmente

empregados, possivelmente pela dificuldade da aplicação dos protocolos desenvolvidos em laboratório em larga escala (DÖRNENBURG e KNORR, 1995; DICOSMO e MISAWA, 1995; TAPIA e MONROY, 2007).

Muitos compostos são produzidos em tecidos específicos e armazenados em tecidos distintos de sua origem, o que pode ocasionar, nos sistemas *in vitro*, a degradação dos metabólitos devido à ausência dos tecidos de estocagem dessas substâncias (GIAMAKIS *et al.*, 2001).

Apesar das dificuldades, há muitos trabalhos bem sucedidos de obtenção de metabólitos secundários *in vitro*, como, por exemplo, antocianinas e ginsenosídeos extraídos do *Panax sikkimensis* (MATHUR *et al.*, 2010) e ácido rosmarínico e flavonoides de *Dracocephalum kotschy* (FATTAHI *et al.*, 2013), ou ainda a quantificação dos metabólitos totais *in vitro* em culturas de células de *Artemisia absinthium* (ALI *et al.* 2013), *Piper* sp. (DELGADO-PAREDES *et al.* 2013) e *Gomphrena globosa* (ANDRÉ *et al.*, 2003).

Em plantas da família Myrtaceae, o cultivo *in vitro* de tecidos para obtenção de metabólitos secundários foi realizado principalmente em espécies do gênero *Eucalyptus* (FURUYA *et al.*, 1987; GIAMAKIS *et al.*, 2001). Em culturas *in vitro* de flores de *Eucalyptus camaldulensis* (GIAMAKIS *et al.*, 2001) e em cultura de células provenientes de ramos jovens em *Eucalyptus perriniana* (FURUYA *et al.*, 1987), foi possível extrair óleos essenciais com propriedades farmacêuticas, como antifúngica e bactericida. Giamakis *et al.* (2001) obtiveram diversos terpenos a partir de calos de *Eucalyptus camaldulensis* induzidos em tecidos florais e estames imaturos cultivados na presença de 2,4-D e BAP, isolados ou combinados, no meio MS. Não houve diferença na porcentagem de formação de calos entre os tratamentos; entretanto, a taxa de crescimento foi maior nos meios contendo ambos os reguladores. Nesse trabalho, observou-se diferentes constituintes dos óleos essenciais dependendo do explante inicial. Os calos obtidos de estames apresentavam uma grande quantidade de alcanos, alcenos e álcoois, enquanto os calos provenientes das flores imaturas produziram grande quantidade de monoterpenos. Houve também diferença na composição dos extratos em relação ao cultivo em condições de luz e escuro principalmente de estames, quanto às proporções de algumas substâncias.

Longo *et al.* (2007) identificaram as antocianinas de *Eugenia myrtifolia* em brotos obtidos *in vitro*, onde o acúmulo de pigmentos nas folhas indicou o

potencial da espécie na obtenção destes compostos. Entretanto não foi possível realizar a indução de calos devido à alta taxa de contaminação do material inoculado (LONGO *et al.*, 2007).

## 2.6 Elicitores no cultivo *in vitro* de calos e células

O processo de elicitação ocorre pelo estresse provocado por agentes químicos e físicos sobre a planta, podendo ser bióticos ou abióticos, ativando a expressão gênica e as rotas de biossíntese responsáveis pela proteção da planta (BOURGAUD *et al.*, 2001). Como agentes elicitores, podem ser utilizados fragmentos de parede celular e proteínas de patógenos, diversos compostos orgânicos, sais de metais pesados, radiação ultravioleta, correntes elétricas, jasmonato, entre outros (BHUIYAN e ADACHI, 2003; CHEN *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2010). A elicitação aumenta a síntese e a secreção dos metabólitos secundários para o meio extracelular, permitindo que eles sejam difundidos no meio de cultura e extraídos sem a necessidade de rompimento e destruição das células e tecidos dos cultivos (BHUIYAN e ADACHI, 2003).

Em células de *Portulaca* sp. cultivadas para a produção de betacianinas, Bhuiyan e Adachi (2003) usaram como elicitores Fe-EDTA na concentração de 25 a 200  $\mu\text{M}$ , e  $\text{CuSO}_4$  na concentração de 10 a 80  $\mu\text{M}$ , além dos elicitores bióticos  $\beta$ -glucano e quitosana, em concentrações entre 0,025 e 50  $\text{mg.L}^{-1}$ . Estes autores observaram que as maiores concentrações dos elicitores acabaram por inibir a síntese de betacianinas e, no caso dos elicitores bióticos, as menores concentrações foram as mais eficientes. Os mesmos autores também observaram a ação do metil-jasmonato como elicitor, obtendo um aumento de 2,6 vezes na síntese de compostos, contra um aumento entre 1,5 e 1,8 vezes com o uso dos demais elicitores.

De forma geral, os jasmonatos atuam na regulação da expressão gênica, principalmente quando a planta é submetida a estresses bióticos e abióticos (CONCHA *et al.*, 2013; FLORES *et al.*, 2013) e são aplicados de forma exógena como elicitores até mesmo em plantas *in situ* por estimular a síntese de uma ampla diversidade de compostos do metabolismo secundário (ZHAO *et al.*, 2005; CHEN *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2010). Outros compostos, bióticos e abióticos,

utilizados como elicitores, aumentam a síntese dos jasmonatos nos tecidos vegetais, desencadeando assim a expressão gênica dos mecanismos de defesa, porém com um custo reduzido em relação a aplicação de jasmonatos exógenos (BHUIYAN e ADACHI, 2003; CONCHA *et al.*, 2013; FLORES *et al.*, 2013).

Lewinsohn *et al.* (1994) estudaram a regulação da síntese de monoterpenos em culturas de calos de *Abies grandis*, pela elicitação através da adição de extratos de dois fungos (*Trichosporium symbioticum* e *Penicillium brevicompactum*) e de compostos orgânicos (quitosana, extrato de levedura e pectinase) aos meios de cultura. Não houve aumento significativo do conteúdo de terpenos com os extratos dos fungos, porém houve incremento da síntese de monoterpenos (três a oito vezes) nas culturas tratadas com quitosana, extrato de levedura e pectinase, em relação ao controle cultivado sem elicitores.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Material vegetal**

##### **3.1.1 Sementes**

Frutos maduros, de coloração amarela ou alaranjada, de gabioba (*Campomanesia xanthocarpa*) foram coletados na primeira semana de dezembro nos anos de 2013, 2014 e 2015 em propriedade particular na cidade de São José dos Pinhais, PR, Brasil. Após a coleta, os frutos foram despulpados e as sementes lavadas em água corrente e levadas para o Laboratório de Micropropagação do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná, onde foram desinfestadas em câmara de fluxo laminar com etanol 70% por um 1 min, seguido de solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) 5%, acrescido de 0,1% de Tween20<sup>®</sup>, por 10 min e então enxaguadas por três vezes com água destilada autoclavada. As sementes foram germinadas *in vitro* e as plântulas obtidas usadas como fonte de explantes para a fase de indução de calos.

##### **3.1.2 Material do campo**

Ramos jovens das mesmas árvores adultas das quais foram obtidas as sementes, foram coletados entre os meses de outubro e novembro. Os ramos retirados das plantas do campo foram levados para o Laboratório de Micropropagação do Departamento de Botânica da UFPR em recipientes plásticos contendo água para evitar a desidratação dos tecidos. Todas as folhas foram removidas e desinfestadas em câmara de fluxo laminar.

### 3.2 Germinação de sementes

Para a germinação *in vitro* das sementes coletadas em 2013 e 2014, foram utilizados os meios WPM e WPM/2 (contendo metade da concentração de sais e as vitaminas completas), com e sem sacarose (30 g.L<sup>-1</sup>) e a cultura foi realizada na luz e no escuro. Além disso, sementes previamente embebidas em solução de Plant Preservative Mixture® (PPM®) a 0,2% por 24 horas antes da desinfestação, foram germinadas em meio WPM com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, na luz e no escuro.

As sementes coletadas em 2015 foram germinadas nos mesmos tratamentos, mas sem a embebição prévia na solução de PPM®.

As sementes foram introduzidas individualmente em tubos de ensaio de 15 cm de altura por 2,5 cm de diâmetro contendo 10 ml de meio de cultura. Para cada tratamento, foram utilizados 50 tubos.

