Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes

Leila Cantelmo Paiva

Cultura de tecidos desdiferenciados e embriões somáticos de *Petiveria alliacea* L. visando à produção de substâncias bioativas

Rio de Janeiro
2011

Leila Cantelmo Paiva

Cultura de tecidos desdiferenciados e embriões somáticos de *Petiveria alliacea* L. visando à produção de substâncias bioativas

Dissertação apresentada, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós Graduação em Biologia Vegetal do Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de Concentração em Conservação e Utilização da Biodiversidade.

Orientação: Prof.ª Dra. Rachel Fatima Gagliardi Araujo

Co-orientação: Prof.ª Dra. Marsen Garcia Pinto Coelho

Rio de Janeiro

2011

CATALOGAÇÃO NA FONTE

UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC-A

C229 Cantelmo, Leila Paiva.
Cultura de tecidos desdiferenciados e embriões somáticos de *Petiveria alliacea* L. visando à produção de substâncias bioativas / Leila Paiva Cantelmo. - 2012.
87 f. ; il.
Orientação: Rachel Fatima Gagliardi Araujo
Co-orientação: Marsen Garcia Pinto Coelho
Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal.

1. Petiveria alliacea – Propagação-in-vitro – Teses. 2. Petiveria alliacea - Anatomia – Teses. I. Araujo, Rachel Fatima Gagliardi. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes. IV. Título.

CDU 582.664.3

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação.

_____ _____

Assinatura Data

Leila Cantelmo Paiva

Cultura de tecidos desdiferenciados e embriões somáticos de *Petiveria alliacea* L. visando à produção de substâncias bioativas

Dissertação apresentada, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós Graduação em Biologia Vegetal do Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de Concentração em conservação e utilização da biodiversidade.

Aprovado em 25 de fevereiro de 2011.

Banca Examinadora:

_____

Prof. Dr. Celso Luiz Salgueiro Lage
Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI)

_____

Prof.ª Dra Elisabeth Atalla Mansur de Oliveira
Departamento de Biologia Celular (IBRAG/UERJ)

_____

Prof.ª Dra Georgia Pacheco Peters de Almeida
Departamento de Biologia Celular (IBRAG / UERJ)

_____

Prof.ª Dra Norma Albarello
Departamento de Biologia Vegetal (IBRAG / UERJ)

_____

Prof.ª Dra Aline Castellar Duarte
Departamento de Produtos Naturais e Alimentos (Faculdade de Farmácia / UFRJ)

Rio de Janeiro

2011

DEDICATÓRIA

À minha família, importante em todos os momentos da minha vida. Ofereço.

A Deus, como gratidão pelo cuidado que sempre teve comigo. Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Rachel, mais que uma simples orientadora. Por permitir que me apoiasse sobre seus ombros de gigante para a realização deste trabalho.

À Prof.ª Marsen Coelho (Departamento de Bioquímica – UERJ) pela co-orientação, possibilitando a elaboração de parte importante deste projeto.

À Prof.ª Elisabeth Mansur e Profª Norma Albarello pela disponibilização da infraestrutura do Núcleo de Biotecnologia Vegetal.

À Prof.ª Cátia Callado, pela colaboração no desenvolvimento da análise histológica e disponibilização da infraestrutura laboratorial do Depto. de Anatomia Vegetal da UERJ.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Biologia Vegetal, pelos ensinamentos compartilhados e oportunidade de realização do curso.

Ao Prof. Antônio Carlos, por me receber sempre de braços abertos em seu laboratório para a elaboração das imagens fotográficas.

À Prof.ª Suzana Guimarães Leitão (Laboratório de Produtos Naturais e Alimentos – UFRJ), que mesmo não me conhecendo pessoalmente, permitiu a realização de parte deste projeto em seu laboratório.

À Aline, pela colaboração, indicações de leituras e sugestões que enriqueceram, com toda certeza, este trabalho.

À Renatinha, uma pessoa imprescindível na vida de qualquer ser humano.

À Gê, por ter me ensinado com tanta paciência os primeiros passos na carreira científica.

Aos colegas do Laboratório de Anatomia Vegetal que sempre me receberam com tanto carinho.

À todos os técnicos, alunos e estagiários do Laboratório de Biotecnologia de Plantas (Labplan), pela amizade e auxílio.

Aos amigos do LABMIT: Daniele, Érika, Gabriel, Gregory, Gilson, Isabela, Joerg, Juliana, Leonardo, Marcella, Saide, Simone, pelo incentivo, amizade e bom humor que amenizaram momentos difíceis e divertiram momentos leves.

Às minhas fiéis escudeiras, companheiras de projeto Liane, Jamine, Mariana e Viviane, por se fazerem presentes nos momentos em que eu precisava estar ausente, possibilitando o andamento dos experimentos. Sem dúvida, vocês possuem grande parcela nesta conquista.

À amiga Bianka, por abrir muitas vezes mão do seu tempo para me ajudar sem esperar algo em troca. Dividimos durante muitos anos os ombros da nossa "gigante" e tê-la como amiga é motivo de orgulho. Mais uma vez, o meu MUITO OBRIGADA!

À colega de mestrado, Marcia Gianfaldoni, pela generosidade em todos os momentos que precisei da sua ajuda.

Ao biólogo Roberto Gayer, pela orientação nos procedimentos da cromatografia gasosa.

Às minhas irmãs, sobrinhos e cunhados, por me encherem de satisfação ao tê-los em minha vida.

À minha mãe, pelo estímulo e apoio incondicional em todos os momentos.

Ao meu querido pai (*in memoriam*), por ter me ensinado a nunca desistir dos meus sonhos.

Ao meu esposo Luciano e a minha filha Luísa, pela compreensão e carinho, apesar da pouca atenção nos momentos mais intensos deste trabalho, e pelo orgulho com que sempre reagiram aos resultados acadêmicos da "esposa/mãe" ao longo destes anos.

À Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES) pelo apoio financeiro ao projeto.

Se vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes.

Isaac Newton

RESUMO

PAIVA, Leila Cantelmo. *Cultura de tecidos desdiferenciados e embriões somáticos de Petiveria alliacea L. visando à produção de substâncias bioativas*. 2011. 87f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

Petiveria alliacea L. pertence à família Phytolaccacceae e é conhecida popularmente como "guiné" ou "amansa-senhor", entre outros nomes. Tem sido muito utilizada na medicina popular como agente terapêutico, devido à diversas propriedades farmacológicas. Estudos fitoquímicos têm contribuído para a descoberta de grande variedade de substâncias biologicamente ativas produzidas em diferentes partes da planta (saponinas, alcalóides, flavonóides, sulfetos, taninos, cumarinas, entre outros). A análise química da raiz tem revelado grande quantidade de derivados sulfurados, principalmente o dibenzil trissulfeto (DTS), com atividade antifúngica, antibacteriana, antioxidante e anticancerígena. Visando avaliar a produção biotecnológica do DTS, o presente trabalho teve como objetivo, otimizar a cultura de novas linhagens de calos, células em suspensão e embriões somáticos, a partir de plantas de *P. alliacea* L. mantidas *in vitro*, com o monitoramento da capacidade biossintética das culturas. Os resultados mostraram que a produção de calos friáveis foi possível em explantes foliares inoculados em meio MS suplementado com PIC ou 2,4-D. Além da resposta calogênica, foi observada a produção de estruturas globulares caracterizadas como embriões somáticos. A ocorrência de embriogênese somática direta foi confirmada através da análise histológica do processo regenerativo. A indução de embriões somáticos gerou um processo de embriogênese secundária altamente repetitivo até 150 dias de cultura e conversão a plantas em freqüência de 5%. Em relação à cultura de células em suspensão a partir dos calos friáveis, observou-se uma diminuição do crescimento celular ao longo das subculturas. As culturas em suspensão originadas de tecido embriogênico secundário continuaram o processo repetitivo em meio líquido e apresentaram conversão a plantas em taxas mais baixas que as obtidas em meio sólido. A obtenção de plantas completas a partir dos embriões somáticos demonstrou a possibilidade de utilização desse sistema para a micropropagação dessa espécie. O monitoramento fitoquímico dos sistemas de cultura *in vitro* e plantas de campo mantidas em casa de vegetação durante 02 anos apresentou diferenças significativas, confirmando que a cultura de tecidos pode alterar as rotas metabólicas. A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas realizada com extrato em diclorometano de embriões secos e hexânico de embriões frescos e raízes secas de plantas provenientes de embriões somáticos, demonstrou a presença do DTS, constituindo, portanto, sistemas *in vitro* importantes para a modulação desta substância.

Palavras-chave: Guiné. Phytolaccacea. Calo. Células em suspensão. Embriogênese Somática. Dibenzil trissulfeto.

ABSTRACT

Petiveria alliacea L. belongs to the family Phytolaccacceae and is commonly known as "guinea" or "master tamed," among other names. It has been used in folk medicine as a therapeutic agent due to its distinct pharmacological properties. Phytochemical studies have lead to the discovery of a wide range of biologically active substances produced in different parts of the plant (saponins, alkaloids, flavonoids, sulfates, tannins, coumarins, among others). Chemical analysis of the roots has revealed a great amount of sulfur derivatives, especially dibenzyl trisulfide (DTS), with antifungal, antibacterial, antioxidant and anticancer activities. In the view of evaluating the biotechnological production of DTS, this study aimed to optimize the *in vitro* culture of new callus lines, as well as suspension cells and somatic embryos, from *in vitro* plants of *P. alliacea* L., monitoring the biosynthetic capacity of the cultures. The results showed that the production of friable callus was obtained in leaf explants inoculated on MS medium supplemented with PIC or 2,4-D. In addition to the callogenic response, we observed the production of globular structures characterized as somatic embryos. The occurrence of direct somatic embryogenesis was confirmed by histological analysis of the regenerative process. The induction of somatic embryos gave rise to a secondary embryogenesis highly repetitive, until 150 days of culture and conversion to plants at a frequency of 5%. With respect to the cell suspension cultures from friable calluses, there was a decrease in cell growth during the subcultures. Suspension cultures derived from secondary embryogenic tissue maintained the repetitve process in liquid medium and displayed conversion rates lower than those obtained in solid medium. The development of whole plants from somatic embryos showed the possibility of using this system for the micropropagation of this species. The phytochemical assessment of the *in vitro* systems and plants kept in greenhouse conditions for 02 years showed significant differences, confirming that tissue culture may change the metabolic pathways. The gas chromatography / mass spectrometry performed with the dichloromethane extract of dried embryos and hexane extract of fresh embryos and dried roots of plants derived from somatic embryos showed the presence of DTS. Therefore, these cultures are considered important *in vitro* systems for the modulation of this substance.

Keywords: Guinea. Phytolaccacea. Callus. Cell suspension. Somatic embryogenesis. Dibenzyl trisulfide

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Aspecto geral de *Petiveria alliacea* L..... 25

Figura 2 – Esquema da origem unicelular e pluricelular em embriões somáticos..... 33

Figura 3 – Morfogênese *in vitro* em explantes foliares de *P. alliacea* L. cultivados na presença de luz..... 45

Figura 4 – Número médio de embriões por explante via embriogênese primária em explantes foliares de *P. alliacea* mantidos sob diferentes condições, após 120 dias de cultura..... 45

Figura 5 – Resposta embriogênica em explantes foliares de *P. alliacea* L. em presença de luz..... 46

Figura 6 – Embriões somáticos secundários obtidos a partir de embriões primários originados de explantes foliares de *Petiveria alliacea* L. cultivados em meio contendo Pic 20,0 µM em regime de luz, após transferência para meio MS ½ suplementado com fitagel 0,2%, com 60 dias de cultura, em diferentes estádios de desenvolvimento..... 48

Figura 7 – Plantas originadas a partir de embriões somáticos obtidos de explantes foliares de *P.alliacea* L..... 49

Figura 8 – Produção de embriões somáticos por embriogênese secundária de *P. alliacea*, ao longo de 180 dias de cultura em meio MS ½ solidificado com fitagel 0,2%..... 49

Figura 9 – Início do processo degenerativo de embriões somáticos secundários de *P. alliacea* L. após 150 dias de cultura em fitagel 0,2%..... 49

Figura 10 – Formação de embriões somáticos sob a superfície de explantes foliares de *P. alliacea* L..... 51

Figura 11 – Seção transversal de explante foliar de *P. alliacea* L. mantidos em regime de luz..... 52

Figura 12 – Produção de biomassa de cultura de células em suspensão de *P. alliacea* em meio MS líquido isento de reguladores de crescimento (controle – MS0 a partir da cultura em PIC e MS0 a partir da cultura em 2,4-D) ou suplementado com reguladores de crescimento (PIC a 20,0 µM ou 2,4-D a 22,6 µM) após 180 dias de cultura mantidas no claro..... 54

Figura 13 – Células em suspensão de *P. alliacea* L. mantidas em meio MS suplementado com PIC a 20,0 µM ou 2,4-D a 22,6 µM após 120 dias de cultura..... 54

Figura 14 – Produção de biomassa de embriões somáticos obtidos a partir de explantes foliares de *P. alliacea* L. mantidos em meios líquidos MS0 e MS ½, após 60 dias de cultura..... 55

Figura 15 – Produção de biomassa de embriões somáticos e plantas provenientes de embriões somáticos obtidos a partir de explantes foliares de *P. alliacea* L. mantidos em meio líquido MS0, ao longo de 4 meses..... 55

Figura 16 – Embriões somáticos de *P. alliacea* mantidos em meio MS..... 56

Figura 17 – Produção de biomassa de culturas não morfogênicas de *P. alliacea* L. mantidas em meio MS líquido suplementado com PIC a 20,0 µM ou 2,4-D a 22,6 µM ou MS0 sem fitorreguladores, após 60 dias de cultura. 57

Figura 18 – Aclimatização de plantas obtidas *in vitro* a partir de embriões somáticos induzidos em PIC a 20,0 µM..... 58

Figura 19 – Plantas provenientes de embriões somáticos induzidos em PIC a 20,0 µM, 40 dias após aclimatização..... 60

Figura 20 – Perfil fitoquímico comparativo entre diferentes populações de *P. alliacea* L. mantidas *ex vitro*..... 61

Figura 21 – Perfil fitoquímico comparativo entre o padrão DTS, diferentes populações de *P. alliacea* L. mantidas *ex vitro* e estruturas obtidas de sistemas *in vitro*..... 62

Figura 22 – Cromatogramas obtidos por GC/MS referentes ao padrão de dibenzil trissulfeto e aos extratos etanólicos de diferentes sistemas de *P. alliacea* L. estabelecidos *in vitro*..... 64

Figura 23 – Cromatogramas de diferentes extratos de embriões somáticos de *Petiveria alliacea* L. obtidos por GC/MS..... 65

LISTA DE QUADRO E TABELAS

Quadro 1 – Levantamento etnobotânico da utilização medicinal de *P.alliacea* L. na América Latina..... 26

Tabela 1 – Resposta morfogênica de explantes foliares de *P. alliacea* L. após 120 dias sob diferentes condições de cultivo..... 44

Tabela 2 – Avaliação da influência de diferentes pré-tratamentos para aclimatização de plantas convertidas a partir de embriões somáticos de *P.alliacea* L., após 30 dias de permanência das plantas sem cobertura, no telado..... 59

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
AcOEt	Acetato de etila
CC	Calo compacto
CF	Calo friável
DCM	Diclorometano
DTS	dibenzil trissulfeto
ES	Embrião somático
GC-MS	(Gas chromatography – mass spectrometry) - Cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massas
MS	Meio de Cultura Murashige & Skoog
MS0	Meio MS sem adição de reguladores de crescimento
MS ½	MS com metade da concentração de sais, vitaminas e sacarose
PIC	Picloram (Ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico)
Rf	Fator de retenção
TDZ	Thidiazuron
TLC	(Thin-layer chromatography) - Cromatografia em camada delgada
TR	Tempo de retenção

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	17
1	**PLANTAS MEDICINAIS**	18
2	**METABOLISMO VEGETAL**	20
3	***PETIVERIA ALLIACEA* L.**	22
4	**CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS**	27
4.1	**Cultura de tecidos desdiferenciados**	28
4.2	**Embriogênese somática**	30
5	**ESTUDOS FITOQUÍMICOS**	34
6	**OBJETIVOS**	36
6.1	**Objetivo geral**	36
6.2	**Objetivos específicos**	36
7	**METODOLOGIA**	37
7.1	**Material Vegetal**	37
7.2	**Cultura de tecidos vegetais e embriogênese somática**	37
7.2.1	Análise histológica do processo regenerativo	38
7.2.2	Conversão de embriões somáticos	38
7.2.3	Cultura de células em suspensão	38
7.2.4	Aclimatização	39
7.3	**Análise fitoquímica**	40
7.3.1	Preparo dos extratos	40
7.3.2	Cromatografia em camada delgada (TLC)	41
7.3.3	Cromatografia com fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC/MS).	42
8	**RESULTADOS**	43
8.1	**Cultura de tecidos vegetais e embriogênese somática**	43
8.1.1	Conversão de embriões somáticos	47
8.1.2	Análise histológica do processo embriogênico	51
8.1.3	Cultura de células e embriões em suspensão	53
8.1.4	Aclimatização	58
8.2	**Análise fitoquímica**	60
8.2.1	Análise cromatográfica em camada delgada (TLC)	60
8.2.2	Cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS)	62
9	**DISCUSSÃO**	66

10 **CONCLUSÃO.**..... 76
11 **PERSPECTIVAS**..... 78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 79

INTRODUÇÃO

Ao longo de sua existência, o homem tem contado com a natureza para o suprimento de suas necessidades básicas como produção de alimentos, abrigo e medicamentos. Embora inúmeras propriedades terapêuticas atribuídas às plantas ainda não tenham comprovação científica, muitas terapias utilizando plantas medicinais baseiam-se em observações empíricas acumuladas ao longo dos anos (GURIB-FAKIM, 2006).