Diariamente foram avaliados: a porcentagem de germinação das sementes, o índice de velocidade de crescimento (IVG) pelo método descrito por Maguire (1962), a porcentagem de necrose e da contaminação das sementes.

O IVG foi calculado pela formula abaixo:

$$\bar{t} = \frac{\sum_{i=1}^k n_i t_i}{\sum_{i=1}^k n_i}$$

Em que:

ti: tempo entre o início do experimento e a i-ésima observação (em dias);

ni: número de sementes que germinam no tempo ti;



k: último dia da observação.

### **3.3 Cultura de discos foliares e indução de calos**

#### **3.3.1 A partir de plântulas germinadas *in vitro***

Discos foliares provenientes de plântulas de quatro meses cultivadas *in vitro*, foram cortados com perfuradores metálicos cilíndricos, com 0,5 cm de diâmetro, contendo sempre a nervura central e sem as margens das folhas. Foram obtidos dois discos de cada folha e colocados em placas de Petri de 2,5 x 10 cm, contendo 40 ml de meio de cultura, num total de oito explantes por placa e 20 placas por tratamento.

No primeiro experimento foi utilizado o meio MS acrescido de 2,4-D nas concentrações de 2,5; 5,0 e 10,0  $\mu\text{M}$ .

No segundo experimento os discos provenientes das mesmas plântulas aos oito meses foram cultivados em meio MS suplementado com 2,4-D nas concentrações de 5, 10 e 20  $\mu\text{M}$  e em meio controle sem 2,4-D e acrescido de 0,1% PPM<sup>®</sup> antes da autoclavagem, testando também a posição do explante com a face adaxial ou abaxial da folha em contato com o meio de cultura.

O terceiro experimento foi realizado conforme o segundo utilizando as plântulas obtidas das sementes coletadas em 2014.

Após 60 dias, os calos obtidos foram subcultivados em meio MS contendo as mesmas concentrações de 2,4-D da fase de indução. Após mais 30 dias todos os calos foram cultivados em meio MS com 5  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e subcultivados a cada 30 dias para a manutenção dos calos. Os calos foram mantidos por dois anos nestas condições.

Os calos obtidos provenientes de uma mesma folha foram considerados de uma mesma linhagem celular, sendo obtido um total de 22 linhagens. Após seis subculturas (seis meses), foram isoladas quatro linhagens de calos com crescimento rápido e, numa segunda introdução de explantes foliares *in vitro*, após seis meses, obteve-se 16 linhagens, das quais oito sobreviveram *in vitro*. Cada linhagem é proveniente de uma mesma folha. Os calos das linhagens com maior crescimento (01, 04, 08 e 18) foram subcultivados isoladamente e avaliados pelo aumento da massa fresca, níveis de oxidação e necrose. Foram

pesados 6 calos separados de 4 placas escolhidas ao acaso, totalizando 24 calos, após 90 dias da introdução dos discos no meio de indução (30 dias do primeiro subcultivo dos calos).

As duas linhagens com maior crescimento, dentro das 4 mantidas, foram utilizadas para a extração e quantificação de compostos fenólicos.

### **3.3.2 A partir de plantas do campo**

#### **3.3.2.1 Desinfestação**

No primeiro experimento, a desinfestação das folhas foi realizada com álcool 70% por um 1 min, NaOCl 5%, acrescido de 0,1% de Tween 20®, por 10 min, seguido de enxague com água destilada autoclavada por três vezes.

Numa segunda introdução foram utilizadas duas concentrações de NaOCl, 5 e 7,5% por 10 min e 0,1% de PPM foi adicionado ou não nos meios de cultura.

No terceiro experimento foram realizados os tratamentos de desinfestação com 2,5 e 5% de NaOCl acrescido de 0,1% de Tween20®, por 10 min. A menor concentração de NaOCl também foi combinada com solução de cloreto de mercúrio ( $HgCl_2$ ) nas concentrações de 0,1 e 0,4%. Foram testados dois tempos de imersão para cada concentração de  $HgCl_2$ , 5 e 10 min, totalizando seis tratamentos. Os discos foliares foram introduzidos em meios MS sem 2,4-D suplementados com 0,1% de PPM® (GURI e PATEL, 1988).

Em todos os experimentos, as folhas foram mantidas em solução antioxidante contendo  $1g.L^{-1}$  de polivinilpirrolidona (PVP) após a desinfestação e até a introdução *in vitro*.

#### **3.3.2.2 Estabelecimento *in vitro***

Discos foliares com 1 cm de diâmetro obtidos a partir de plantas do campo foram introduzidos em placas de Petri de 2x10 cm contendo 40 ml de meio MS. Cada placa continha seis explantes, sendo utilizadas 20 placas por tratamento.

No primeiro experimento, 2,4-D foi acrescentado ao meio de cultura nas concentrações de 5, 10 e 20  $\mu\text{M}$ , o meio controle sendo o meio sem 2,4-D. Após 60 dias, os discos foram transferidos a meio MS contendo 2,4-D nas concentrações de 20, 40 e 60  $\mu\text{M}$  assim como no meio controle sem o regulador.

No segundo e terceiro experimento, após 30 dias no meio MS sem regulador vegetal, os explantes foram transferidos para meio de cultura MS contendo 2,4-D nas concentrações de 10, 20, 40 e 60  $\mu\text{M}$ .

Foram avaliadas a taxa de contaminação, sobrevivência e oxidação dos explantes e a formação de calos após 60 dias.

### **3.4 Elicitação**

Como agente elicitor foi escolhida a quitosana do Laboratório Catarinense, comprado em farmácia. Foi utilizado o meio de cultura MS, contendo 5  $\mu\text{M}$  de 2,4-D, suplementado com quitosana nas concentrações de 250 ou 500  $\text{mg.L}^{-1}$ , mais um controle sem quitosana. Além disso foi comparado o meio MS com 5  $\mu\text{M}$  de 2,4-D combinado com 2,2  $\mu\text{M}$  de 6-benzilaminopurina ou 500  $\text{mg.L}^{-1}$  de quitosana. A quitosana foi adicionada aos meios de cultura antes da autoclavagem.

Foram cultivados calos de 50 mg cada, da linhagem 01, em placa de Petri, com oito calos por placa, num total de 12 placas por tratamento. Após 60 dias foram retiradas as amostras para aplicar o teste de Folin-Ciocalteu como descrito no item 3.7.

### **3.5 Condições de cultura**

Os meios de cultura utilizados continham 30  $\text{g.L}^{-1}$  de sacarose, exceto onde indicada outra concentração, e foram gelificados com 6  $\text{g.L}^{-1}$  de ágar (Vetec®). Os meios tiveram seu pH ajustado para 5,8 com NaOH 1N e foram então autoclavados por 20 min a 120° C.

As culturas foram mantidas em sala de crescimento a  $25\pm 2$  °C, sob fotoperíodo de 16 h, com irradiância de 40  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . As culturas foram

subcultivadas em meio fresco a cada 30 dias e mantidas sob as condições descritas anteriormente.

### **3.6 Análise estatística e delineamento experimental**

Os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado (DIC). O número de explantes e de repetições usadas estão descritos em cada seção. Os explantes foram avaliados mensalmente para proliferação dos calos, necrose e oxidação dos tecidos e crescimento. Os dados obtidos foram analisados pelo teste de homogeneidade de Bartlett, seguido do teste de variância (ANOVA) e do teste de Tukey a 5% ou 1% de probabilidade. Foi realizada a análise fatorial dos dados, para determinar a interação entre os fatores.

### **3.7 Teste de Folin-Ciocalteu**

Para a análise dos compostos fenólicos totais foram pesados 100 mg de calos, ao qual foi adicionado 5 mL de solução etanol:água na proporção 1:1 (v/v), seguido de agitação por 30 min. Após esse tempo, alíquotas de 100 µL da amostra extraída foram colocadas em balões de vidro de 10 mL, com adição de 500 µL do reagente de Folin-Ciocalteu e 6 mL de água destilada, sendo a mistura agitada por um minuto. Em seguida foram adicionados 2 mL da solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 15%, que foi agitada por mais 30 s e o volume foi completado para 10 mL com água destilada. O branco foi realizado com uma solução contendo 250 µL de etanol, 1250 µL do reagente de Folin, 5 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 15%, agitada por 30s e avolumada com água destilada. A curva de calibração foi feita com base no ácido gálico preparado numa solução de 50 mL contendo 0,005 g de ácido gálico (solução mãe). A curva de calibração foi calculada com base na Tabela do anexo 1. As amostras preparadas foram analisadas em espectrofotometro da marca Shimadzu modelo UV-1800 com incidência de luz UV de 760 nm. As absorbâncias foram medidas e a quantidade relativa de fenóis totais foi inferida com base na curva de calibração.

O teste de Folin-Ciocalteu foi realizado em três amostras de calos: (1) linhagem 01 cultivada em meio de cultura contendo 500 mg.L<sup>-1</sup> de quitosana, 2)

linhagem 01 não tratada com o elicitor e (3) linhagem 18 sem elicitor. O teste foi realizado com duas repetições em triplicata.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Germinação de sementes de *C. xanthocarpa*

As sementes de *C. xanthocarpa*, obtidas no ano de 2013, começaram a germinar durante os primeiros dias após a inoculação até um período de aproximadamente duas semanas. Observou-se que muitas sementes apresentavam poliembrião, contendo até quatro embriões numa semente, e que estes embriões se desenvolviam normalmente. As taxas de germinação variaram de 34,10 a 88,88% (Tabela 1). Não houve interação entre os fatores analisados e não houve diferenças entre as taxas de germinação, exceto no caso das sementes germinadas no meio WPM com sacarose na luz (Tabela 2).

A velocidade de germinação das sementes foi estatisticamente igual nos tratamentos exceto no meio WPM com sacarose mantido na luz, o qual foi o tratamento com menor porcentagem de germinação (Tabela 2).

A taxa de contaminação fungica das sementes foi baixa e não houve contaminação bacteriana, atingindo no máximo 13,33% (dados não mostrados) indicando não ser necessário realizar alterações no protocolo de desinfestação, nem aplicar o biocida PPM<sup>®</sup>. Não houve perdas por oxidação e necrose.

No teste de germinação realizado em 2015, os mesmos meios foram testados, não havendo diferença estatística entre os resultados (Tabela 2), diferentemente da primeira germinação, onde o primeiro tratamento se mostrou inferior aos demais (Tabela 3). No ano de 2015, a taxa e a velocidade de germinação foram, em certos casos, inferiores em relação às obtidas em 2013, embora as sementes tenham sido coletadas no mesmo período em ambos os anos (entre os dias 10 e 15 de dezembro). Isso ocorreu provavelmente devido a um adiantamento da floração e maturação dos frutos no ano de 2015.

Tabela 1 – TAXA DE GERMINAÇÃO E ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) *IN VITRO* DE SEMENTES DE *Campomanesia xanthocarpa* COLETADAS EM 2013.

Meio	Sacarose	Luz	Germinadas %	IVG
WPM	30 g.L <sup>-1</sup>	Sim	34,10 b	0,076 b
		Não	73,33 a	0,212 a
	-	Sim	84,44 a	0,219 a
		Não	55,55 ab	0,165 ab
WPM/2	30 g.L <sup>-1</sup>	Sim	84,44 a	0,228 a
		Não	73,33 a	0,218 a
	-	Sim	82,22 a	0,268 a
		Não	64,44 ab	0,201 a
WPM (pré-tratamento com PPM por 24 h)	30 g.L <sup>-1</sup>	Sim	66,66 a	0,185 ab
	30 g.L <sup>-1</sup>	Não	88,88 a	0,216 a
CV (%)			32,61	36,65

Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

Tabela 2 – TAXA DE GERMINAÇÃO E ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) *IN VITRO* DE SEMENTES DE *Campomanesia xanthocarpa* COLETADAS EM 2015.

Meio	Sacarose	Luz	Germinadas %	IVG
WPM	30 g.L <sup>-1</sup>	Sim	67,50a	0,175a
		Não	72,50a	0,181a
	-	Sim	67,50a	0,172a
		Não	75,00a	0,187a
WPM/2	30 g.L <sup>-1</sup>	Sim	60,00a	0,168a
		Não	55,00a	0,157a
	-	Sim	67,50a	0,169a

CV (%)	71,3	73,2
--------	------	------

Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

## 4.2 Indução de calos em discos foliares de *C. xanthocarpa* cultivados *in vitro*

### 4.2.1 Discos foliares de plantas crescidas *in vitro*

No primeiro experimento houve 100% de contaminação fungica. No segundo e terceiro experimento, a taxa de contaminação dos explantes provenientes de plântulas germinadas *in vitro* foi menor que 1%.

A formação de calos nos discos foliares se iniciou logo nas primeiras semanas de cultivo, com o intumescimento dos tecidos em meio com 2,4-D e não diferiu estatisticamente entre os tratamentos (Tabela 3). Houve diferença estatística quanto à taxa de necrose do material vegetal, sendo que os explantes com a face adaxial voltada para o meio de cultura necrosaram mais em relação aos explantes com a face abaxial em contato com o meio (Tabela 3). No controle, não houve formação de calos e os explantes necrosaram após 30 dias de cultivo (dados não mostrados).

Ocorreu oxidação em níveis variáveis em todos os explantes, o que não afetou a formação de calos (Figura 1C). As oxidações ocorreram principalmente nas bordas do disco foliar, possivelmente devido a injúria causada aos tecidos pelo corte. Poucos explantes foram perdidos devido à necrose e não houve diferença estatística entre as taxas de necrose nos tratamentos com 2,4-D (Tabela 3).

Tabela 3 – FORMAÇÃO DE CALOS E NECROSE EM DISCOS FOLIARES PROVENIENTES DE PLÂNTULAS DE *Campomanesia xanthocarpa* CULTIVADOS IN VITRO POR 60 DIAS EM MEIO MS CONTENDO 2,4-D, EM FUNÇÃO DA POSIÇÃO DO DISCO NO MEIO DE CULTURA

	Concentração de 2.4-D ( $\mu$ M)		
Posição*	5	10	20
Adaxial	23,86 <sup>ns</sup>	32,95 <sup>ns</sup>	20,45 <sup>ns</sup>

Formação de calos (%)	Abaxial	20,45 <sup>ns</sup>	28,4 <sup>ns</sup>	21,59 <sup>ns</sup>
Necrose (%)	Adaxial	10,23aA	15,91aA	9,09aA
	Abaxial	4,55aB	4,55aB	2,27aB

Resultados seguidos de letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade. Dados com letras maiúsculas iguais na vertical não diferem pelo mesmo teste.

<sup>ns</sup> não significativo.

A formação dos calos ocorreu inicialmente na região da nervura do disco foliar (Figura 1B). A formação do calo se deu entre quatro e cinco semanas após o início da indução e o crescimento dos calos foi lento no início (dados não mostrados). A partir do primeiro subcultivo dos calos, o aumento de massa fresca do material foi rápido. Após a 3ª semana do primeiro subcultivo a massa dos calos da linhagem 01 dobrou em relação ao peso inicial; porém, a partir da 4ª semana, não houve aumento significativo do peso, enquanto os calos das demais linhagens avaliadas cresceram menos durante todo o período avaliado em relação com a primeira linhagem (Figura 1) e as culturas começaram a ter crescimento mais lento e a sofrer oxidação (Figura 1).