Produtos naturais e seus derivados representam mais de 50% de todas as drogas em uso clínico no mundo (GURIB-FAKIM, 2006). Mesmo com o grande desenvolvimento de novos processos biotecnológicos nos dias atuais, países industrializados prescrevem 25% de seus medicamentos a partir de substâncias originárias de plantas e, aproximadamente 120 substâncias de origem natural, obtidas a partir de cerca de 90 espécies de plantas, são utilizadas no tratamento de doenças. Estudos revelam que os produtos naturais são responsáveis pela produção de cerca de 44% dos produtos farmacêuticos atuais em países industrializados, sendo esta proporção ainda maior em países em desenvolvimento (CASTRO *et al*., 2001, CRAGG *et al*., 1997 *apud* HOSTETTAMANN, 2003).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), 80% da população mundial, principalmente em países em desenvolvimento, dependem de medicamentos provenientes de plantas para o cuidado da saúde. Na busca pela redução da mortalidade, a OMS recomenda a utilização de fitoterápicos já usados tradicionalmente, desde que comprovada sua eficácia e segurança (GURIB-FAKIM, 2006). Com a retomada pelo interesse na fitoterapia, em nível mundial, a venda de produtos fitoterápicos na última década girou em torno de 100 bilhões de dólares por ano, sendo a China e a Índia os países com maior adesão ao uso de produtos naturais no Oriente. Também, em países ocidentais, os fitoterápicos tornaram-se importantes, tendo destaque na Alemanha, onde 80% dos médicos prescrevem ervas como tratamento para diferentes tipos de doenças (GILANI; RAHMAN, 2005). Não apenas o consumo de produtos fitoterápicos, mas também a utilização de plantas medicinais *in natura* vem apresentando um crescimento considerável no comércio mundial.

1 **PLANTAS MEDICINAIS**

Segundo Castro e colaboradores (2001), uma planta é considerada medicinal quando produz substâncias biologicamente ativas, provenientes do metabolismo, em quantidade considerável, que poderão ser utilizadas como medicamentos, direta ou indiretamente. Para que sejam utilizadas em programas de fitoterapia, as espécies devem ser cientificamente validadas mediante a identificação de seus princípios ativos ou por evidências farmacológicas. Além disso, a escolha das formas corretas de preparo e administração de seus produtos deve ser destinada para uso ambulatorial, hospitalar ou caseiro, necessitando, contudo, de estudos farmacológicos pré-clínicos, avaliando-se a sua toxidez realizando-se posteriores ensaios clínicos (LORENZI; MATOS, 2008).

Apesar de a fitoterapia ser uma atividade bastante antiga e utilizada por diferentes civilizações, a sua origem como prática medicinal é um assunto ainda divergente entre os pesquisadores. Para alguns autores, os primeiros relatos do uso de plantas medicinais com fins terapêuticos remontam há aproximadamente 3000 anos a.C. (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006), enquanto outros autores consideram que os primeiros registros ocorreram na região da Mesopotâmia há cerca de 2600 anos a.C (GURIB-FAKIM, 2006). Historiadores de todo o mundo afirmam ter evidências de que os povos primitivos muitas vezes utilizavam ervas de forma sofisticada, como, por exemplo, cascas de *Cinchona*, planta da família Rubiaceae, rica em quinino, e utilizada para tratar os sintomas da malária, mesmo antes da doença ser identificada (GILANI; RAHMAN, 2005). O isolamento do quinino, o principal alcalóide encontrado nas cascas de *Cinchona*, ocorreu somente em 1820 (HOSTETTAMANN *et al*., 2003).

A extração de princípios ativos de plantas foi iniciada no século XIX com o isolamento da morfina, constituinte majoritário do ópio, a partir da *Papaver somniferum* L. (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006). Desde então, a ausência de comprovações científicas de eficácia das substâncias de origem vegetal, a produção de fármacos via síntese química e o crescimento do poder econômico das indústrias farmacêuticas impulsionaram a substituição de fármacos naturais por fármacos sintéticos (RATES, 2001, VICTÓRIO; LAGE, 2008). Fármacos sintéticos podem ser obtidos quando substâncias biologicamente ativas sofrem modificações moleculares servindo como modelo para a síntese de substâncias análogas mais potentes e com maior seletividade, obtidas com mais facilidade e em muitos casos, com custos mais baixos sendo, portanto, de grande interesse para a indústria farmacêutica (CASTRO *et al*., 2001).

A validação científica da eficácia e segurança do uso de plantas como *Panax sp.* (ginseng), *Zingiber officinale* (gengibre) e *Gingko biloba* L. (gingko), tem ocorrido nas últimas décadas levando a medicina alopática a aceitar o uso da fitoterapia no tratamento de muitas doenças. Extratos das folhas de *Gingko biloba* L. representam um dos fitoterápicos mais vendidos mundialmente, sendo indicado principalmente no tratamento de problemas relacionados à insuficiência de circulação cerebral e periférica (HOSTETTAMANN *et al*., 2003)

Os recursos vegetais de interesse para a indústria farmacêutica são representados por espécies produtoras de substâncias bioativas que possam ser isoladas ou produzidas quimicamente. Muitas substâncias bioativas, produtos do metabolismo secundário, são biologicamente ativas e podem desempenhar diversas atividades podendo ser utilizadas para prevenir ou curar doenças, pelas indústrias de cosméticos como aromatizantes, e pela indústria alimentícia como antioxidantes (TANIGUCHI *et al*., 2002) apresentando, desta forma, valor social e também econômico.

2 **METABOLISMO VEGETAL**

As substâncias produzidas pelos vegetais são didaticamente divididas em metabólitos essenciais e especiais. Metabólitos essenciais, também conhecidos como primários, são encontrados em todos os organismos e são vitais para o indivíduo (aminoácidos, nucleotídeos e açúcares). Metabólitos especiais, também conhecidos como secundários, diferem dos essenciais, pois possuem distribuição restrita entre os vegetais e não apresentam ação direta na constituição celular (SIMÕES *et al.*, 2003, TAIZ; ZEIGER, 2004). O conceito de metabólitos secundários pode ser atribuído a Kossel, que, em 1891, definiu tais substâncias com características diferentes dos metabólitos primários. Trinta anos depois, Czapek afirmara que estas substâncias poderiam ser derivados do metabolismo do nitrogênio através do que ele chamou de "modificações secundárias" como, por exemplo, a desaminação (CZAPEK *et al.* 1921 *apud* BOUGARD *et al.*, 2001).

Anteriormente, a importância destes metabólitos era desconhecida, sendo considerados resíduos ou sub-produtos do metabolismo primário ou essencial, conceito que prevaleceu até meados do século XX (COLLIN, 2001). Atualmente, o papel evolutivo destas substâncias na sobrevivência dos vegetais já está comprovado, pois estão envolvidas em relações ecológicas e biossintéticas, tais como defesa contra herbivoria e doenças, proteção contra os raios UV e atração de polinizadores (RAVEN *et al.*, 2007). Para os evolucionistas mutações herdadas e seleção natural colaboraram para o surgimento das defesas vegetais. Algumas rotas do metabolismo primário teriam sofrido mutações aleatórias levando ao surgimento de substâncias tóxicas capazes de repelir predadores e neutralizar microorganismos patogênicos. Esses metabólitos também estariam envolvidos em processos oxidativos, protegendo o metabolismo e as estruturas vegetais contra espécies reativas de oxigênio produzidas durante o processo fotossintético e cadeia respiratória, que podem deteriorar componentes celulares devido a quebras de cromossomos e alterações na estrutura de proteínas, polissacarídeos e ácidos graxos (CASTRO *et al*., 2001). A síntese destas substâncias representaria baixo custo metabólico, além de não serem tóxicas para as plantas que as produziram. Desta forma, diferentes espécies de plantas puderam se adaptar melhor deixando maior número de descendentes e transferindo suas características de defesa para as gerações seguintes (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Metabólitos secundários ou especiais estão classificados de acordo com as diferentes vias biossintéticas, havendo grande relação com as rotas responsáveis pela síntese de metabólitos primários que fornecem moléculas utilizadas como precursoras nas principais

rotas de síntese de metabólitos secundários. Essas rotas originam-se a partir do metabolismo da glicose, através de alguns intermediários principais. O ácido chiquímico, atua como precursor de vários compostos aromáticos e, o acetato, como precursor de ácidos graxos, além de vários aminoácidos que originam alcalóides e outros compostos nitrogenados (CASTRO *et al*., 2001, SIMÕES *et al.*, 2003).

Em muitas espécies, o local onde são sintetizados se restringe a um órgão específico, e os produtos são armazenados em toda planta ou em órgãos diferentes de onde foram sintetizados através de um sistema de transporte intercelular. Nas células, são armazenados em compartimentos específicos através de mecanismos bioquímicos. Metabólitos especiais mais hidrofílicos geralmente são armazenados em vacúolos, enquanto que os lipofílicos, acumulam-se em ductos de células mortas ou ligam-se a componentes celulares lipofílicos, como por exemplo, membranas e ceras cuticulares (WINK, 1990).

Somente na década de 1980, 121 substâncias de origem vegetal, provenientes de 95 espécies, foram identificadas. Até o final do século XX, 110.000 substâncias haviam sido identificadas e deste total 33.000 eram representados por terpenóides e 16.000 por alcalóides (NUNES, 2008). A separação e identificação dos constituintes vegetais são realizadas, principalmente, através de técnicas cromatográficas, que estão relacionadas com as propriedades de polaridade, solubilidade e volatilidade das substâncias a serem separadas. Nos últimos 20 anos tais técnicas têm se tornado cada vez mais acessíveis aumentando o número de substâncias isoladas (CASTRO *et al*., 2001).

Neste trabalho foi estudada a espécie *Petiveria alliacea* L., cuja diversidade metabólica pode explicar a utilização tradicional em diferentes condições patológicas, em toda a América latina.

3 *PETIVERIA ALLIACEA* L.

Petiveria alliacea L. (Figura 1) pertence à família Phytolaccacceae e caracteriza-se como uma espécie arbustiva, com aproximadamente, 1m de altura, sendo conhecida popularmente por diferentes nomes, entre os quais, “Guiné”, “Amansa-senhor”, “Erva-tipi”, “Erva-de-alho” ou “Mucuracaá”. Esta espécie nativa da floresta Amazônica possui ampla distribuição em diferentes países com clima tropical e semi-tropical na América do Sul, América Central e Continente Africano (KUBEC; MUSAH, 2001, OKADA *et al.,* 2008). Muitos são os relatos de seu emprego no uso popular como agente terapêutico em diferentes países, devido às suas diversas propriedades farmacológicas (Quadro 1). Infusões ou decocções de folhas são usadas para o tratamento da gripe, tosse, dores musculares e doenças dermatológicas. Já as raízes, são normalmente utilizadas para tratamentos de sinusites e reumatismos (XIMENES, 2008). O uso excessivo e inadequado da planta pode provocar irritação da mucosa gastrointestinal, cefaléia e tonturas, entre outros efeitos, mas em doses terapêuticas, não gera efeitos ulcerogênicos sobre a mucosa gástrica (RODRÍGUEZ *et al*., 2004).

Por apresentar certo grau de toxidez e propriedade sedativa, era utilizada pelos escravos, que misturavam as raízes pulverizadas ao alimento dos senhores, como retaliação pelos maus tratos sofridos (GOMES *et al.*, 2005). Segundo relatos, o envenenamento se dá de forma gradativa e, no período agudo, causa superexcitação, insônia e alucinação. No entanto, quando utilizada por um período contínuo, os sintomas se mostram opostos, tais como, prostração, pequenas convulsões, ausência da fala em conseqüência de paralisia da laringe e morte ao fim de um ano, dependendo da dose (PECKOL; GUSTAVO, 1900 *apud* GOMES, 2006).

Muitos pesquisadores têm enfatizado a importância de estudos fitoquímicos e farmacológicos em espécies tropicais devido à grande diversidade química observada nessas espécies. Biomas tropicais possuem fauna muito rica em número e variedade de organismos, consequentemente, ocorrem muitos predadores de plantas, direcionando a evolução vegetal para plantas com alta capacidade biossintética, o que permitiu a sobrevivência das espécies nesses ambientes (GOTTLIEB *et al*., 1996, BRITO; BRITO, 1993 *apud* SIMÕES *et al*., 2003).

O uso popular, tradicionalmente consolidado, tem despertado o interesse de pesquisadores para investigações farmacológicas, contribuindo para a descoberta de grande variedade de substâncias biologicamente ativas produzidas em diferentes partes da planta

(saponinas, alcalóides, flavonóides, sulfetos, taninos, cumarinas, entre outros) (FONTOURA *et al*., 2005). Para alguns autores, as substâncias presentes em extratos, variam em função das diferenças na preparação de amostras que acabam por resultar em mudanças significativas nas concentrações das substâncias (KIM *et al.*, 2006).

Pesquisas realizadas pelo Centro Nacional de Investigações Científicas de Cuba com extratos de *P. alliacea* revelaram a existência de oligoelementos com atuação importante sobre o sistema imunológico, entre os quais, selênio (Se) e zinco (Zn). O fornecimento de Se por meio da alimentação parece crucial para o organismo, mesmo em quantidades muito pequenas. Entretanto, o empobrecimento do solo devido ao cultivo excessivo e o uso demasiado de fertilizantes têm levado à diminuição do Se disponível nos alimentos. O Se está envolvido em importantes processos metabólicos e atua como antioxidante em nível celular. O Zn estimula as células em fase de replicação e determina a especialização de linfócitos, trazendo benefícios ao sistema imunológico (RODRÍGUEZ *et al*., 2004). O sistema imunológico pode ser estimulado, deprimido ou modulado por diferentes substâncias naturais ou produtos sintéticos e diferentes razões podem causar a depressão do sistema imune, desencadeando diversas enfermidades. As propriedades imunoestimulantes de *P. alliacea* têm sido atribuídas à presença de oligoelementos nos extratos estudados (FERRER, 2007).

De acordo com a literatura, a análise química da raiz dessa espécie tem revelado grande quantidade de derivados sulfurados com atividade antifúngica, antibacteriana, antioxidante e anticancerígena (KUBEC; MUSAH, 2005; OKADA *et al*., 2008). Diferentes polissulfetos encontrados no extrato de raízes causaram forte inibição da atividade de fungos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum* (BENEVIDES *et al.*, 2001). Em estudos realizados para verificar a eficácia contra *Trypanosoma cruzi,* o extrato em diclorometano da planta apresentou atividade anti tripanossômica em ambos os estágios, epimastigotas e tripomastigotas *in vitro*, mas não *in vivo* (CÁCERES *et al*., 1998). Os principais compostos imunomodulatórios produzidos por *P. alliacea* L. são lipofílicos (apolares) tendo destaque o dibenzil trissulfeto (DTS), sintetizado a partir do metabolismo da cisteína que gera benzil-sulfóxidos de cisteína, conhecidos como petiverinas, que ocorrem principalmente nas raízes desta espécie. Esses precursores, que ficam armazenados em plastos, após lesão tecidual, formam tiossulfinatos, que por sua vez originam vários polissulfetos, entre os quais o DTS (KUBEC *et al*., 2002).

O DTS apresenta importante atividade biológica, influenciando a imunomodulação, a fosforilação da MAP-quinase e tirosina quinase, e eventos celulares microtúbulo-dependentes.

A forma normal em que se encontram os microtúbulos da linhagem celular SH-SY5Y pode ser alterada pela interação com o DTS, sem afetar a dinâmica da actina, podendo levar a inibição da proliferação celular de neuroblastomas (ROSNER *et al*., 2001).

Além do DTS, diversos metabólitos de importância medicinal são encontrados em *P. alliacea* L. Entretanto, sua produção em plantas de campo se mostra insuficiente frente à demanda da indústria farmacêutica, sendo necessário o desenvolvimento de metodologias que aumentem o rendimento na produção destas substâncias *in vitro* (JOHNSON *et al*., 1997, WILLIAMS *et al*., 1997). Muitas vezes sistemas de produção agrícola convencionais apresentam baixos níveis de produtividade. A síntese em laboratório de muitas substâncias derivadas de plantas medicinais poderia solucionar esse problema. Entretanto, frequentemente tal processo se mostra bastante complexo, resultando em baixo rendimento e produção inviável do ponto de vista econômico, havendo a necessidade do estabelecimento de sistemas alternativos de produção (SIMÕES *et al*., 2003). O desenvolvimento de sistemas de cultura de células e tecidos vegetais visando à produção de substâncias químicas de alto valor foi impulsionado pela possibilidade de manipular as condições de cultura, podendo levar a um fluxo elevado de vias metabólicas (SUDHA; RAVISHANKAR, 2002). Nesse contexto, metodologias de cultura de tecidos vegetais têm sido desenvolvidas ao longo dos anos objetivando aumentar e modular os valores de produtividade de substâncias bioativas. Além disso, a produção biotecnológica vegetal pode aumentar significativamente a disponibilidade das plantas medicinais, em condições fitossanitárias adequadas e livres de interferências ambientais.

Figura 1 - Aspecto geral de *Petiveria alliacea* L.
Fonte: www.rain-tree.com

Quadro 1 – Levantamento etnobotânico da utilização medicinal de *P.alliacea* L. na América Latina.

País	Indicação terapêutica
Argentina	diarréia, febre, dor de cabeça, infecções do trato respiratório, reumatismo, inchaços, dor de dente, infecções urinárias
Brasil	abortífera, asma, artrite, câncer, diabetes, febre, dor de cabeça, inflamação, parasitas intestinais, malária, distúrbios menstruais, osteoartrite, dor, reumatismo, espasmos, dor de dente, insuficiência urinária
Colômbia	prevenção de cáries, picadas de cobra
Guatemala	dermatite, diarréia, erisipela, febre, dor de cabeça, micose, cólica, sinusite
México	furúnculos, parto, resfriados, epilepsia, febre, dor de cabeça, urticária, histeria, gripe, sistema nervosos, paralisia, espinhas, repelir insetos, reumatismo
Nicarágua	resfriado, tosse, problemas cardíacos, distúrbios renais, distúrbios pulmonares, distúrbios respiratórios, picada de cobra
Paraguai	abortos, doenças digestivas, febre, gripe, distúrbios menstruais, dores musculares, sinusite, dor de dente, inseticida
Porto Rico	aborto, parto, febre, problemas menstruais
Peru	resfriados, gripe
Venezuela	abortos, parasitas intestinais, problemas menstruais, espasmos

Fonte: TAYLOR, 2005

4 **CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS**

Nas últimas quatro décadas, as ciências biológicas avançaram consideravelmente através do desenvolvimento de novas técnicas biotecnológicas que permitiram o estudo de plantas em nível celular e molecular e, juntamente com métodos convencionais de melhoramento genético, têm encontrado soluções para muitos problemas relacionados à produção vegetal (SOUZA; JUNGHANS, 2006).

A cultura de tecidos vegetais engloba metodologias para o crescimento e multiplicação de células, tecidos ou órgãos isolados a partir de uma planta matriz e inoculados em meios artificiais. Consiste em estratégias de cultivo de plantas e células em condições controladas e baseia-se na totipotencialidade das células que responderão de acordo com as condições químicas e físicas impostas à cultura (TERMIGNONI, 2005). A totipotencialidade das células vegetais é uma característica apresentada principalmente por tecidos jovens e meristemáticos que são capazes de formar um indivíduo completo a partir de pequenos fragmentos de tecidos vegetais. Entretanto, tecidos maduros já diferenciados, também podem se rediferenciar após sofrerem desdiferenciação induzida por fitorreguladores adicionados aos meios de cultura.

Além da multiplicação meristemática, a regeneração de plantas em cultura de tecidos pode ocorrer através da formação de gemas adventícias, originadas em locais diferentes daquelas formadas no curso natural de desenvolvimento da planta. Esse processo caracteriza a organogênese e pode ocorrer de forma direta a partir das células do explante, ou indireta, quando a formação de gemas adventícias é precedida pela formação de uma massa de células após o processo de desdiferenciação das células do explante, que se multiplica desordenadamente. A massa de células em multiplicação é denominada calo. Plantas também podem ser obtidas através da embriogênese somática e, nesse processo, diferentes células somáticas se desdiderenciam e se rediferenciam originando embriões somáticos, direta ou indiretamente (TORRES *et al*., 1998).

Algumas características relacionadas à propagação *in vitro* são a utilização de pequenos propágulos (explantes); a necessidade de espaços reduzidos para manutenção das culturas e o maior controle de fatores que influenciam a regeneração vegetativa, como nutrientes, reguladores de crescimento, níveis de exposição à luz e temperatura. Além disso, a cultura facilita a seleção de genótipos com características economicamente desejáveis. No entanto, a possibilidade do surgimento de variantes somaclonais devem ser consideradas e minimizadas no estabelecimento da cultura (SOUZA; JUNGHANS, 2006).

A capacidade de regeneração a partir de células ou tecidos tem sido importante para a biotecnologia vegetal, pois cada célula contém a informação genética para todas as funções, inclusive a biossíntese de metabólitos secundários (SIMÕES *et al*., 2003). A produção *in vitro* de metabólitos especiais de interesse têm sido otimizada através do uso de técnicas de cultura de tecidos, pois tais substâncias podem ser sintetizadas em grande escala e continuamente, em condições pré-estabelecidas, independentemente de fatores ambientais. Normalmente, as substância provenientes do metabolismo especial de plantas mantidas *in vitro* se acumulam nas fases posteriores ao ciclo de crescimento, quando ocorre a diminuição do crescimento e o excesso de carboidratos e nitrogênio se direcionam para vias secundárias. Com base nesse processo, a acumulação de metabólitos pode ser aumentada ou reduzida, alterando-se a composição do meio de cultura, especialmente pela concentração e natureza do nitrogênio inorgânico e fosfato, fonte de carbono, reguladores de crescimento e pela fase da cultura em que estas mudanças são feitas (COLLIN, 2001)

A grande demanda da indústria farmacêutica pela descoberta de novos fármacos justifica a utilização de diferentes técnicas de cultura de tecidos em *P. alliacea* considerando-se que a produção de metabólitos secundários *ex vitro* pode ser influenciada, por exemplo, pelo tipo de tecido onde são produzidos (CASTELLAR, 2006). *P. alliacea* L. foi propagada *in vitro* anteriormente por meio da cultura de segmentos nodais (CASTELLAR *et al*., 2010) e os estudos comparativos entre as estruturas vegetais de plantas *in vitro* e *ex vitro* mostraram diferenças qualitativas e quantitativas nas substâncias voláteis e óleos essenciais. Esses resultados indicaram que a cultura *in vitro* influenciou a produção de metabólitos especiais, constituindo, portanto, uma ferramenta útil para a modulação de substâncias de interesse farmacológico (CASTELLAR, 2006).

4.1 **Cultura de tecidos desdiferenciados**

Denomina-se calogênese o processo pelo qual tecidos diferenciados, por indução de fitorreguladores, desdiferenciam-se e dividem-se desordenadamente originando uma estrutura denominada calo. Em cultura não organizada, sob estímulos hormonais endógenos ou ação de reguladores de crescimento adicionados ao meio, o metabolismo das células, que estavam em estado quiescente é modificado, e a divisão celular é ativada. Durante este processo, células diferenciadas e especializadas existentes na planta intacta podem ser revertidas a estágios desdiferenciados originando novos tecidos compostos por células não especializadas, semelhantes às células meristemáticas (GEORGE, 2008). Embora a calogênese seja definida

como a produção e multiplicação de células desdiferenciadas, um calo não deve ser considerado um sistema totalmente desorganizado, pois ao interagir com o meio de cultura o tecido formado apresentará gradientes nutricionais próprios (TERMIGNONI, 2005). Três estágios de desenvolvimento são observados nessas culturas: indução de divisão celular, perda da estrutura diferenciada e aceleração das divisões celulares. Posteriormente, eventos de diferenciação podem ocorrer em algumas células.

Culturas de calos geralmente são iniciadas através da inoculação de um explante em meio semi-sólido suplementado com auxinas em alta concentração, em combinação ou não com citocininas. Estas culturas variam quanto à competência e potencial morfogenético podendo apresentar diferentes respostas mediante técnicas e meios que freqüentemente induziriam a morfogênese. O tecido originado pode ser não morfogênico, embriogênico ou organogênico e, além disso, calos podem diferir quanto à aparência, cor e grau de compactação dependendo da origem e idade do tecido escolhido como explante. Pode-se iniciar culturas de calos com diferentes finalidades como, por exemplo, regeneração de plantas, cultura de células em suspensão ou produção de embriões somáticos (GEORGE, 2008).

Quanto ao grau de compactação, os calos podem ser classificados como friáveis ou compactos. Calos compactos possuem células densamente agregadas, enquanto calos friáveis apresentam células vagamente associadas entre si, separando-se facilmente quando manipulados. Explantes provenientes de algumas espécies vegetais ou tipos de células específicas não formam calos friáveis, tornando difícil iniciar suspensão de células. A friabilidade do calo pode muitas vezes ser melhorada através da manipulação dos componentes do meio ou por sucessivas repicagens (SLATER *et al*., 2008)

O estabelecimento de suspensões celulares se inicia com a transferência de tecido calogênico para meio líquido, geralmente objetivando a multiplicação de células vegetais ou a produção de substâncias que poderão ou não ser excretados para o meio (DE SOUZA *et al.*, 1998). Meios líquidos são essenciais para culturas de células em suspensão, principalmente em experimentos de nutrição, crescimento e diferenciação celular. A agitação também é essencial a essas culturas, pois a formação de agregados celulares e a sedimentação de células no fundo do recipiente são minimizadas. Além disso, a aeração do meio é aumentada facilitando a difusão gasosa para dentro e fora da célula. Desta maneira, a distribuição dos nutrientes fica mais uniforme, visto que toda a célula encontra-se em contato com o meio, o que também favorece a diluição de substâncias tóxicas excretadas (GEORGE, 2008).

Antigamente, acreditava-se que células não diferenciadas eram incapazes de produzir metabólitos secundários (VANISREE *et al*., 2004), porém, sabe-se hoje que diferentes substâncias têm sido produzidas *in vitro* por intermédio destas técnicas. Um grande esforço tem sido feito com o objetivo de se produzir medicamentos fitoterápicos a partir de plantas produtoras de substâncias com atividades biológicas que tenham sido acumuladas em culturas de células ou tecidos de plantas (SIMÕES *et al*., 2003). Culturas de calos, bem como culturas de células em suspensão, têm demonstrado enorme potencial para modulação da produção de metabólitos secundários constituindo, portanto, sistemas de cultura muito úteis a serem desenvolvidos com plantas medicinais (BOURGAUD *et al.,* 2001, JEONG *et al*., 2006, BALBUENA *et al.*, 2009).

Entretanto, culturas de células ou calos são mais propensos que outros sistemas, às alterações genéticas resultantes tanto do processo indireto de regeneração, quanto das pressões de seleção impostas à cultura (PATNAIK *et al*., 1999). Por essa razão, essas culturas são contra-indicadas para a estocagem e conservação de germoplasma vegetal por longos períodos. Todavia, algumas linhagens celulares com elevadas taxas de produção de metabólitos são utilizadas para a produção de substâncias bioativas, sendo indispensável o monitoramento da capacidade biossintética no sistema *in vitro* selecionado. Em *P. alliacea,* a cultura de células em suspensão foi iniciada anteriormente a partir de calos friáveis (CASTELLAR, 2006), havendo necessidade da otimização dos protocolos visando à avaliação do potencial de acumulação de metabólitos nesse sistema.

4.2 **Embriogênese somática**

Embriogênese somática é o processo pelo qual células somáticas diferenciam-se dando origem a embriões, sem a fusão de gametas (TORRES *et al*., 1998). A embriogênese somática constitui um exemplo da expressão da totipotencialidade dos tecidos vegetais e foi descrita pela primeira vez, independentemente, por Steward e colaboradores (1958) e Reinert (1959) em *Daucus carota* (cenoura). No final dos anos 70 já era relatada a ocorrência de embriogênese somática em 32 famílias, 81 gêneros e 132 espécies vegetais (GUERRA; NODARI, 2006).

Dentre as técnicas de micropropagação vegetal, a embriogênese somática destaca-se pela possibilidade de propagação clonal, em massa, de genótipos de elite, além da produção, em larga escala, de metabólitos vegetais de interesse para a indústria farmacêutica. A embriogênese somática ocorre naturalmente de forma limitada, no interior de óvulos ou em

folhas. No entanto, nos últimos 40 anos métodos *in vitro* foram descritos e aperfeiçoados, podendo ser aplicados em muitas espécies de plantas desde que a escolha do explante, o meio de cultura e as condições ambientais sejam adequados (VON ARNOLD, 2008).

Embriões somáticos apresentam características morfogênicas semelhantes a embriões zigóticos com estrutura bipolar composta de ápice caulinar e radicular, além de apresentarem também os mesmos estádios de desenvolvimento: globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar. No entanto, diferem dos embriões zigóticos em alguns aspectos: não possuem tecido suspensor e endosperma, não formam tegumento, não entram em dormência e estão livres de correlações fisiológicas e físicas com o tecido que lhes deu origem (ZIMMERMANN, 1993). Embriões somáticos podem se originar através de duas vias: diretamente da superfície do explante, sem a passagem pela fase de calo ou a partir de células do calo em diferentes estádios de diferenciação (CARVALHO *et al*., 2006).

A embriogênese somática pode ter origem unicelular ou pluricelular. Quando a origem se dá através de uma única célula, são observadas divisões celulares coordenadas e muitas vezes o embrião está conectado a célula que lhe deu origem por meio de uma estrutura semelhante ao suspensor presente em embriões zigóticos. Por outro lado, quando ocorre a origem pluricelular, o processo é observado inicialmente com a formação de protuberâncias, sem divisões celulares coordenadas e formação dos embriões em contato com a área basal fundidos diretamente às células que lhe deram origem (Figura 2). Em ambas vias, direta ou indireta, podem ser obervadas a formação de embriões através das origens uni e pluricelular. Normalmente, células embriogênicas apresentam características comuns a células meristemáticas, tais como alta taxa de divisão, forma isodiamétricas e tamanhos pequenos, citoplasma denso com vários grãos de amido, núcleos grandes e proeminentes, vacúolos pequenos e parede celular espessa (NONOHAY *et al*., 1999, QUIROZ-FIGUEROA *et al*., 2006).

O genótipo da planta é o principal fator na definição do potencial para a embriogênese somática e o processo pelo qual as células somáticas adquirem competência embriogênica está relacionado à reprogramação e a expressão de genes em resposta às condições de estresse *in vitro* (FEHÉR, 2005). O estresse causado pelas condições de cultura pode resultar em uma reorganização da cromatina nas células, levando à liberação de programas embriogênicos normalmente reprimidos por mecanismos de silenciamento de genes (FEHÉR *et al*., 2002). Nos últimos anos, avanços foram alcançados na identificação de genes específicos envolvidos em diferentes etapas relacionadas à embriogênese somática, entre os quais, *WUS*, *LEC1*

(transição das células somáticas para o estado embriogênico) e *FUS3, ABI3* (maturação do embrião somático) (PHILLIPS, 2004).

As condições para promover a embriogênese somática *in vitro* estão relacionadas com estresses osmóticos, alterações de pH, choques térmicos e tratamentos com diferentes substâncias, principalmente reguladores de crescimento (GUERRA *et al*., 1999; JUNAID *et al*., 2006), sendo as auxinas geralmente utilizadas na indução do processo (FEHÉR *et al*., 2003). O metabolismo secundário e a morfologia da planta podem ser alterados pela adição de reguladores de crescimento exógenos adicionados aos meios de cultura (VON ADERKAS *et al*., 2002). Segundo Guerra e colaboradores (1999) a embriogênese somática é induzida quando células responsivas contendo receptores para determinado regulador de crescimento são ativadas, originando células-mãe embrionárias competentes, capazes de gerar populações clonais de células embriogenéticas. O número e a afinidade dos receptores no tecido vegetal, assim como o nível de outras substâncias endógenas podem alterar a resposta a determinado hormônio (FIRN, 1986). O ajuste das condições fornecidas na fase de indução, amadurecimento e germinação é fundamental para a sobrevivência e desenvolvimento de plantas provenientes de culturas embriogênicas. Em muitos sistemas, verificou-se que a indução da embriogênese somática pode ser otimizada fornecendo uma fonte de nitrogênio reduzido, tais como aminoácidos específicos ou caseína hidrolisada (SLATER *et al*., 2008).