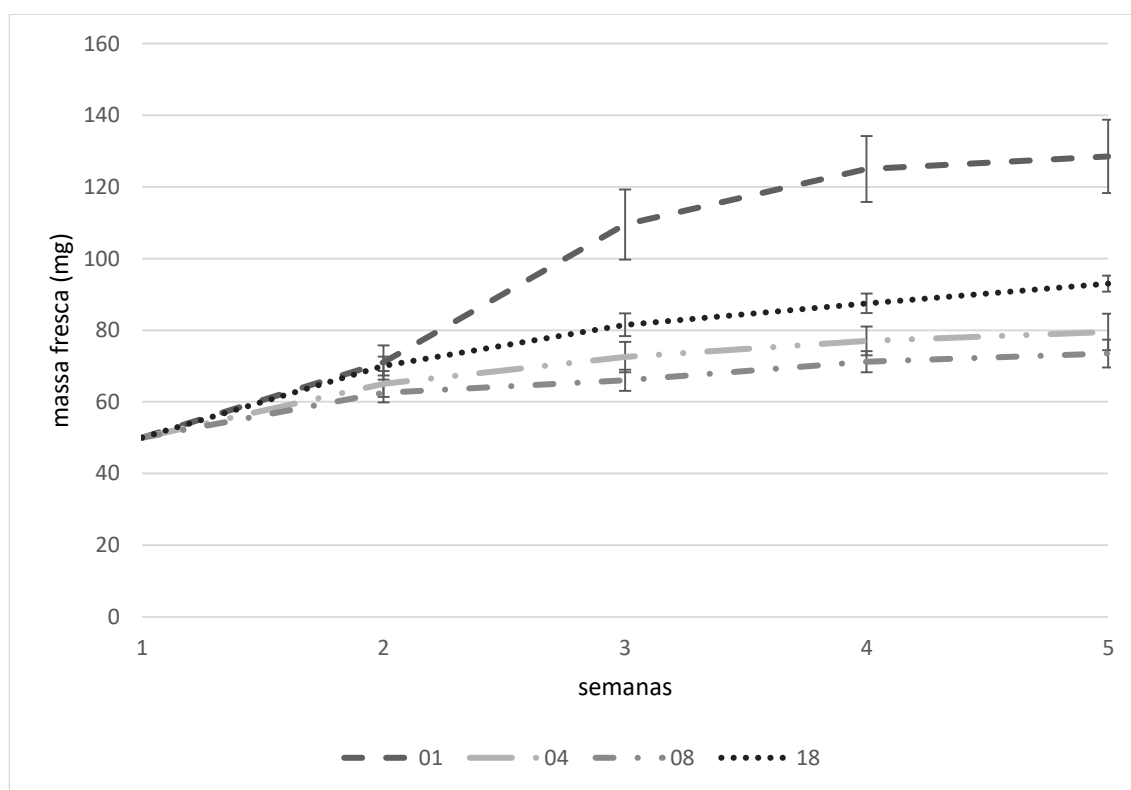




Figura 1 – CURVAS DE CRESCIMENTO DE CALOS DE QUATRO LINHAGENS CELULARES DE *Campomanesia xanthocarpa* (01, 04, 08 E 18) CONFORME MASSA FRESCA DURANTE QUATRO SEMANAS DE CULTIVO EM MEIO DE CULTURA MS ACRESCIDO DE 5  $\mu$ M DE 2,4-D. O TEMPO 1 INDICA O INÍCIO DO PRIMEIRO SUBCULTIVO.

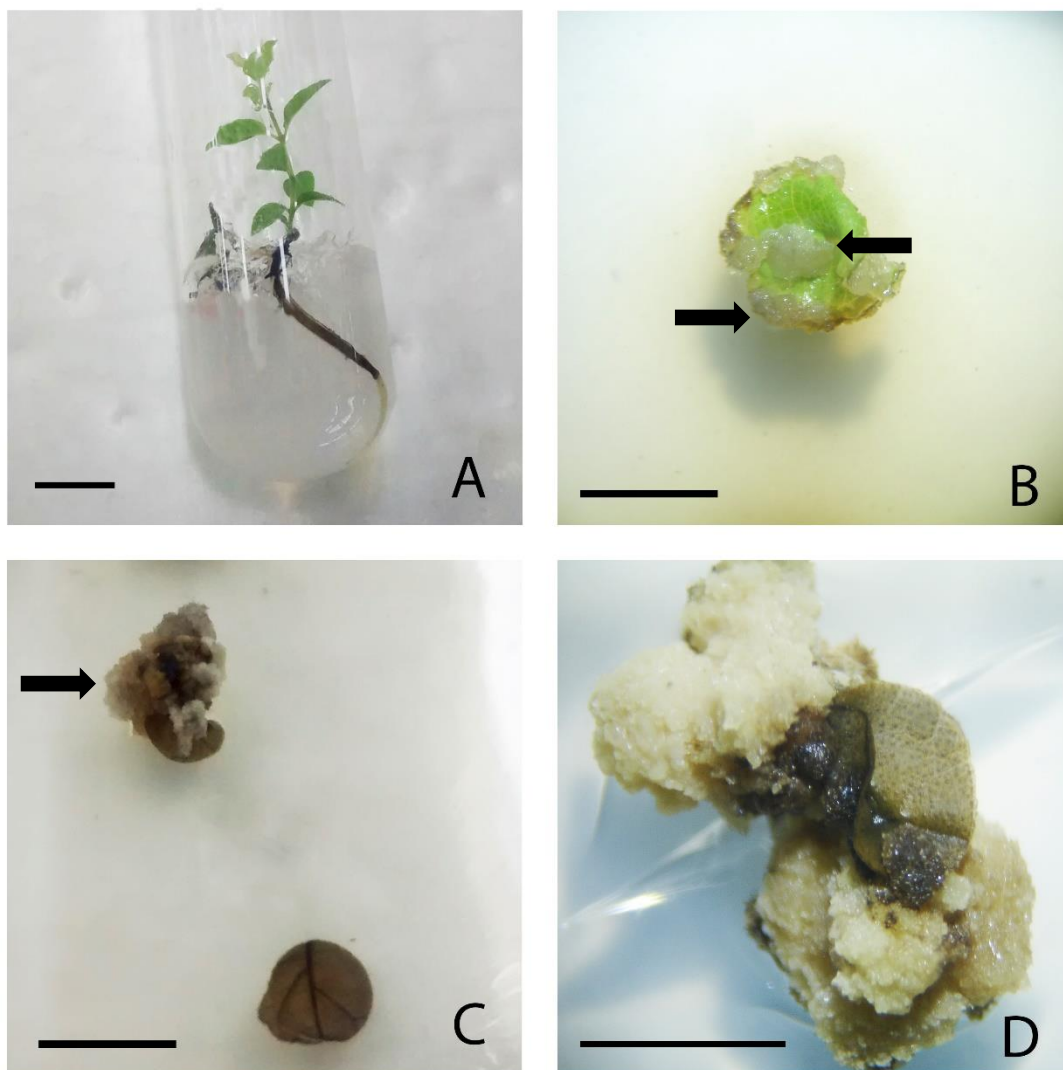


Figura 2 - PLÂNTULA DE *Campomanesia xanthocarpa* DE 30 DIAS, GERMINADA *IN VITRO* EM MEIO MS SEM REGULADORES (A); INÍCIO DA FORMAÇÃO DE CALOS EM MEIO MS COM 2,4-D AOS 30 DIAS (B); CALO EM DISCO FOLIAR (SETA) E DISCO FOLIAR NECROSADO APÓS 45 DIAS EM MEIO DE INDUÇÃO (C); CALO NO PRIMEIRO SUBCULTIVO APÓS 60 DIAS DA ESTABELECIMENTO *IN VITRO* (D). BARRA=1CM

#### 4.2.2 Desinfestação de explantes foliares e Indução de calos a partir do material do campo

No primeiro experimento, a contaminação dos discos foliares foi de 67%. Após 60 dias de cultivo, os explantes restantes não apresentaram sinais de

calogênese em meio de cultura MS adicionado de 2,4-D nas concentrações testadas.

No segundo experimento, com desinfestação com 5 e 7,5%, de NaOCl, e presença ou ausência de PPM® no meio, não houve diferença estatística entre as concentrações de NaOCl, porém a presença de 0,1% de PPM® no meio de cultura reduziu a taxa de contaminação de forma significativa (Figura 3). Não houve formação de calos.