Embriões somáticos primários podem iniciar um processo de embriogênese repetitiva, dando origem a um número ilimitado de embriões secundários gerados de forma cíclica a partir de uma única cultura de embriões primários. A embriogênese repetitiva assemelha-se a poliembrionia, fenômeno natural caracterizado pela multiplicação de embriões na mesma semente, bastante comum em várias espécies vegetais incluindo gimnospermas e monocotiledôneas de clima temperado e tropical (COUSIN; NELSON, 2009). Se comparado ao processo de embriogênese primária, pode ser vantajosa por apresentar uma alta taxa multiplicativa, além da independência de uma nova fonte de explante para iniciar a cultura (KARAMI *et al*., 2007).

Embora plantas possam ser regeneradas a partir de embriões somáticos, a taxa de conversão a plantas tende a ser insuficiente para uma produção clonal em larga escala. Em muitos sistemas vegetais a germinação de embriões somáticos e a conversão de plantas são relativamente baixas. A baixa qualidade dos embriões e a intolerância à dessecação são algumas das razões que podem prejudicar a taxa de conversão a plantas nestes sistemas (JUNAID *et al*., 2006). O conhecimento dos fatores críticos que interferem durante o processo de obtenção de plântulas normais têm grande importância na propagação em massa por meio

da embriogênese somática. No entanto, embriões somáticos produzidos a partir de muitas plantas medicinais podem ser considerados como sistemas modelo quando a conversão é dispensável e o objetivo é a extração de metabólitos vegetais de interesse, muitas vezes produzidos em quantidades superiores quando comparados ao material vegetal intacto (FUZELE; SATDIVE, 2003, HIRAOKA *et al.*, 2001, SZYPULA *et al.*, 2005, SHOHAEL *et al.*, 2006, SHOHAEL *et al.*, 2007, ASLAM *et al*., 2009). O isolamento de substâncias produzidas por métodos biotecnológicos pode se feito através de metodologias de análise fitoquímica tradicionalmente utilizadas na pesquisa e na indústria, sendo importante a fundamentação básica para a compreensão de todo o processo de produção.

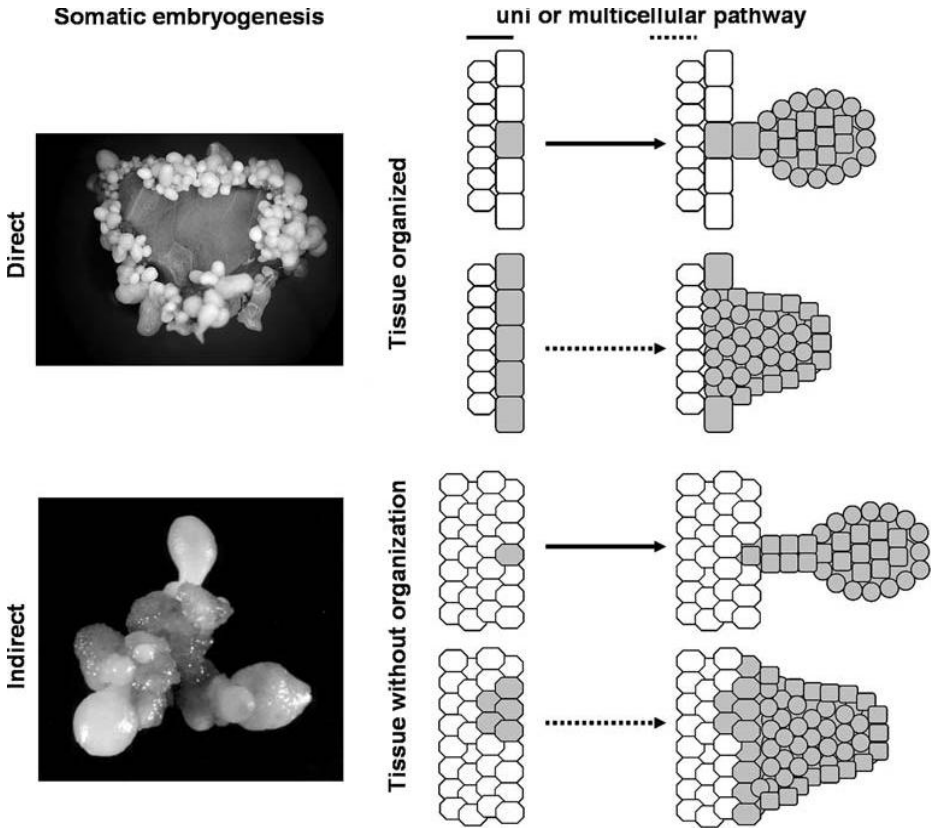

Figura 2 - Esquema da origem unicelular e pluricelular em embriões somáticos.
Fonte: Quiroz-Figueroa *et al*., 2006

5 **ESTUDOS FITOQUÍMICOS**

Os métodos cromatográficos são os procedimentos de separação e isolamento mais amplamente utilizados atualmente, e têm se mostrado uma importante ferramenta na investigação de substâncias com interesse farmacológico. A cromatografia é um método físico-químico de separação e está fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que é possível devido a diferentes interações, entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária. Quando o objetivo é o isolamento de substâncias, é dita cromatografia preparativa. Quando o objetivo é a identificação e análise das misturas e de substâncias isoladas, é chamada de cromatografia analítica. A fase estacionária pode apresentar-se empacotada em coluna (aberta ou fechada) ou se apresentar em uma superfície plana, como, por exemplo, cromatografia em papel ou cromatografia em camada delgada (SIMÕES *et al*., 2003).

A cromatografia em camada delgada (TLC) é uma técnica analítica bastante utilizada tanto para análise em extratos brutos quanto para avaliar o resultado de um processo de separação. Os extratos são caracterizados preliminarmente através do perfil cromatográfico qualitativo, onde se registra o número, a cor e a posição de manchas na placa através do cálculo de seu fator de retenção (Rf) após a análise em sistemas diferentes de eluentes, associados a reveladores específicos (RODRIGUES *et al*., 2009). Tais avaliações permitem determinar as classes de substâncias presentes nos extratos. Na cromatografia em camada delgada, o Rf ocorre devido à relação entre a fase fixa empregada (tipo de suporte) e a fase móvel (eluente). Ele é definido como a razão entre a distância percorrida pela mancha do componente e a distância percorrida pelo eluente. Diferentes placas cromatográficas podem ser encontradas comercialmente de forma padronizada possibilitando resultados bastante reprodutíveis. O procedimento para cromatografia em camada delgada é realizado utilizando uma cuba fechada, previamente saturada com a fase móvel. As amostras de soluções relativamente concentradas são aplicadas nas cromatoplacas com o auxílio de capilares, mantendo-se certa distância das bordas inferior e superior (SIMÕES *et al*., 2003).

A cromatografia com fase gasosa (GC) é utilizada para a separação de substâncias a partir de misturas de substâncias voláteis. A fase móvel é um gás inerte, normalmente Nitrogênio, Hélio ou Hidrogênio e a fase estacionária é uma camada microscópica de líquido ou polímero sobre um sólido inerte, dentro de uma peça tubular de vidro ou metal, chamada coluna. As substâncias gasosas interagem com as paredes da coluna, as quais são revestidas com diferentes fases estacionárias. Com isso, cada substância é eluída a um tempo diferente,

conhecido como tempo de retenção. A comparação de tempos de retenção é o que fornece a CG sua eficiência analítica. Este tipo de cromatografia pode ser acoplado a um sistema de espectrometria de massa (GC/MS), que além de permitir a separação de componentes como na cromatografia com fase gasosa, fornece o espectro de massas de cada pico presente no cromatograma. O espectro de massas indica a massa molecular da substância e o padrão de fragmentação. O padrão de fragmentação pode ser comparado ao da biblioteca de espectros acoplada ao sistema. Em poucos segundos, o espectro da amostra pode ser comparado aos espectros das amostras armazenadas na biblioteca. A partir de então, o computador apresenta um ou mais espectros que são organizados em ordem decrescente de acordo com a compatibilidade do espectro da substância analisada. A GC/MS é bastante útil na separação e identificação de estruturas como substâncias presentes em óleos voláteis, fornecendo excelentes resultados tanto qualitativos quanto quantitativos.

6 **OBJETIVOS**

6.1 **Objetivo Geral**

Otimizar a cultura de novas linhagens de calos e células em suspensão e estabelecer cultura de embriões somáticos, a partir de plantas de *P.alliacea* L. mantidas *in vitro*, monitorando a capacidade biossintética das culturas.

6.2 **Objetivos específicos**

- Estabelecer e caracterizar o processo de embriogênese somática;
- Analisar histologicamente os processos regenerativos;
- Analisar a composição química predominante, em diferentes estruturas obtidas *in vitro*;
- Monitorar e comparar a produção de DTS em diferentes tecidos vegetais produzidos em cultura.

7 **METODOLOGIA**

7.1 **Material Vegetal**

Para a indução das culturas de calos foram utilizados explantes foliares de plantas mantidas *in vitro* por 05 anos (CASTELLAR, 2006). Essas plantas se originaram de matrizes cedidas pela Dra Aparecida Cristina Moura (Departamento de Biologia Celular da Universidade do Estado do Rio de Janeiro). A identificação taxonômica como *P. alliacea* L. foi realizada pelo Dr. Alexandre Gabriel Christo (Jardim Botânico do Rio de Janeiro). Um exemplar foi depositado no Herbário da Universidade do Estado do Rio de Janeiro sob o registro HRJ 10.371). Para comparação com plantas de campo nos ensaios cromatográficos, foram utilizados exemplares da mesma espécie, mantidos há dois anos no telado do Núcleo de Biotecnologia Vegetal, originários de diferentes localidades do Rio de Janeiro, assim como exemplares obtidos no Horto Botânico da UERJ. Exemplares-tipo de todas as regiões estão depositados no Herbário de Rio de Janeiro (Magé - HRJ 11.131, Niterói - HRJ 11.710, Mal. Hermes - HRJ 11.711 e Vila Isabel - HRJ 11.618).

7.2 **Cultura de tecidos vegetais e embriogênese somática**

Segmentos foliares com aproximadamente 1,0 cm^2 de plantas mantidas *in vitro*, foram utilizados como fontes de explante e inoculados em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com diferentes reguladores de crescimento: Thidiazuron (TDZ) (2,2; 4,5; 13,6 e 22,7 µM); Zeatina (2,2; 4,5; 13,6 e 22,8 µM); Picloram (PIC) (2,0; 4,0; 12,4 e 20,0 µM) ou ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (2,2; 4,5; 13,5 e 22,6 µM). Em cada frasco de cultura (6cm x 8cm) contendo 30 mL de meio, foram inoculados 3 explantes com a superfície abaxial em contato com o meio de cultura, totalizando 06 explantes por tratamento, num total de 2 vidros para cada tratamento. O pH dos meios foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem (121ºC por 15 min) e o agente solidificante utilizado foi ágar a 0,7% (Merck). As culturas foram mantidas totalmente no escuro ou sob fotoperíodo de 16h e intensidade luminosa média de 46$\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$, fornecida por lâmpadas fluorescentes do tipo branca fria à temperatura de 30°C±2°C. Foram realizadas subculturas mensais para meios de igual composição durante seis meses.

7.2.1 Análise histológica do processo regenerativo

Explantes foliares mantidos em PIC a 20,0 µM ou 2,4-D a 22,6 µM sob fotoperíodo de 16h após 35 e 90 dias de cultura foram fixados em solução de glutaraldeido 2,5% e para-formaldeido 4% em tampão fosfato 50 mM (pH 7,2) e armazenado a 4º C. As peças fixadas com 35 dias de cultura foram desidratadas em etanol, incluídas em resina glicol-metacrilato (FEDER; O'BRIEN, 1968) e seccionadas em micrótomo rotativo, a uma espessura média de 5 µm. Para as análises de microscopia em campo claro, as seções histológicas foram coradas por Azul de Toluidina O (JOHANSEN, 1940) e montadas lâminas permanentes em Entellan. As peças fixadas com 90 dias de cultura foram submetidas à desidratação em série etílica ascendente, infiltradas e incluídas em parafina (SASS, 1958). Este material foi seccionado em micrótomo rotativo, a uma espessura de 11 µm. Posteriormente, o material foi submetido à coloração por fucsina básica e azul de astra (ROESER, 1972) e foram montadas lâminas permanentes em Entellan. As análises por microscopia foram realizadas em microscópio Olympus BX41-BF-I-20, e as imagens, obtidas com câmera de vídeo Q Collor R3 e software Image-Pro Express 6.0.

7.2.2 Conversão de embriões somáticos

Estruturas globulares sugestivas de embriões somáticos obtidas a partir de explantes foliares mantidos em PIC a 20,0 µM ou 2,4-D a 22,6 µM após 90 dias de cultura foram inoculadas em meio MS suplementado com a metade das concentrações de sais, vitaminas e sacarose (MS ½), solidificado com 0,2% de fitagel e pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem (121ºC por 15 min). Em cada frasco de cultura (3,5cm x 5,4cm) contendo 20 mL de meio, foram inoculadas 30 estruturas globulares e realizadas subculturas a cada 30 dias para meios de igual composição durante 150 dias.

7.2.3 Cultura de células em suspensão

O protocolo já descrito para indução de cultura de células em suspensão de *P. alliacea* (CASTELLAR, 2006) foi modificado e utilizado para iniciar a cultura em suspensão. Neste experimento, foram utilizadas as células oriundas de processos calogênicos obtidos em explantes foliares mantidos em PIC a 20,0 µM ou 2,4-D a 22,6 µM. Foram utilizados 3g da massa calogênica formada após 07 meses de cultura. As células de ambas as culturas foram

inoculadas em 30 mL de meio MS líquido isento de reguladores de crescimento (controle) ou em meio líquido suplementado com PIC a 20,0 µM ou 2,4-D a 22,6 µM em erlenmeyer de 125 mL. O experimento foi realizado utilizando três amostras, com duas repetições e as culturas mantidas em agitador rotatório a 100 rpm, a 28 ± 2°C sob fotoperíodo de 16h. As subculturas foram realizadas em intervalos de 60 dias, quando a massa total obtida em cada condição, após filtração a vácuo, foi avaliada através do peso fresco das células, sendo pesada e transferida para meios de igual composição. As culturas foram avaliadas durante 06 meses. Em um segundo experimento, o material obtido a partir dos explantes foliares foi dividido em duas linhagens celulares (embriogênica e não embriogênica). A linhagem não embriogênica foi inoculada em meios com a mesma composição utilizada anteriormente para a massa calogênica, e, a linhagem embriogênica, inoculada em meio MS ou MS ½. Foram utilizados erlenmeyer de 50 mL contendo 1g do material para 10 ml de meio. Subculturas com intervalos de 20 dias foram feitas para 30 ml de meio devido ao grande aumento de volume celular observado na cultura embriogênica. Em cada experimento foram utilizadas três amostras, com duas repetições e avaliação durante 60 dias.

Para verificar se o aumento do volume celular da linhagem embriogênica foi proveniente do aumento no número de embriões somáticos inoculados em meio líquido ou devido à conversão de embriões em plantas, um novo experimento foi realizado no qual 20 embriões somáticos foram inoculados em 30 mL de meio MS0 líquido em erlenmeyer de 50 mL. Foram realizadas subculturas a cada 40 dias e os embriões somáticos e plantas convertidas a partir de embriões somáticos foram quantificados. O experimento foi realizado em duplicata, com amostras do mesmo tamanho do experimento anterior e avaliado durante 120 dias. As culturas foram mantidas sob agitação de 100 rpm a 28 ± 2°C sob fotoperíodo de 16h.

7.2.4 Aclimatização

Plantas completas obtidas *in vitro* foram aclimatizadas utilizando três metodologias (CANTELMO, 2010) a fim de verificar a melhor condição de adaptação da planta *in vitro* ao ambiente *ex vitro*. Foram utilizadas 11 plantas para cada tratamento sendo o experimento repetido duas vezes.

As raízes das plantas foram lavadas em água corrente e separadas em três grupos submetidos aos tratamentos descritos a seguir: no primeiro tratamento, as amostras foram transferidas para vasos com capacidade para 300 mL contendo substrato Top Garden

Floreira® com pH 5,5 e mantidas diretamente em telado. No segundo tratamento, após a lavagem das raízes para retirada completa do meio de cultura, as amostras foram transferidas para vasos com mesma capacidade e contendo o mesmo substrato citado anteriormente. Campânulas confeccionadas com garrafas plásticas de refrigerantes foram utilizadas para manter a umidade relativa alta. As campânulas foram perfuradas e os furos recobertos com fita adesiva e ao longo de 10 dias os furos foram reabertos gradativamente. Após este período houve a retirada completa da cobertura. No terceiro tratamento, amostras foram mantidas em frasco de cultura (6cm x 8cm) contendo água filtrada, vedado com filme plástico, com o objetivo de manter a umidade relativa do ar alta dentro do frasco. As plantas foram mantidas sob fotoperíodo de 16h e intensidade luminosa média de 46$\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$, fornecida por lâmpadas fluorescentes do tipo branca fria à temperatura de 30°C ± 2°C por 10 dias, e, a cada dia, foram feitos três furos no filme plástico até a retirada total da vedação. Após 10 dias, as plantas foram transferidas para vasos contendo substrato Top Garden Floreira® e mantidas em telado por 30 dias. Para avaliação da adaptação das plantas submetidas aos três tratamentos, ao ambiente externo, a altura da planta, número de nós, comprimento e largura da folha foram mensurados após 30 dias de permanência das plantas sem cobertura, no telado.

A eficiência do processo de aclimatização de plantas obtidas em cultura foi avaliado após a aplicação do teste t de Student utilizando o programa Graph-Pad Instat sendo considerados significativos os valores com $p<0,05$.

7.3 **Análise fitoquímica**

7.3.1 Preparo dos extratos

A metodologia descrita abaixo foi realizada de acordo com o protocolo convencional do Laboratório de Bioquímica da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), coordenado pela Prof.ª Marsen Garcia Pinto Coelho.

Para o preparo do extrato etanólico visando à análise por cromatografia em camada delgada (TLC), foram utilizadas células calogênicas, embriões somáticos, folhas e raízes de plantas convertidas a partir de embriões somáticos cultivados *in vitro*, além de folhas de plantas provenientes de populações obtidas de 04 localidades diferentes (Vila Isabel, Niterói, Magé e Marechal Hermes) mantidas em telado por 02 anos. Diferentes populações de P. *alliacea* foram utilizadas, objetivando pesquisar substâncias majoritárias que definissem um padrão para comparação com as culturas *in vitro*.

As amostras compostas de material fresco foram levemente rasuradas com o auxílio de almofariz e pistilo de porcelana e em seguida imersas em álcool etílico P.A. (Vetec), respectivamente nas seguintes proporções em g/ml: (1:10), (1:10), (1:40), (1:10) e (1:40) sendo, a seguir, submetidas a ultrassom por 10 minutos. As amostras foram mantidas em álcool etílico P.A. durante 12 dias, sendo após este período, filtradas em papel de filtro (Whatman nº 1) e congeladas. O sobrenadante de todas as amostras foi novamente imerso em álcool etílico nas mesmas proporções anteriores e mantido por mais 07 dias, sendo também filtrado e congelado. Posteriormente, os extratos foram concentrados em evaporador rotatório a vácuo e imersos em banho com leve aquecimento (até 37°C), dando origem aos extratos etanólicos.

Extratos de calos, embriões somáticos, folhas e raízes de plantas convertidas a partir de embriões somáticos, foram preparados utilizando etanol, hexano, diclorometano ou acetato de etila (Tedia Brazil) a fim de pesquisar a presença de DTS nos diferentes sistemas através da análise por cromatografia com fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC/MS). Foi utilizado tanto material fresco quanto seco. Para a obtenção de amostras secas, o material foi dessecado em estufa a 45ºC por 24h. Tanto o material fresco quanto o seco foi pesado e levemente rasurado em grau de porcelana. Em seguida, as amostras foram imersas nos diferentes solventes citados anteriormente na proporção de 1:5 a 1:10 em g/ml, submetidas a ultrassom por 10 minutos e mantidas em temperatura ambiente. Após cinco dias, as amostras foram centrifugadas por 10 min e posteriormente filtradas em membrana de politetrafluoroeteno (PTFE) 0,2 µm CRS (Chromatrography Research Supplies, Inc., EUA) sendo o filtrado evaporado à temperatura ambiente e as amostras mantidas no escuro até a utilização.

7.3.2 Cromatografia em camada delgada (TLC)

O protocolo para avaliação dos extratos por TLC foi estabelecido por Castellar (2006), através do qual o sistema de solventes para eluição dos extratos de *P. alliacea* por cromatografia em camada fina foi determinado. Os extratos etanólicos foram diluídos em 0,5 mL de metanol e aplicados em cromatoplacas de sílica de 250 µM (Whatman) (10 x 10 cm), com indicador de fluorescência UV de 254 nm. Além dos extratos etanólicos, um padrão de dibenzil trissulfeto (DTS) obtido comercialmente (Sigma-Aldrich Chemical Co. - Milwaukee, WI, USA), foi utilizado para a análise, sendo também diluído em 0,5 mL de metanol e mantidas as mesmas condições da cromatografia realizada com os extratos etanólicos. As

amostras foram aplicadas nas cromatoplacas com o auxílio de capilares a uma distância de 1cm das margens inferior e laterais, marcadas a lápis. Os sistemas de eluição utilizados foram o acetato de etila:acetona:água (25:8:2) e acetato de etila (AcOEt) (100). A corrida cromatográfica foi desenvolvida em cuba de vidro previamente saturada com os eluentes. Ao final da eluição, as cromatoplacas foram secas à temperatura ambiente, observadas sob luz UV, borrifadas com ácido sulfúrico e reveladas com aquecimento em placa aquecedora durante 5 minutos, à temperatura de 60ºC. Os procedimentos de aspersão e aquecimento foram realizados em capela.

7.3.3 Cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS)

Os extratos do material produzido nas culturas foram utilizados para a pesquisa e quantificação de DTS. As amostras foram solubilizadas em 1 mL de etanol para a injeção no cromatógrafo (1µL). A presença de dibenzil trissulfeto nas amostras foi determinada por comparação com o tempo de retenção de DTS comercial (Sigma-Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI, USA) da curva padrão.

Os componentes voláteis foram submetidos à análise em cromatógrafo por fase gasosa acoplado a um espectrômetro de massas GC/MS-QP2010 (Shimadzu, Japão), equipado com coluna capilar Restek (RTX-5MS 30 m x 0, 25 mm d.i. e 0,25 µm de espessura de filme - Restek, USA). A programação inicial foi de 80ºc, aumentando 10ºc por minuto até 300ºc. Empregou-se como gás de arraste o Hélio com vazão constante de 1,55 mL min^{-1}, injeção em modo split de 1:10 a 230ºC. A quantificação relativa dos componentes foi determinada por detector de impacto eletrônico calibrado a 0,70 kVa com temperatura de 300ºC, modo TIC de aquisição com scan de 0,50 segundos de 40 a 600 m/z.

.

8 **RESULTADOS**

8.1 **Cultura de tecidos vegetais e embriogênese somática**

Confirmando resultados preliminares (CANTELMO, 2010), os segmentos foliares inoculados em diferentes concentrações de PIC, 2,4-D, Zeatina ou TDZ apresentaram respostas variadas após 120 dias dependendo das condições de cultura. Além disso, não foi possível estabelecer a influência da luz com os resultados obtidos devido à grande amplitude de respostas observadas (Tabela 1).

Em relação à influência do tipo e concentração de fitorreguladores no meio, observou-se que segmentos foliares cultivados em presença de Zeatina tornaram-se cloróticos e não apresentaram resposta de regeneração até 120 dias de cultura. Por outro lado, explantes cultivados em presença de TDZ apresentaram baixa freqüência de calos friáveis não morfogênicos (33%) (Figura 3A) e calos compactos com coloração esbranquiçada e bastante aderido à superfície do explante. Segmentos foliares mantidos em 2,4-D apresentaram morfogênese com formação direta de raízes, além da formação de calos friáveis que apresentaram oxidação ao longo das subculturas (Figura 3B). Explantes foliares mantidos em PIC a 20,0 µM ou 2,4-D a 22,6 µM, após 60 dias, no escuro e sob fotoperíodo de 16h apresentaram estruturas globulares, identificadas como embriões somáticos, com freqüência de 100% (Figura 4) diretamente na superfície do explante (Figura 5A e B).

Após 120 dias de cultura foi observada a formação adicional de um calo não morfogênico, aparentemente se originando dos embriões somáticos já formados em 2,4-D a 22,6 µM ou PIC a 20,0 µM (Figura 5C). Esse calo, amarelado e friável (Figura 5D), apresentou crescimento rápido no explante de origem confundindo-se com a massa embriogênica formada anteriormente, porém o crescimento foi diminuindo quando o material foi isolado. A partir desse material foram estabelecidas duas linhagens de células (embriogênicas e não embriogênicas) provenientes da cultura suplementada com PIC ou 2,4D que foram utilizadas para iniciar a cultura em suspensão.

Tabela 1 - Resposta morfogênica de explantes foliares de *P. alliacea* L. após 120 dias sob diferentes condições de cultivo.

Tipo de Fitorregulador	**Concentração µM**	**Luz**	**Freq. de regeneração (%)**	**Escuro**	**Freq. de regeneração (%)**
Zeatina	2,2	Clorose	0	Clorose	0
	4,5	Clorose	0	Clorose	0
	13,6	Clorose	0	Clorose	0
	22,8	Clorose	0	Clorose	0
TDZ	2,2	Clorose	0	CC	66
	4,5	Clorose	0	CF	33
	13,6	CC	33	Clorose	0
	22,7	CF	33	CC	33
PIC	2,0	ES	100	Clorose	100
		CC	100		
	4,0	ES	100	ES	100
		CC	100		
	12,4	ES	100	ES	100
		CC	100		
	20,0	ES	100	ES	100
		CF	100	CF	100
2,4-D	2,2	ES	100	CC	100
		Pilosidade	33	Pilosidade	33
		CF	100	Rizogênese	66
	4,5	ES	100	ES	66
		CF	100	Rizogênese	66
				Pilosidade	66
	13,5	ES	100	ES	66
		CF	100	CC	
		Rizogênese	33	Pilosidade	100
					33
	22,6	ES	100	ES	100
		CF	100	CF	100

Legenda: CC- Calo compacto; CF- calo friável; ES- embriões somáticos

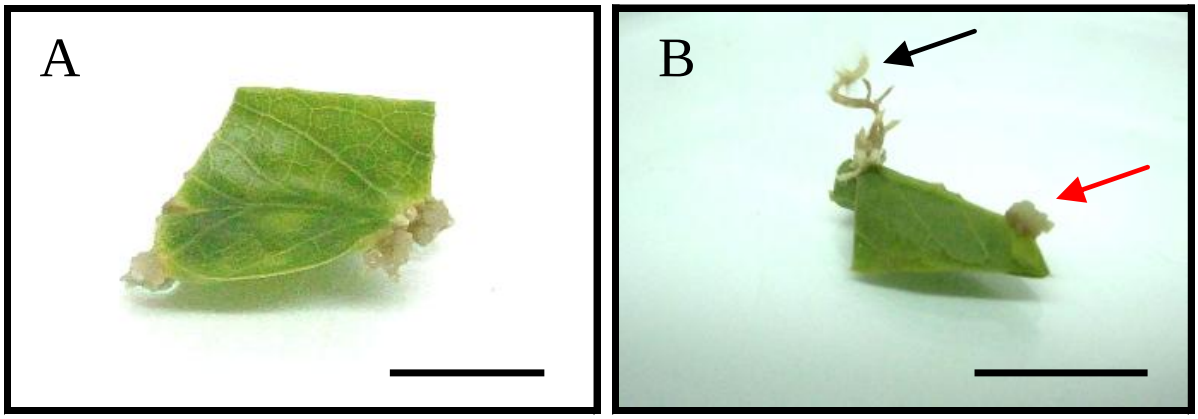

Figura 3 - Morfogênese *in vitro* em explantes foliares de *P. alliacea* L. cultivados na presença de luz.
Legenda: A) Formação de calo friável (seta preta) em presença de TDZ a 22,7 µM após 30 dias de cultura. B) Rizogênese direta (seta preta) e calogênese (seta vermelha) em meio suplementado com 2,4-D a 13,5 µM após 60 dias de cultura. Barra=1cm.

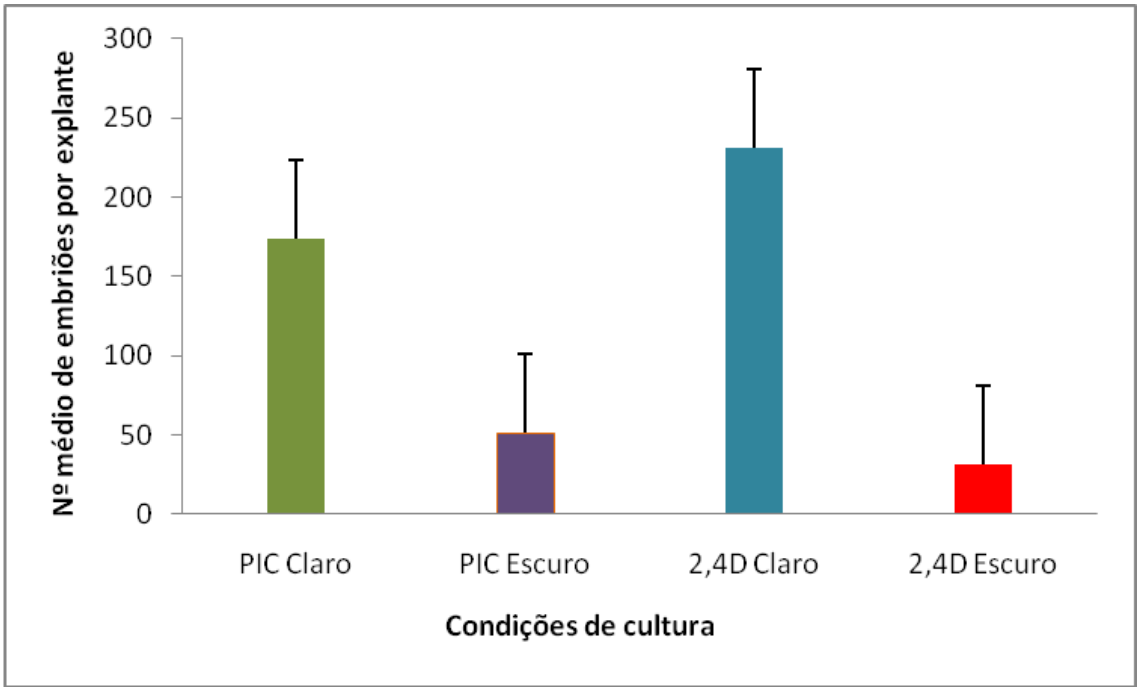

Figura 4 - Número médio de embriões por explante via embriogênese primária em explantes foliares de *P. alliacea* L. mantidos sob diferentes condições em meio MS suplementado com PIC 20,0 µM ou 2,4-D 22,6 µM após 120 dias de cultura.

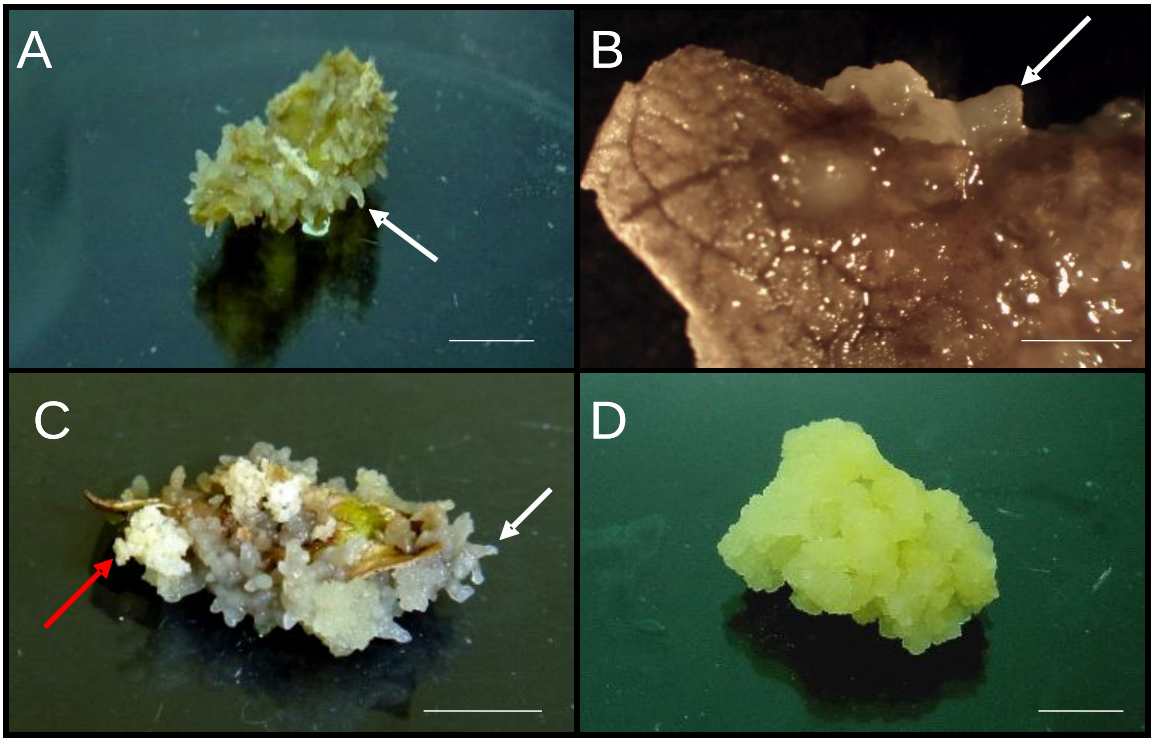

Figura 5: Resposta embriogênica em explantes foliares de *P. alliacea* L. em presença de luz. Legenda: A) Embriogênese somática direta (seta branca) em meio suplementado com 2,4-D a 22,6 µM após 90 dias de cultura. B**)** Formação de embriões somáticos (seta branca) em explantes foliares de *P. alliacea* cultivados em Pic 20,0 µM após 90 dias de cultura. C) Calo (seta vermelha) e estruturas globulares (seta branca) em explante foliar cultivado em PIC a 20,0 µM após 120 dias de cultura. D) Calo friável em presença de PIC a 20 µM após 120 dias de cultura. Barra=1cm (Figuras A, C e D). Barra = 1500 µm (Figura B).