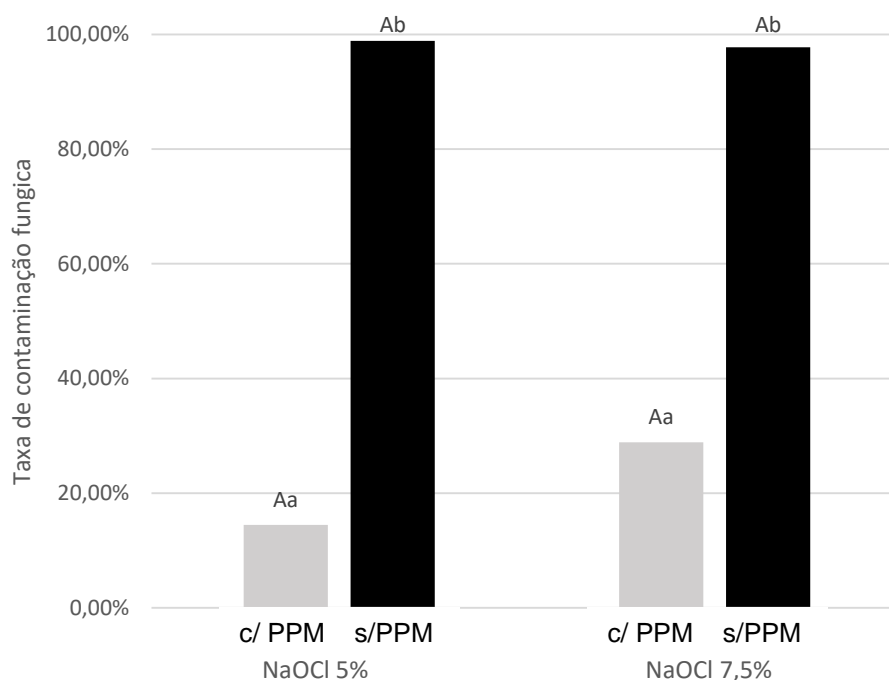


Figura 3: TAXA DE CONTAMINAÇÃO FUNGICA DE EXPLANTES PROVENIENTES DE *Campomanesia xanthocarpa* MANTIDAS NO CAMPO, DESINFESTADAS COM HIPOCLORITO DE SÓDIO NAS CONCENTRAÇÕES DE 5 E 7,5%, CULTIVADOS EM MEIO MS COM OU SEM PPM®. LETRAS MAIUSCULAS IGUAIS NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE EM COLUNAS DE MESMA COR, LETRAS MINUSCULAS IGUAIS NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE ENTRE COLUNAS DE CORES DISTINTAS.

Quando foi utilizado o cloreto de mercúrio para a desinfestação e que o PPM® foi adicionado aos meios de cultura, não houve contaminação dos explantes, mesmo nos tratamentos sem a presença de  $HgCl_2$ , porém 82% dos explantes oxidaram após três semanas. Os discos foliares que não oxidaram

completamente foram transferidos para meios com 2,4-D para a indução de calos. Após 60 dias, não houve formação de calos em nenhum dos explantes.

### 4.3 Compostos fenólicos totais

A linhagem 01 apresentou aproximadamente o dobro dos compostos fenólicos totais em relação a amostra da linhagem 18, ambas sem aplicação de elicitor. Além disso, o teor de fenois totais das amostras da linhagem 01 cultivadas na presença da quitosana foi o dobro do teor das amostras sem elicitação (Figura 4).

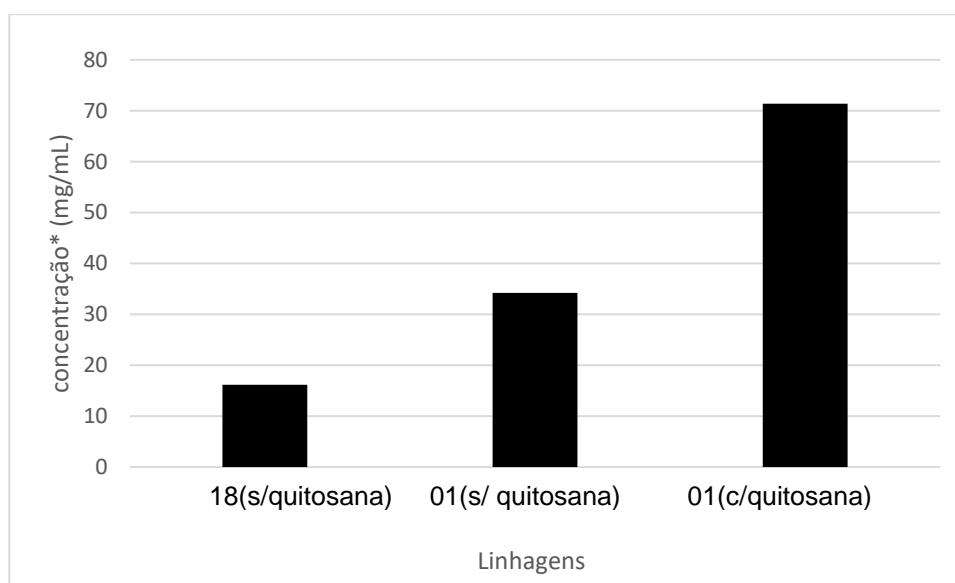


FIGURA 4 – CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS EM EXTRATOS DE CALOS DE *Campomanesia xanthocarpa* DAS LINHAGENS 18 E 01 SEM QUITOSANA E 01 COM QUITOSANA. \*CONCENTRAÇÃO RELATIVA À CURVA DE ABSORBÂNCIA DO ÁCIDO GÁLICO

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Germinação de sementes de *Campomanesia xanthocarpa*

As sementes de *Campomanesia xanthocarpa* germinaram em todas as condições testadas, independentemente da concentração dos sais no meio, da presença de sacarose (condições que afetam a pressão osmótica do meio) e da presença de luz. Apesar das sementes de plantas da família Myrtaceae serem definidas como fotoblásticas positivas (SANTOS *et al.*, 2004), o não requerimento de luz para a germinação de *C. xanthocarpa* foi observado por Herzog *et al.* (2012), assim como no presente trabalho onde a presença ou ausência de luz não afetou a germinação.

Segundo Gogosz *et al.* (2010), as plântulas de *C. xanthocarpa* possuem grande quantidade de reservas na forma de amido, que é rapidamente quebrado em sacarídeos menores após a germinação. Além disso, Gogosz *et al.* (2010) discutem a presença de estruturas cotiledonares, que auxiliam na fotossíntese na fase de plântula, podendo explicar o desenvolvimento das plântulas nas diversas condições apresentadas. Dessa forma, as plântulas não se beneficiam necessariamente dos compostos (sais e açúcares) presentes no meio devido à rápida conversão do amido em sacarídeos menores, como sacarose, e possuem independência da luz e da fotossíntese no início do desenvolvimento (GOGOSZ *et al.*, 2010).

## **5.2 Indução de calos em discos foliares de *Campomanesia xanthocarpa***

### **5.2.1 Desinfestação e indução de calos a partir de discos foliares de plantas germinadas *in vitro***

No presente trabalho a presença de PPM<sup>®</sup> teve um efeito positivo para a eliminação das contaminações. A contaminação dos explantes no meio de indução pode ser atribuída a microrganismos endógenos, que ocorrem em várias espécies lenhosas (MROGINSKI *et al.*, 1999; PALU *et al.*, 2011). Para contornar esse problema normalmente são utilizados antibióticos, os quais podem ser nocivos para os explantes (BIASI, 2005). Em consequência, a utilização do PPM<sup>®</sup> foi uma alternativa ao uso dos antibióticos. O PPM<sup>®</sup> (isotiazolona) é um composto contendo cloro com função biocida e biostática, atuando

principalmente contra o desenvolvimento de fungos e bactérias (GURI e PATEL, 1998). As isotiazolonas atuam na cadeia transportadora de elétrons e no ciclo do ácido cítrico, afetando a respiração celular, inibindo dessa forma o desenvolvimento de microrganismos (GURI e PATEL, 1998). Nenhum efeito fitotóxico foi observado nos explantes de *C. xanthocarpa*. Após 30 dias de cultivo no meio com PPM®, os explantes foram transferidos para meio fresco sem o composto, sem aparecimento de contaminação nas subculturas seguintes, indicando que houve sucesso na eliminação dos contaminantes.

Após a introdução dos discos foliares nos meios com 2,4-D, a formação de calos deu-se entre 30 e 60 dias. A indução de calos ocorreu em todas as concentrações de 2,4-D, porém não houve formação no controle. A formação de calos também é relatada em outras espécies da família Myrtaceae, por exemplo em embriões zigóticos de *Myrtus communis*, na presença de 2,26 a 18,98  $\mu\text{M}$  de 2,4-D (CANHOTO *et al.*, 1999). Giamakis *et al.* (2001) obtiveram calos a partir de inflorescências de *Eucalyptus camaldulensis* utilizando concentrações de 2,4-D inferiores às utilizadas no presente trabalho, entre 0,05 e 0,25  $\mu\text{M}$ , combinadas ou não com 0,044 a 2,22  $\mu\text{M}$  de BAP, cultivados no escuro ou com fotoperíodo de 16h.

A indução dos calos se deve ao balanço entre os hormônios endógenos, auxinas e citocininas (GEORGE *et al.*, 2008), o qual é afetado pelos reguladores vegetais utilizados nas culturas como o 2,4-D, que causa a hiperpolarização da membrana celular, alterando o ciclo celular e induzindo uma alta divisão celular, a qual resulta na formação do calo (SANÉ *et al.*, 2006).

A formação de calos na região da nervura deve-se à presença dos tecidos vasculares, principalmente o câmbio vascular e o tecido parenquimático (SANÉ *et al.*, 2006). Alguns calos se formaram na região do corte do disco. Nesse caso, o estresse devido ao corte, as interações genotípicas e as condições do ambiente podem desencadear a calogênese (SANÉ *et al.*, 2006; LAHIRI *et al.* 2012).

## **5.2.2 Desinfestação e indução de calos a partir do material do campo**

Os resultados do experimento mostraram que a contaminação de explantes de material proveniente de campo aberto é maior do que de plantas provenientes de casas de vegetação, ou de plantas obtidas *in vitro*, devido à maior exposição dos tecidos aos microrganismos presentes no ambiente (GEORGE *et al.*, 2008; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2010). Uma grande quantidade de fungos e bactérias vivem de forma endógena na planta, sem causar nenhum dano ao seu hospedeiro, mas as condições *in vitro* levam ao crescimento excessivo dos microrganismos, que competem por nutrientes com a planta, levando-a à morte.

A adição de PPM® mostrou-se necessária para o estabelecimento *in vitro* dos explantes de plantas do campo. A desinfestação com hipoclorito de sódio associada ao uso de PPM® no meio impediu o aparecimento de contaminação podendo-se assim evitar o uso do cloreto de mercúrio, sendo este um composto altamente tóxico que gera grande quantidade de resíduos, os quais necessitam de descarte apropriado após o uso (SCHERWINSKI-PEREIRA, 2010).

### 5.3 Análise dos compostos fenólicos

A maior concentração de compostos fenólicos nos calos tratados com quitosana, verificada no presente estudo, ocorre como resposta de defesa dos tecidos vegetais ao composto. Outros elicitores como  $\beta$ -glucana, extrato de leveduras e fragmentos de paredes celulares de fungos também podem ser utilizados para a síntese de metabólitos de outros grupos funcionais nas plantas. Tal efeito foi observado em células de *Portulaca* sp. cultivadas para a produção de antocianinas onde os melhores resultados foram obtidos após adição de  $\beta$ -glucana e metil-jasmonato aos meios de cultura e não com quitosana (BHUIYAN E ADACHI, 2003). Da mesma maneira, a aplicação de quitosana e quitina nos meios provocou aumento de síntese de composto fenólico como as coumarinas (entre quatro e cinco vezes) em *Ruta graveolens* (ORLITA *et al.*, 2008). Resultados similares foram obtidos para obtenção de plumbagina, outro composto fenólico, em culturas de *Plumbago rosea* acrescidas de quitosana (KOMARAIH *et al.*, 2002).

As diferenças entre as concentrações de compostos fenólicos entre calos de diferentes linhagens podem ser atribuídas a diversidade genética, estado fisiológico e condições de cultura dos explantes (GEORGE *et al.*, 2008). Um resultado interessante foi o fato de o calo com maior crescimento apresentar também a maior concentração de compostos fenólicos, permitindo assim uma fácil seleção do material para cultura em larga escala.

## 6. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

Foi possível obter a germinação *in vitro* de sementes de *Campomanesia xanthocarpa*, independentemente da presença de luz e da adição de sacarose ao meio. Recomenda-se o uso de meio WPM/2 sem sacarose para germinação de sementes *in vitro*.

Observou-se a formação de calos em meio MS sempre na presença de 2,4-D. podendo ser mantidos durante vários subcultivos de maneira a aumentar a massa de material para a extração de metabólitos. Folhas de plantas adultas não são recomendadas para o início da formação de calos, mas sim tecidos de material *in vitro*.

A quitosana promoveu um incremento no conteúdo de compostos fenólicos dos calos, porém outros agentes elicitores como quitina, extrato de levedura, glucanos e fragmentos de paredes celulares de fungos podem ser utilizados a fim de aumentar a síntese de metabólitos específicos. Os compostos fenólicos bioativos dessas culturas podem ser extraídos para o uso na indústria farmacêutica e cosmética.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADATI, R. T.; FERRO, V. O. Volatile Oil Constituents of *Campomanesia phaea* (O. Berg) Landrum. (Myrtaceae). **Journal of Essential Oil Research**. v.18, p. 691-692, 2006.

ALI, M.; ABBASI, B. H.; HAQ, I.U. Production of commercially important secondary metabolites and antioxidant activity in cell suspension cultures of *Artemisia absinthium* L. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 400-406, 2013.

ANDRÉ, A. C. G. M.; DIAS, D. A.; PEREIRA, P. S.; ABREU, L. C. P.; FRANÇA, S. C. Estudo comparativo da produção de metabólitos secundários em cultura de células e na planta in natura de *Gomphrena globosa* (Amaranthaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13, supl. 2, p. 22-24, 2003.

BENZIE, I. F. F.; WACHTEL-GALOR, S. **Herbal Medicine: biomolecular and clinical aspects**, 2ª edição, CRC Press, 2011.

BHUIYAN, M. N. H.; ADACHI, T. Stimulation of betacyanin synthesis through exogenous methyl jasmonate and other elicitors in suspension-cultured cells of *Portulaca*. **Journal of Plant Physiology**. v. 160, p. 1117-1124, 2003.

BIASI, L. A. Propagação do abacateiro. **Agropecuária Catarinense**. v. 8, n. 3, p. 29-31, 1995.

BIAVATTI, M. W.; FARIAS, C.; CURTIUS, F.; BRASIL, L. M.; HORT, S.; SCHUSTER, L.; LEITE, S. N.; PRADO, S. R. T. Preliminary studies on *Campomanesia xanthocarpa* (Berg.) and *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J.F. Macbr. aqueous extract: weight control and biochemical parameters. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, p. 385-389, 2004.

BONILLA, A; DUQUE, C.; GARZÓADATI, C.; TAKAISHI, Y.; YAMAGUCHI, K; HARA, N.; FUJIMOTO, Y. Champanones, yellow pigments from the seeds of champa (*Campomanesia lineatifolia*). **Phytochemistry**, v. 66, n. 14, p. 1736-1740, 2005.

BOURGAUD, F.; GRAVOT, A.; MILESI, S.; GONTIER, E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Science**. v. 161, p. 839-851, 2001.

CANHOTO, J. M.; LOPES, M. L.; CRUZ, G. S. Somatic embryogenesis and plant regeneration in myrtle (Myrtaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v. 57, p. 13-21, 1999.

CARDOSO, C. L.; KATAOKA, V. M. F.; RÉ-POPPI, N. Identification of the Volatile Compounds of Flowers of *Campomanesia sessiliflora* O. Berg and *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. **Journal of Essential Oil Research**. v. 22, p. 254-256, 2010.



CARDOSO, C. L.; LIMA, A. S. V.; RÉ-POPPI, N.; VIEIRA, M. C. Fruit Oil of *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg and *Campomanesia adamantium* O. Berg. **Journal of Essential Oil Research**. v. 21, p.481-483, 2009.

CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização de atividade. **Química Nova**, v. 21, n.1, p. 99-105, 1998.

CHEN, H.; JONES, A. D.; HOWE, G. A. Constitutive activation of the jasmonate signaling pathway enhances the production of secondary metabolites in tomato. **Federation of European Biochemical Societies**. v. 580, p. 2540-2546, 2006.

CONCHA, C. M.; FIGUEROA, N. E., POBLETE, L. A.; OÑATE, F. A.; SCHWAB, W.; FIGUEROA, C. R. Methyl jasmonate treatment induces changes in fruit ripening by modifying the expression of several ripening genes in *Fragaria chiloensis* fruit. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 70, p. 433-444, 2013.

COUTINHO, I. D.; COELHO, R. G.; KATAOKA, V. M. F.; HONDA, N. K.; SILVA, J. R. M.; VILEGAS, W.; CARDOSO, C. A. L. Determination of phenolic compounds and evaluation of antioxidant capacity of *Campomanesia adamantium* leaves. **Eclética Química**. v.33, n.4, p. 53-56, 2008.

COUTINHO, I. D.; CARDOSO, C. A. L.; RÉ-POPPI, N.; MELHO, A. M., VIEIRA, M. C., HONDA, N. K.; COELHO, R. B. Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (Guavira). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 45, n. 4, p. 767-776, 2009.