8.1.1 Conversão de embriões somáticos

Embriões somáticos formados em explantes foliares mantidos em PIC a 20,0 µM ou 2,4-D a 22,6 µM por apresentarem melhor aspecto e menor oxidação em relação à outras concentrações de fitorreguladores testados, foram isolados e transferidos após 90 dias para meio MS ½ e solidificado com fitagel 0,2% para avaliação da conversão a plantas. Entretanto, observou-se nessas culturas o desenvolvimento de um processo embriogênico secundário com elevada capacidade de multiplicação (Figura 6). Aparentemente, os embriões primários não apresentaram conversão em plantas. Embriões secundários apresentaram baixa taxa de conversão (5%), e essas plantas (Figura 7A e B) mostraram crescimento mais rápido que os brotos meristemáticos. Parte dos embriões somáticos se desenvolveu em plantas deformadas que deram origem a brotos (Figura 7C). Esses brotos originados de plantas anormais foram excisados e inoculados em meio MS0 se desenvolvendo sem anormalidades morfológicas aparentes (Figura 7D). Plantas fenotipicamente normais foram selecionadas e utilizadas no processo de aclimatização.

Embriões primários apresentaram alta taxa multiplicativa em embriões secundários após a transferência para meio MS ½. Esta taxa se manteve ao longo de quatro subculturas (Figura 8) podendo indicar embriogênese repetitiva. Contudo, após a quinta subcultura (150 dias) em MS ½ suplementado com fitagel 0,2%, a capacidade multiplicativa dos embriões somáticos decaiu e iniciou-se um processo de degeneração (Figura 9) ao redor destes embriões apresentando oxidação gradual. Os explantes foliares utilizados na indução das culturas embriogênicas continuaram produzindo embriões somáticos na mesma freqüência após 10 meses de cultura (Figura 10A e B).

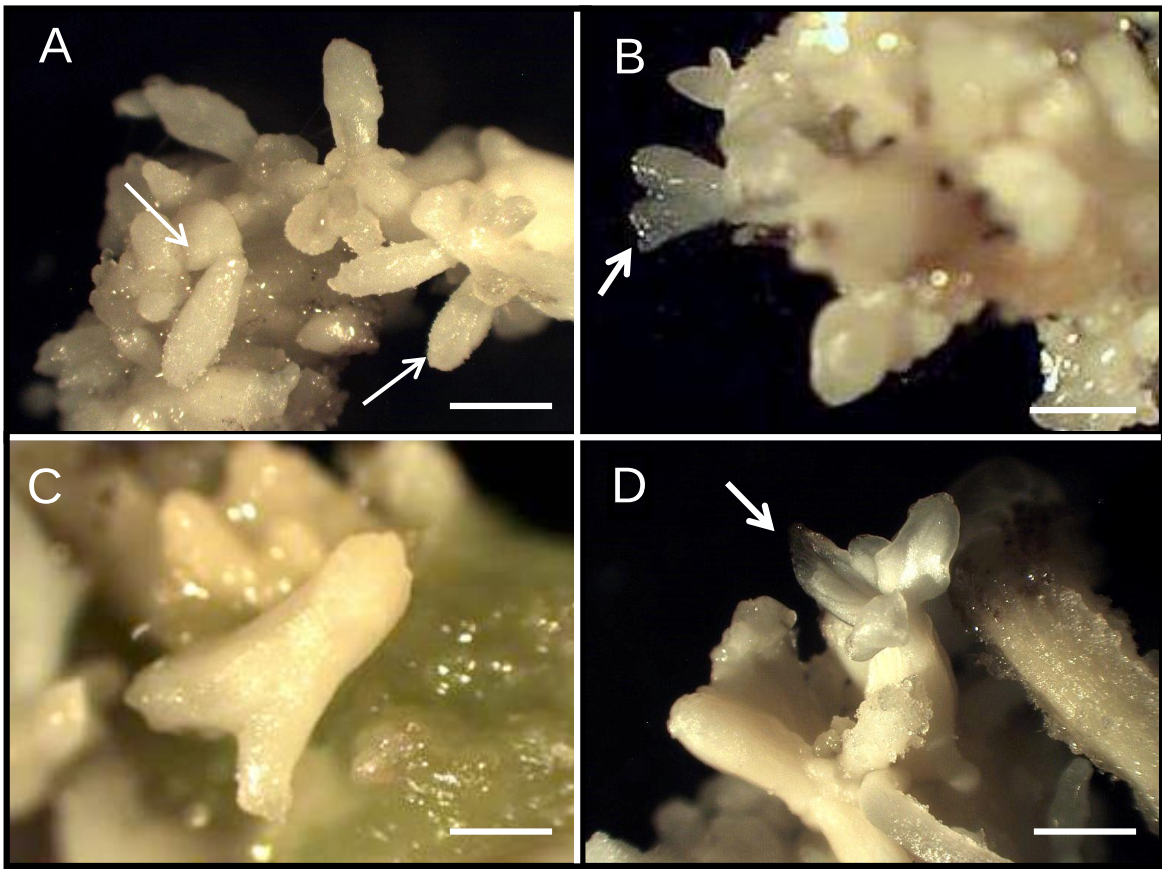

Figura 6 - Embriões somáticos secundários obtidos a partir de embriões primários originados de explantes foliares de *Petiveria alliacea* L. cultivados em meio contendo Pic 20,0 µM em regime de luz, após transferência para meio MS ½ suplementado com fitagel 0,2%, com 60 dias de cultura, em diferentes estádios de desenvolvimento.
Legenda: A) Estádio globular (setas brancas). B) Estádio cordiforme (seta branca). C) Estádio torpedo. D) Estádio cotiledonar (seta branca). Barra = 1000 µm.

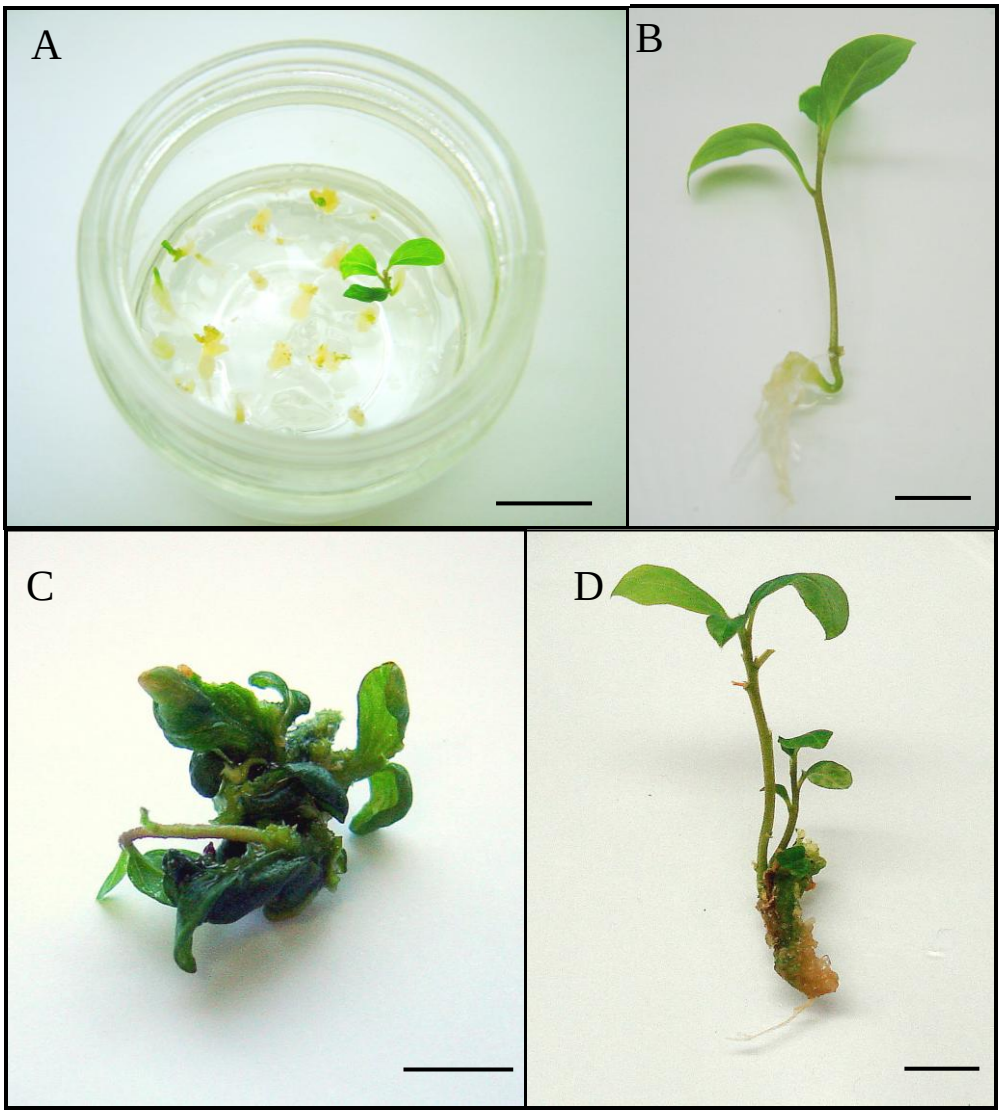

Figura 7 - Plantas originadas a partir de embriões somáticos obtidos de explantes foliares de *P.alliacea* L.
Legenda: A) Conversão de embriões somáticos em plantas após 30 dias de inoculação em meio MS ½ solidificado com fitagel 0,2%. B) Planta completa com 90 dias, convertida a partir de embriões produzidos em meio contendo PIC a 20,0 µM. C) Plantas anormais com 60 dias originadas de embriões somáticos, com formação de brotos. D) Broto sem anormalidades com 90 dias, proveniente de plantas anormais. Barra = 1cm.

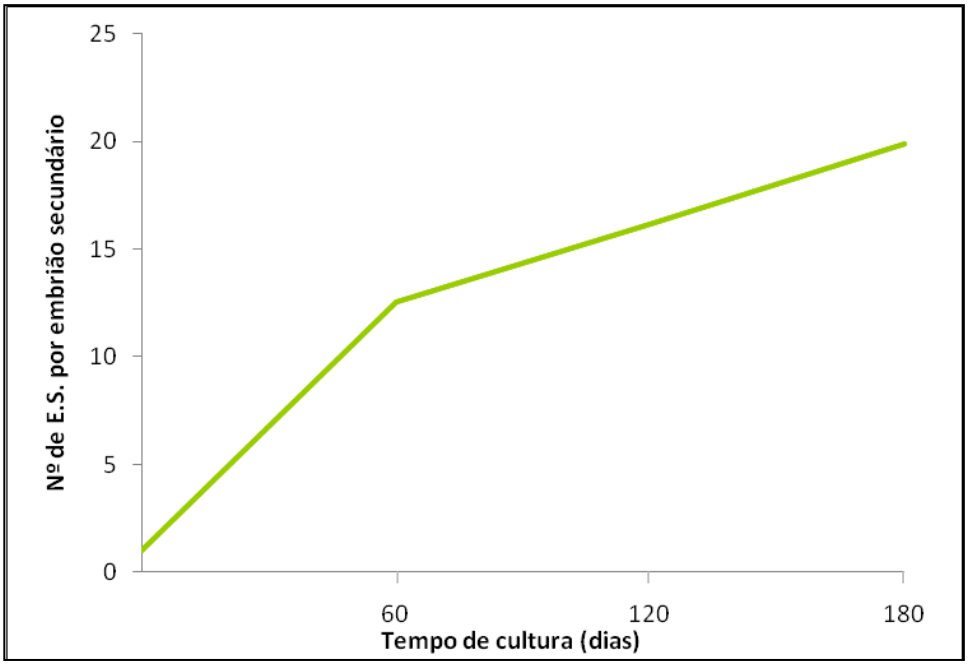

Figura 8 - Produção de embriões somáticos por embriogênese secundária de *P. alliacea* L., ao longo de 180 dias de cultura em meio MS ½ solidificado com fitagel 0,2%.

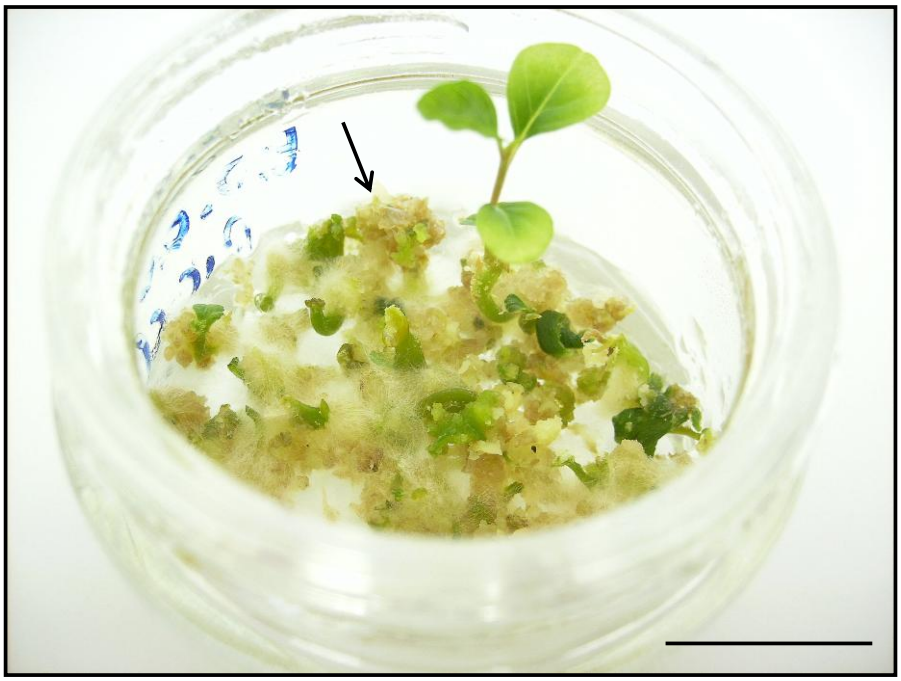

Figura 9 - Início do processo degenerativo de embriões somáticos secundários de *P. alliacea* L. (seta preta) após 150 dias de cultura em fitagel 0,2%. Barra = 1 cm.

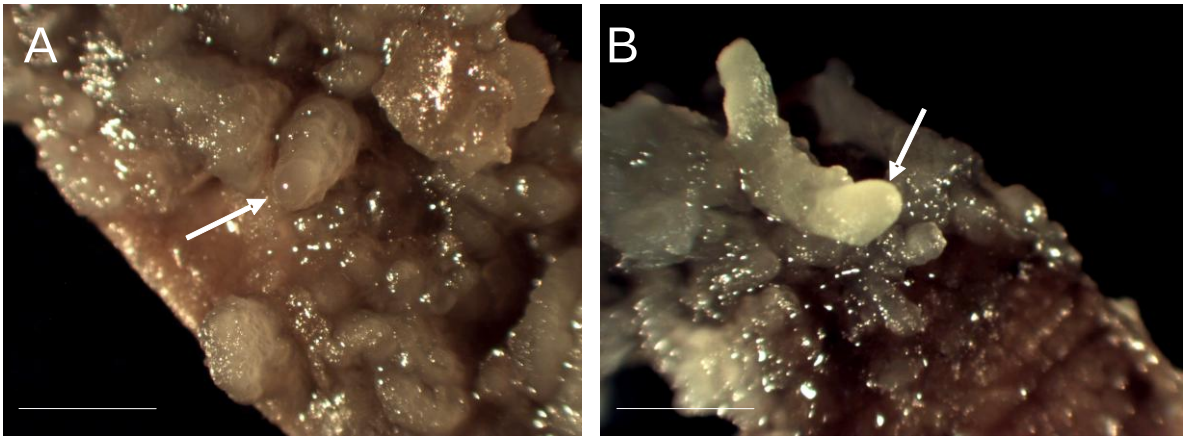

Figura 10 - Formação de embriões somáticos sobre a superfície de explantes foliares de *P. alliacea* L.
Legenda: A) Embriões somáticos (seta branca) formando-se sobre a superfície do explante foliar com 3 meses de cultura. B) Embriões somáticos (seta branca) formando-se sobre explante foliar com 10 meses de cultura. Barra = 1500 µm.

8.1.2 Análise histológica do processo embriogênico

Estudos histológicos realizados com explantes foliares de *P. alliacea*, 35 dias após a incubação em meio de cultura, contendo 2,4D a 22,6 µM ou PIC a 20,0 µM indicaram grande proliferação de células meristemáticas formando-se próximas ao sistema vascular associadas principalmente ao tecido floemático (Figura 11A). Nota-se também, mais raramente, a desdiferenciação de células da epiderme abaxial. Neste período de incubação não foi possível ainda identificar a formação de embriões somáticos. Contudo, explantes foliares analisados após 90 dias de incubação confirmam o processo regenerativo via embriogênese somática direta (Figura 11B). Foi possível também, no presente estudo, evidenciar a presença de protoderme, tecido de revestimento do embrião (Figura 11C). Faz-se necessário, no entanto, a realização de novas seções histológicas a fim de obter imagens onde seja possível reconhecer embriões completos, com as regiões de protoderme, procâmbio e meristema fundamental bem definidos. Centros meristemáticos também foram observados no material analisado após 90 dias de incubação. A periferia destes centros é formada por células meristemáticas e no centro são observadas as células que já sofreram alongamento e diferenciação (Figura 11D).

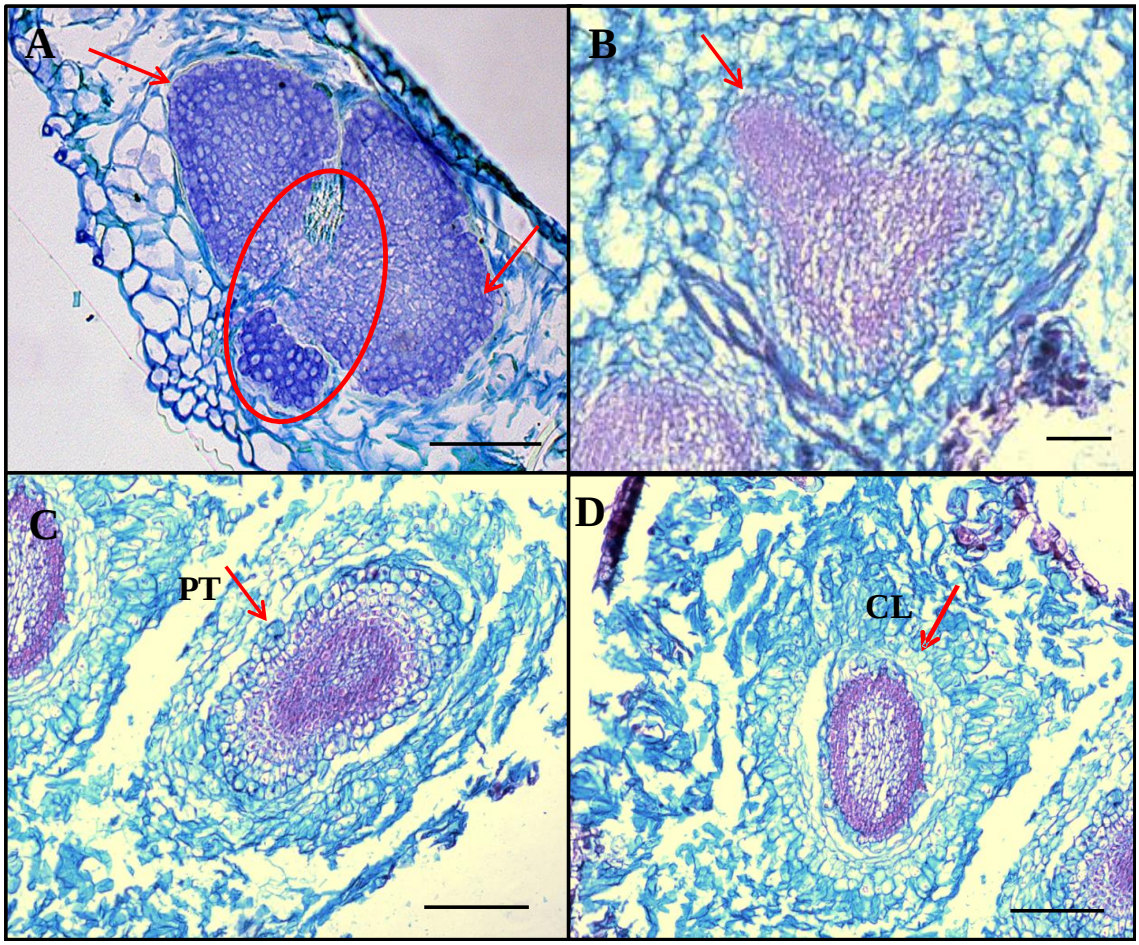

Figura 11 - Seção transversal de explante foliar de *P. alliacea* L. mantidos em regime de luz. Legenda: A) Evidenciando grande proliferação de células meristemáticas (setas vermelhas) em região adjacente ao feixe vascular (círculo vermelho) após 35 dias de inoculação em 2,4D a 22,6 µM. B) Aspecto do embrião somático em estádio cordiforme, após 90 dias de inoculação em PIC a 20,0 µM. C) Embrião somático com protoderme evidente após 90 dias de inoculação em PIC a 20,0 µM - PT – Protoderme. D) Centro meristemático formador do calo após 90 dias de inoculação em PIC a 20,0 µM - CL – calo. Barra = 200µm. Fotos: Marcia Garcia Gianfaldoni.

8.1.3 Cultura de células e embriões em suspensão

As culturas de células em suspensão em meio líquido sem reguladores de crescimento (controle) ou com a mesma composição de fitorreguladores utilizados na indução da calogênese, foram avaliadas com base no peso fresco das culturas. Após a inoculação, a cultura apresentou aumento de biomassa até os 60 dias e diminuição no crescimento ao longo das subculturas, sendo estas avaliadas até 180 dias (Figura 12). Células em suspensão mantidas em PIC revelaram coloração esverdeada e células mantidas em 2,4-D coloração acastanhada (Figura 13 A e B), de acordo com resultados anteriores (CASTELLAR, 2006, CANTELMO, 2010) sugerindo um processo oxidativo ao longo das subculturas. Foi observada também, a formação de aglomerados de tamanho variado que ocorreram em todas as condições e se mantiveram apesar da agitação das culturas. O filtrado dessas culturas apresentou consistência espumante indicando a excreção de metabólitos, possivelmente da classe das saponinas, para o meio líquido.

Esse experimento foi repetido após a separação das linhagens embriogênica e não embriogênica. A linhagem embriogênica em suspensão, inoculada em MS0 ou MS ½ apresentou acelerado aumento de peso (Figura 14) e conversão de embriões em plantas após um período de 20 dias. A quantificação realizada no experimento utilizando inicialmente 20 embriões somáticos inoculados em meio MS0 líquido demonstrou que o peso fresco da cultura, apresentado pela linhagem embriogênica no experimento anterior está relacionado tanto ao aumento no número de embriões quanto à conversão de embriões em plantas ao longo das subculturas (Figura 15). Nesse sistema, os embriões somáticos em processo de conversão na cultura líquida foram transferidos para meio MS solidificado com ágar, e desenvolveram o mesmo processo de produção e multiplicação de embriões secundários observado anteriormente na conversão de embriões primários e também, desenvolveram plantas completas (Figura 16A, B, C e D). Por outro lado, a linhagem não embriogênica apresentou decréscimo na taxa de crescimento celular ao longo das subculturas (Figura 17).

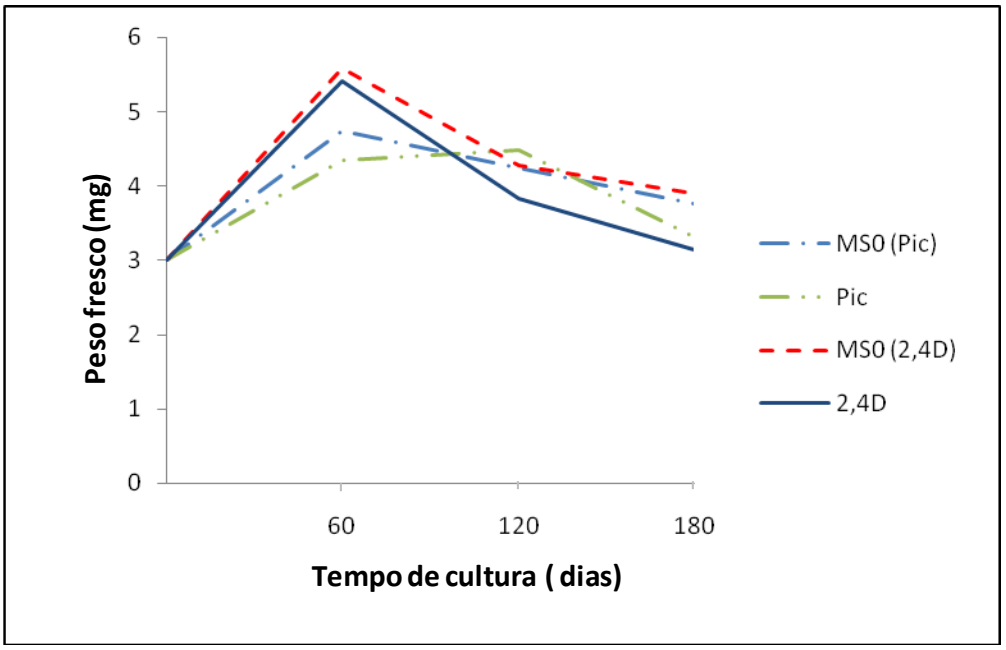

Figura 12 - Produção de biomassa de cultura de células em suspensão de *P. alliacea* L. em meio MS líquido isento de reguladores de crescimento (controle – MS0 a partir da cultura em PIC e MS0 a partir da cultura em 2,4-D) ou suplementado com reguladores de crescimento (PIC a 20,0 µM ou 2,4-D a 22,6 µM) após 180 dias de cultura mantidas no claro.

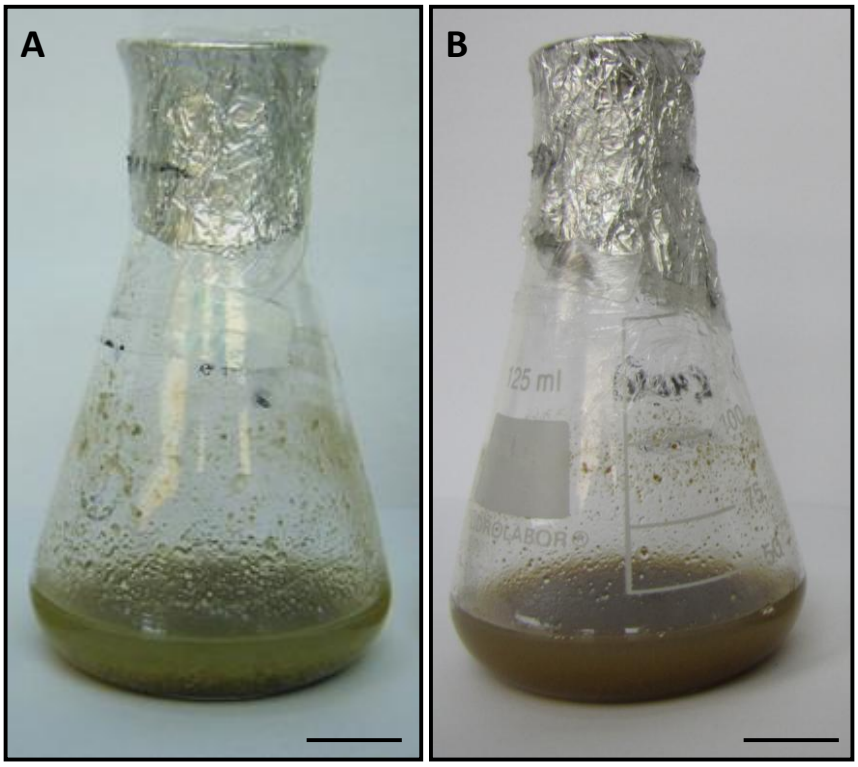

Figura 13 - Células em suspensão de *P. alliacea* L. mantidas em meio MS suplementado com PIC a 20,0 µM (A) ou 2,4-D a 22,6 µM (B) após 120 dias de cultura. Barra = 1cm.

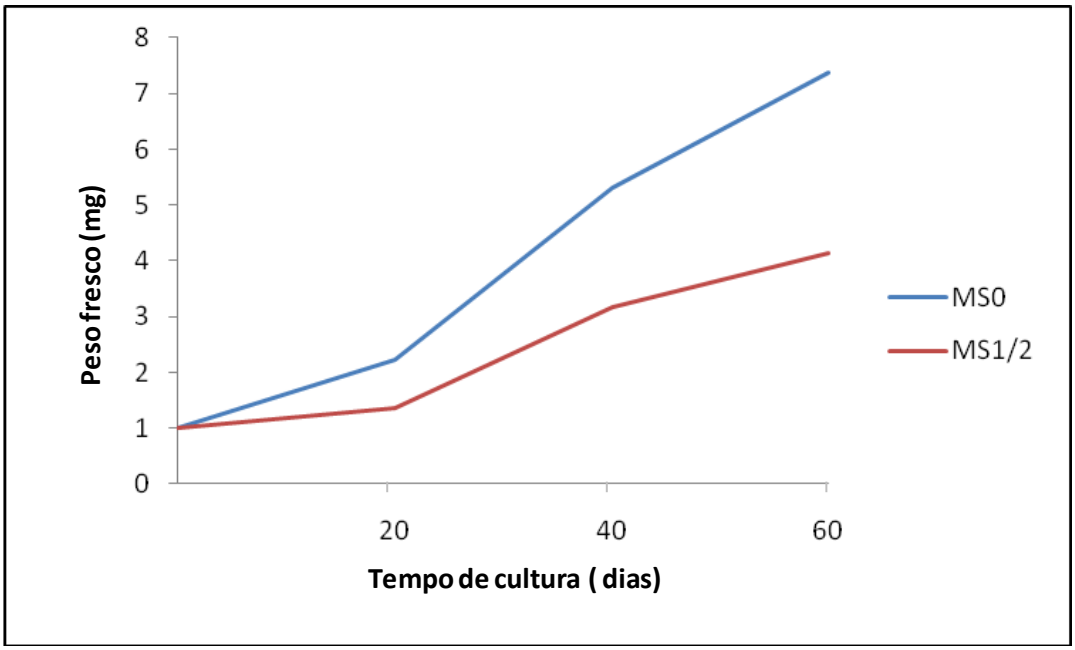

Figura 14 - Produção de biomassa de embriões somáticos obtidos a partir de explantes foliares de *P. alliacea* L. mantidos em meios líquidos MS0 e MS ½, após 60 dias de cultura.

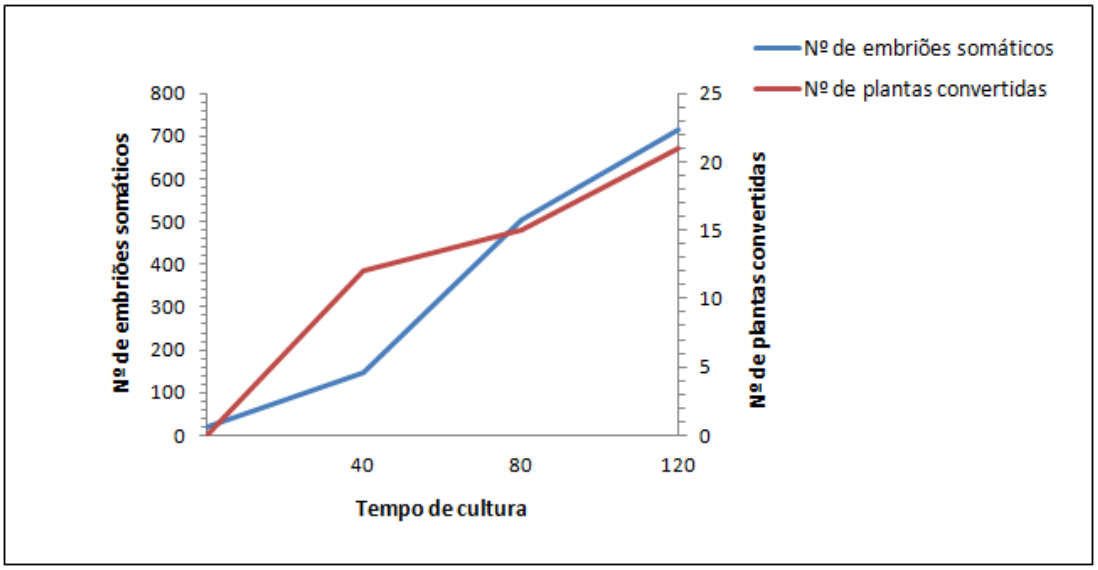

Figura 15: Produção de biomassa de embriões somáticos e plantas provenientes de embriões somáticos obtidos a partir de explantes foliares de *P. alliacea* L. mantidos em meio líquido MS0, ao longo de 4 meses.

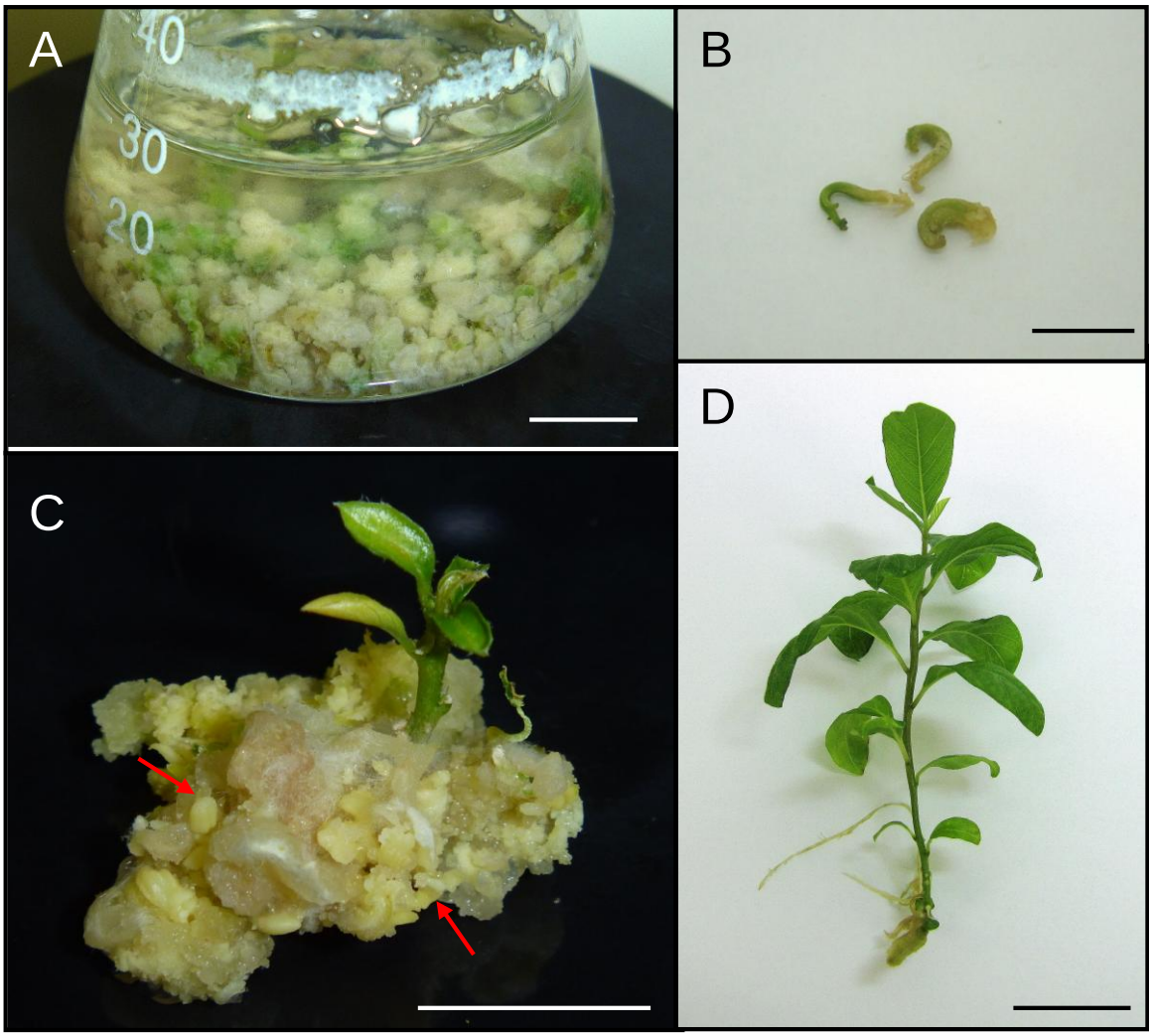

Figura 16: Embriões somáticos de *P. alliacea* L. mantidos em meio MS.
Legenda: A) Embriões em meio líquido. B) Embriões somáticos oriundos do meio líquido apresentando conversão em plantas. C) Aglomerados de embriões somáticos oriundos do meio líquido e inoculados em meio MS solidificado com ágar originando novos embriões somáticos e plantas. D) Planta convertida a partir de embrião somático mantido em meio MS líquido após transferência para meio MS semi sólido. Barra = 1cm.

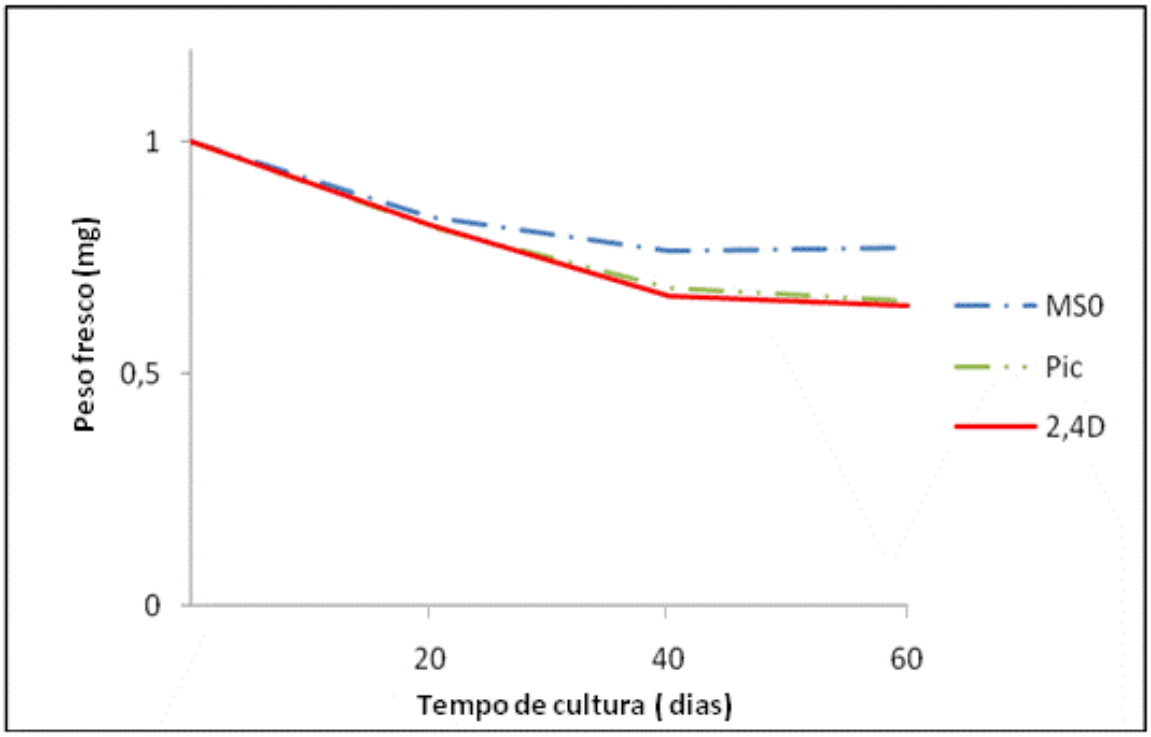

Figura 17: Produção de biomassa de culturas não morfogênicas de *P. alliacea* L. mantidas em meio MS líquido suplementado com PIC a 20,0 µM ou 2,4-D a 22,6 µM ou MS0 sem fitorreguladores, após 60 dias de cultura.

8.1.4 Aclimatização

Plantas convertidas a partir de embriões somáticos formados em explantes foliares de *P. alliacea* L. inoculados em PIC a 20 µM foram aclimatizadas utilizando três metodologias diferentes (CANTELMO, 2010). Plantas transferidas para vasos contendo substrato Top Garden Floreira® e mantidas diretamente em telado não sobreviveram ao processo de aclimatização. Plantas aclimatizadas inicialmente utilizando filme plástico ou campânula (Figura 18 A e B) demonstraram melhor adaptação ao ambiente *ex vitro*. Durante a aclimatização, o maior percentual de sobrevivência de plantas (90%) foi observado após pré-tratamento utilizando campânula plástica para proteção das plantas contra a desidratação (Figura 19A e B). As variáveis altura da planta, número de nós e comprimento da folha não apresentaram diferenças significativas dentro dos tratamentos (Tabela 2). Entretanto, o parâmetro de largura da folha mostrou diferença estatística significativa (Tabela 2) entre os pré-tratamentos, o que pode ser constatado visualmente pelo aspecto mais expandido das folhas protegidas inicialmente por campânulas.

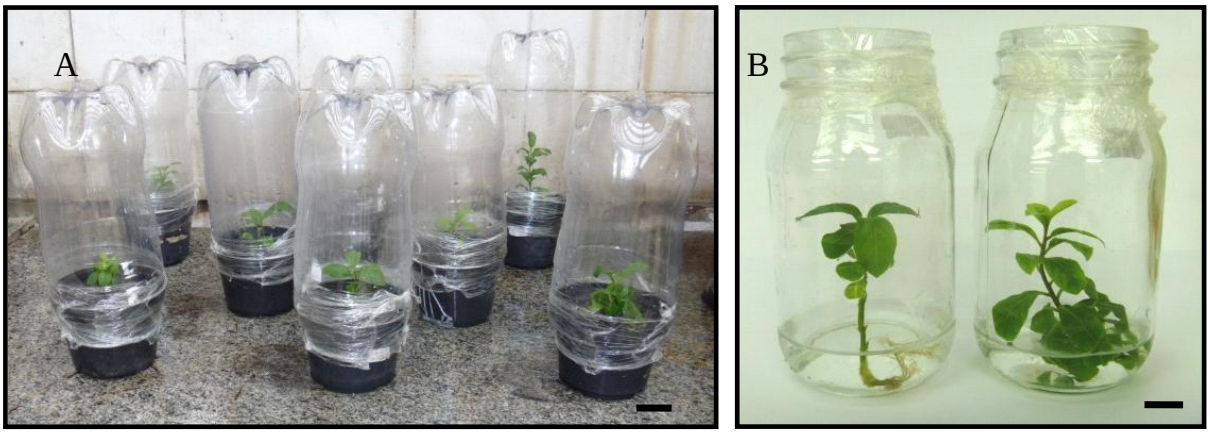

Figura 18 - Aclimatização de plantas obtidas *in vitro* a partir de embriões somáticos induzidos em PIC a 20,0 µM.
Legenda: A) Após transferência para substrato e utilização inicial de campânula (Barra = 3 cm) B) Após substituição do meio por água e utilização inicial de cobertura com filme plástico (Barra=1 cm).

Tabela 2 - Avaliação da influência de diferentes pré-tratamentos para aclimatização de plantas convertidas a partir de embriões somáticos de *P.alliacea* L., após 30 dias de permanência das plantas sem cobertura, no telado.

Tratamento	**Sobreviv. (%)**	**Nº de nós ***	**Alt. da planta (cm)***	**Comp. da folha (cm)***	**Larg. da folha (cm)***
Campânula	90	$22,8 \pm 7^{a}$	$7,2 \pm 1,8^{a}$	$3,8 \pm 1,1^{a}$	$2,3 \pm 0,7^{a}$
Filme plástico	60	$19,6 \pm 7,1^{a}$	$7,7 \pm 2,7^{a}$	$3,2 \pm 1^{a}$	$1,8 \pm 0,6^{b}$

*Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem significativamente pelo teste t de Student ($p>0,05$).

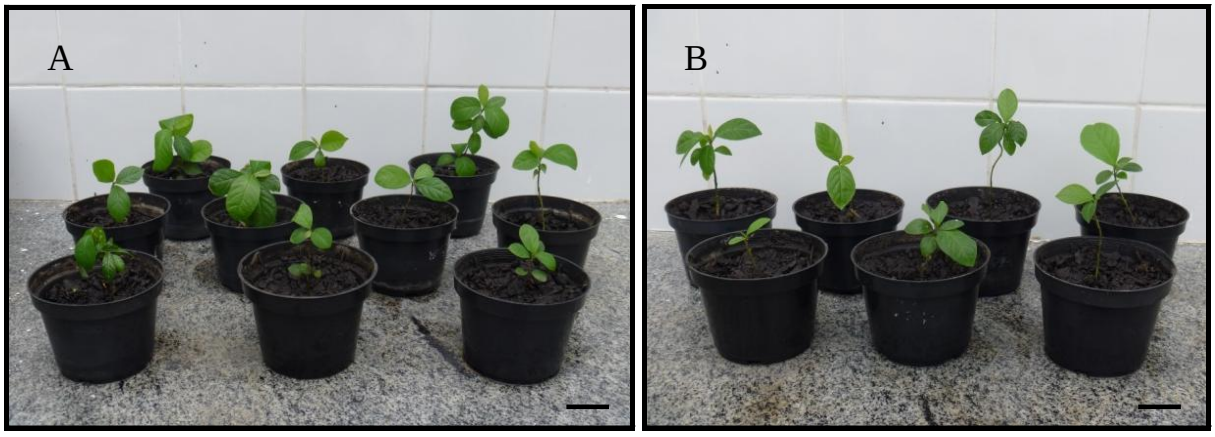

Figura 19 - Plantas provenientes de embriões somáticos induzidos em PIC a 20,0 µM 40 dias após aclimatização.
Legenda: A) Plantas aclimatizadas com utilização inicial de campânula. B) Plantas aclimatizadas com utilização inicial de filme plástico. Barra = 3cm.

8.2 **Análise fitoquímica**

8.2.1 Análise cromatográfica em camada delgada (TLC)

A análise por cromatografia em camada delgada revelou semelhanças e diferenças entre os diferentes sistemas de cultura *in vitro* e plantas de diferentes populações mantidas no telado do Núcleo de Biotecnologia Vegetal da UERJ. O sistema de eluentes que utilizou o acetato de etila:acetona:água, mais polar do que o acetato de etila (AcOEt) (100), promoveu melhor separação das substâncias ao longo da corrida cromatográfica, permitindo a visualização de outras duas substâncias que, eluídas somente em AcOEt (100) não saíram do ponto de aplicação das amostras (Figura 20). As manchas de coloração roxa, marcadas na Figura 20 com retângulo correspondem às mesmas substâncias, porém com Rf's diferentes em A (Rf=0,3) e B (Rf=0,6) devido à diferença de polaridade dos sistemas escolhidos. Após a eluição com AcOEt (100), extratos obtidos de folhas de plantas mantidas *ex vitro* apresentaram perfil cromatográfico semelhante (Figura 20 A). O mesmo ocorreu com amostras eluídas em acetato de etila:acetona:água (Figura 20 B), indicando que as populações mantidas no telado por dois anos não apresentam diferenças metabólicas influenciadas pelo ambiente original de onde foram coletadas.

Na placa comparativa entre todas as estruturas (Figura 21), com exceção do padrão DTS e extratos de raízes de plantas provenientes de embriões somáticos eluídos em AcOEt (100), as diferentes amostras apresentaram substâncias semelhantes de coloração roxa com o mesmo Rf=0,3 em extratos eluídos somente com AcOEt (Figura 21A) e Rf=0,6 em extratos eluídos em acetato de etila:acetona:água (Figura 21B), indicando a influência de polaridade dos eluentes, além da presença de terpenóides nos referidos extratos que pode ser verificada quando comparado com o padrão de revelação cromatográfico. Após a eluição, em ambos os sistemas, extratos de calos e raízes de plantas provenientes de embriões apresentaram manchas com colorações menos evidentes em comparação aos outros sistemas (Figura 21 A e B). Essas manchas mais claras indicam menor concentração dessas substâncias nas estruturas investigadas, possivelmente devido ao grau de diferenciação celular dos calos e a baixa concentração disponível em extratos de raízes *in vitro*. Duas substâncias com colorações semelhantes (amareladas) com Rf=0,2, foram visualizadas somente em extratos obtidos com calos e embriões somáticos eluídos com acetato de etila:acetona:água (Figura 21B). De acordo com o padrão de revelação cromatográfica, essas manchas podem corresponder à mesma substância produzida por ambas as estruturas e cujo padrão de coloração corresponde

a um flavonóide. No extrato de embrião somático eluído em acetato de etila:acetona:água, pode-se observar a presença nítida de uma mancha ligeiramente azulada com Rf=0,4, ausente em todos os outros extratos obtidos tanto de plantas *in vitro* quanto de plantas *ex vitro* (Figura 21B). Essa constatação indica que o metabolismo celular de embriões somáticos é diferente de todos os outros tipos celulares.