DATNOFF, L. E.; SNYDER, G. H.; KORNDÖRFER, G. H. **Studies In Plant Science: Silicon in Agriculture**. v. 8, Elsevier, 2001.

DELGADO-PAREDES, G. E.; KATO, M. J.; IDROGO, C. R. Suspensiones celulares y producción de metabolitos secundarios en cultivos *in vitro* de *Piper* sp. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 12, n. 3, p. 269-282, 2013.

DICOSMO, F.; MISAWA, M. Plant Cell and Tissue Culture: Alternatives for Metabolite Production. **Biotechnology Advances**. v. 13, n. 3, p. 425-453, 1995.

DÖRNENBURG, H.; KNORR, D. Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures. **Enzyme and Microbial Technology**. v.17, p. 674-684, 1995.

FATTAHI, M.; NAZERI, V.; CLAVERIA-TORRAS, L.; SEFIDKON, F.; CUSIDO, R. M.; ZAMAMI, Z.; PALAZON, J. A new biotechnological source of rosmarinic acid and surface flavonoids: Hairy root cultures of *Dracocephalum kotschyi* Boiss. **Industrial Crops and Products**. v. 50, p. 256-263, 2013.

FERNANDES, T. O.; ÁVILA, R. I.; MOURA, S. S.; RIBEIRO, G. A.; NAVES, M. M. V.; VALADARES, M. C. *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae) fruits protect HEPG2 cells against carbon tetrachloride-induced toxicity. **Toxicology Reports**. v. 2, p. 184-193, 2015.

FERREIRA, L. C.; GRABE-GUIMARÃES, A.; PAULA, C. A.; MICHEL, M. C. P.; GUIMARÃES, R. G.; REZENDE S. A.; SOUZA-FILHO, J. D.; SAÚDE-GUIMARÃES, D. A. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Campomanesia adamantium*. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 145, p. 100-108, 2013.

FLORES, G.; BLANCH, G. P.; DEL CASTILLO, M. L. R. Isolation of the four methyl jasmonate stereoisomers and their effects on selected chiral volatile compounds in red raspberries. **Food Chemistry**. v.141, p. 2982-2987, 2013.

FURUYA, T.; ORIHARA, Y.; HAYASHI, C. Triterpenoids from *Eucalyptus perriniana* cultured cells. **Phytochemistry**. v. 26, n. 3, p. 715-719, 1987.

GENTILE, L.; UCCELLA, N. A. Selected bioactives from callus cultures of olives (*Olea europaea* L. Var. Coratina) by LC-MS. **Food Research International**. v. 55, p. 128–136, 2014.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. **Plant Propagation by Tissue Culture**. v. 1, 3<sup>o</sup> edição, Springer, 2008.

GIAMAKIS, A.; KRETSI, O.; CHINO, I.; SPYROPOULOS, C. G. *Eucalyptus camaldulensis*: volatiles from immature flowers and high production of 1,8-cineole and  $\beta$ -pinene by in vitro cultures. **Phytochemistry**. v. 58, p. 351-355, 2001.

GIRI, L.; DHYANI, P.; RAWAT, S.; BHATT. I. D.; NANDI, S. K.; RAWAL. R. S.; PANDE, V. *In vitro* production of phenolic compounds and antioxidant activity in callus suspension cultures of *Habenaria edgeworthii*: A rare Himalayan medicinal orchid. **Industrial Crops and Products**. v. 39, p. 1-6, 2012.

GNOATTO, M.; CARDOSO, C. A. L.; POPPI, N. R. Caracterização do óleo essencial das folhas de *Campomanesia sessiliflora* e *Campomanesia guaviroba* empregando CG-EM. In: **REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA**, 33. 2010, Águas de Lindóia. Resumos do Congresso, Águas de Lindóia: Sociedade Brasileira de Química, 2010.

GOGOSZ, A. M.; COSMO, N. L.; BONA, C.; SOUZA, L. A. Morfoanatomia da plântula de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae). **Acta Botanica Brasileira**. v. 24, n. 3, p. 613-623, 2010.

GURI, A. Z.; PATEL, K. N. Composition and methods to prevent microbial contamination of plant tissue culture media. United States Patent 5.750.402, 2 Jun. 1995, 12 Maio 1998.

HEIJDEN, R. V. D.; BROUWER, R. L.; VERPOORTE, R.; VAN BEEK, T. A.; HARKES, P. A. A.; SVENDSEN, A. B. Indole alkaloids from a callus culture of *Tabernaemontana elegans*. **Phytochemistry**, v. 25, n. 4, p. 843-846, 1986.

HELDT, H. W.; HELDT, F. Plant Biochemistry. 3ª Edição, California: Elsevier Academic Press, 2005.

HERZOG, N. F. M.; MALAVASI, M. M.; MALAVASI, U. C. Morfometria dos frutos e germinação de sementes de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. **Semina: Ciências Agrárias**. v. 33, n. 4, p. 1359-1366, 2012.

KATAOKA, V. M. F.; CARDOSO, C. A. L. Avaliação do perfil cromatográfico obtido por CLAE-DAD e da atividade antioxidante das folhas de espécies *Campomanesia sessiliflora* (O. Berg) Mattos e *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.15, n.1, p.121-129, 2013.

KLAFEK, J. Z.; SILVA, M. A.; PANIGAS, T. F.; BELLI, K. C.; OLIVEIRA, M. F.; BARRICHELLO, M. M.; RIGO, F. K.; ROSSATO, M. F.; SANTOS, A. R. S.; PIZZOLATTI, M. G.; FERREIRA, J.; VIECILI, P. R. N. Effects of *Campomanesia xanthocarpa* on biochemical, hematological and oxidative stress parameters in hypercholesterolemic patients. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 127, p. 299-305, 2010.

KOMARAI AH, P.; NAGA-AMRUTHA, R.N.; KAVI-KISHOR, P.B.; RAMAKRISHNA, S.V. Elicitor enhanced production of plumbagin in suspension cultures of *Plumbago rosea* L. **Enzyme and Microbial Biotechnology**, v. 31, p. 634-639, 2002.

LAHIRI, K.; MUKHOPADHYAY, M. J.; DESJARDINS, Y.; MUKHOPADHYAY, S. Rapid and stable in vitro regeneration of plants through callus morphogenesis in two varieties of *Mucuna pruriens* L. – an anti-Parkinson's drug yielding plant. **Nucleus**. v. 55, n. 1, p. 37-43, 2012.

LANDRUM, L. R. *Campomanesia, Pimenta, Blepharocalyx, Legrandia, Acca, Myrrhinium, and Luma* (Myrtaceae). **Flora Neotropica**, New York Botanical Garden Press e Organization for Flora Neotropica, 1986.

LEWINSOHN, E.; WORDEN, E.; CROTEAU, R. Monoterpene cyclases in grand fir callus cultures: modulation by elicitors and growth regulators. **Phytochemistry**. v.36, n. 3., p. 651-656, 1994.

LIMA, D. F.; GOLDENBERG, R.; SOBRAL, M. O gênero *Campomanesia* (Myrtaceae) no estado do Paraná, Brasil. **Rodriguésia**. v. 62, n. 3, p. 683-693, 2011.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Int. Plant Propagation Soc. Proc.** v. 30, p. 421–427, 1980.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**. v. 30, p. 421–427, 1980.

LONGO, L.; SCARDINO, A.; VASAPOLLO, G., BLANDO, F. Anthocyanins from *Eugenia myrtifolia* Sims. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**. v. 8, p. 329-332, 2007.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**. v. 1, 4ª edição, Nova Odessa, SP, Instituto Plantarum, 2002.

MADALOSSO, R. C.; OLIVEIRA, G. C.; MARTINS, M. T.; VIEIRA A. E. D.; BARBOSA, J.; CALIARI, M. V.; CASTILHO, R. O.; TAGLIATI, C. A. *Campomanesia lineatifolia* Ruiz & Pav. as a gastroprotective agent. **Journal of Ethnopharmacology**. v.139, p. 772– 779, 2012.

MAGUIRE, J, D. Speed of germination - aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v.2, p.176-177, 1962.

MALTA, L. G.; GHIRALDINI, F. G.; REIS, R.; OLIVEIRA, M. V.; SILVA, L. B.; PASTORE, G. M. In vivo analysis of antigenotoxic and antimutagenic properties of two Brazilian Cerrado fruits and the identification of phenolic phytochemicals. **Food Research International**. v. 49, p. 604–611, 2012.

MALTA, L. G.; TESSARO, E. P.; EBERLIN, M.; PASTORE, G. M.; LIU, R. H. Assessment of antioxidant and antiproliferative activities and the identification of phenolic compounds of exotic Brazilian fruits. **Food Research International**. v. 53, p. 417–425, 2013.

MARKMAN, B.E.O.; BACCHI, E.M.; KATO, E.T.M. Antiulcerogenic effects of *Campomanesia xanthocarpa*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p. 55-57, 2004.

MATHUR, A.; MATHUR, A. K.; GANGWAR, A.; YADAV, S.; VERMA, P.; SANGWAN, R. S. Anthocyanin production in a callus line of *Panax sikkimensis* Ban. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**. v. 46, p. 13-21, 2010.

MROGINSKI, L. A.; ROUVIER, S.M.; FABISIK, J.C.; LEVIT, M.; MARASSI, M.A.; SANSBERRO, P.A.; REY, H.Y. Effect of medium composition and light supply on in vitro shoot proliferation in *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae). **Journal of plant nutrition**. v. 22, n.2, p. 359-368, 1999.

MURASHIGE, T; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**. v.15, p. 473-497, 1962.

ORLITA, A.; SIDWA-GORYCKA, M.; PASZKIEWICZ, M.; MALINSKI, E.; KUMIRSKA, J.; SIEDLECKA, E.M.; LOJKOWSKA, E.; STEPNOWSKI, P. Application

of chitin and chitosan as elicitors of coumarins and furoquinolone alkaloids in *Ruta graveolens* L. (common rue). **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 51, p. 91-96, 2008.

PALU, E. G.; CORRÊA, L. S.; SUZUKI, A. N.; BOLIANI, A. C. Uso de antibióticos para o controle de bactérias endógenas visando à micropropagação da figueira. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 33, n. 2, p. 587-592, 2011.

PASCOAL, A. C. R. F.; LOURENÇO, C. C.; SODEK, L.; TAMASHIRO, J. Y.; FRANCHI-JUNIOR, G. C.; NOWILL, A. E.; STEFANELLO, M. E. A.; SALVADOR, M. J. Essential Oil from the Leaves of *Campomanesia guaviroba* (DC.) Kiaersk. (Myrtaceae): Chemical Composition, Antioxidant and Cytotoxic Activity. **Journal of Essential Oil Research**. v. 23, p. 34-37, 2011.

RAO, S. R.; RAVISHANKAR, G. A. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**. v. 20, p. 101-153, 2002.

SANÉ, D.; ABERLENC-BERTOSSI, F.; GASSAMA-DIA, Y.K.; SAGNA, M.; TROUSLOT, M.F.; DUVAL, Y.; BORGEL, A.; Histocytological Analysis of Callogenesis and Somatic Embryogenesis from Cell Suspensions of Date Palm (*Phoenix dactylifera*). **Annals of Botany**, v. 98, p. 301–308, 2006.

SANTOS, C. M. R.; FERREIRA, A. G.; ÁQUILA, M. E. A. Características de frutos e germinação de sementes de seis espécies de myrtaceae nativas do Rio Grande do Sul. **Ciência Florestal**. v. 14, n. 2, p. 13-20, 2004.

SANTOS, M. S.; LIMA, J. J.; PETKOWICZ, C. L. O.; CANDIDO, L. M. B. Chemical characterization and evaluation of the antioxidant potential of gabiropa jam (*Campomanesia xanthocarpa* Berg). **Acta Scientiarum**. v. 35, n. 1, p. 73-82, 2013.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. **Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas**. 1. ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, v. 1, 2010.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Flavonoids from *Calycorectes*, *Campomanesia*, *Eugenia* and *Hexachlamys* species. **Fitoterapia**, v. 66, p. 373-374, 1995.

SHARP, J. M.; DORAN, P. M. Strategies for enhancing monoclonal antibody accumulation in plant cell and organ cultures. **Biotechnology Progress**. v. 17, p. 979-992, 2001.

TAPIA, G. T.; MONROY, M R. La agregación celular en la producción de metabolitos secundarios en cultivos vegetales *in vitro*. **Interciencia**, v. 32, n. 10, p. 669-674, 2007.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. v. 01, Brasília: EMBRAPA, 1998.

VANISREE, M.; TSAY, H. S. Plant cell cultures – an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. **International Journal of Applied Science and Engineering**. v. 2, n. 1, p. 29-48, 2004.

WANG, H.; MA, C.; LI, Z.; MA, L.; WANG, H.; YE, H.; XU, G.; LIU, B. Effects of exogenous methyl jasmonate on artemisinin biosynthesis and secondary metabolites in *Artemisia annua* L. **Industrial Crops and Products**. v. 31, p. 214-218, 2010.

WHITE, P.R. Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. **Plant Physiology**. v. 9, p. 585–600, 1934.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. **Phytochemistry**. v. 64, p. 3-19, 2003.

ZHAO, J.; DAVIS, L. C.; VERPOORTE, R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. **Biotechnology Advances**. v. 23, p. 283-333, 2005.

## ANEXOS

Anexo 1 – Tabela para construção da curva padrão (curva mãe) para análises por espectrometria, com base na concentração de ácido gálico.

Volume solução mãe (mL)	Folin Ciocalteu (mL)	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 15% (mL)	Volume final (mL)	Conc. ác. gálico (mg/mL)	Abs
0,15	0,5	2,0	10	15,0	0,201
0,16	0,5	2,0	10	16,0	0,215
0,18	0,5	2,0	10	18,0	0,248
0,19	0,5	2,0	10	19,0	0,258
0,20	0,5	2,0	10	20,0	0,274
0,30	0,5	2,0	10	29,9	0,390
0,40	0,5	2,0	10	39,9	0,514
0,50	0,5	2,0	10	49,9	0,627
0,55	0,5	2,0	10	54,9	0,686
0,60	0,5	2,0	10	59,9	0,736
0,65	0,5	2,0	10	64,9	0,745
0,70	0,5	2,0	10	69,9	0,797

## Anexo 2 – Análise estatística dos experimentos de germinação

=====

ASSISTAT Versão 7.7 beta (2014) - Homepage <http://www.assistat.com>

Por Francisco de A. S. e Silva DEAG-CTRN-UFCG - Atualiz.01/04/2014

=====

Arquivo EXP2\_-\_Tukey\_Germinacao.txt

Data 01/12/2014 Hora 11:26:18

## EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

## QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	9	2.43600	0.27067	5.1284 **
Resíduo	80	4.22222	0.05278	
Total	89	6.65822		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

## Anexo 3 – Análise estatística dos experimentos de indução de calos a partir de plântulas in vitro: formação de calos

=====

ASSISTAT Versão 7.7 beta (2014) - Homepage <http://www.assistat.com>

Por Francisco de A. S. e Silva DEAG-CTRN-UFCG - Atualiz.27/09/2014

=====

Arquivo analiseexp2setembro.txt Data 06/11/2014 Hora 14:00:49

## EXPERIMENTO FATORIAL



## QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Fator1(F1)	2	3.92424	1.96212	1.8872 ns
Fator2(F2)	1	0.48485	0.48485	0.4663 ns
Int. F1xF2	2	2.56061	1.28030	1.2314 ns
Tratamentos	5	6.96970	1.39394	1.3407 ns
Resíduo	126	131.00000	1.03968	
Total	131	137.96970		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

## Anexo 4 – Análise estatística da contaminação das plantas do campo

=====

ASSISTAT Versão 7.7 beta (2015) - Homepage <http://www.assistat.com>  
 Por Francisco de A. S. e Silva - UFCG-Brasil - Atualiz. 01/04/2015

=====

Arquivo tukey\_cont\_campo.txt Data 25/09/2015 Hora 10:56:22

## EXPERIMENTO FATORIAL

## QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Fator1(F1)	1	2.40000	2.40000	2.6182 ns
Fator2(F2)	1	317.40000	317.40000	346.2545 **
Int. F1xF2	1	3.26667	3.26667	3.5636 ns
Tratamentos	3	323.06667	107.68889	117.4788 **
Resíduo	56	51.33333	0.91667	
Total	59	374.40000		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )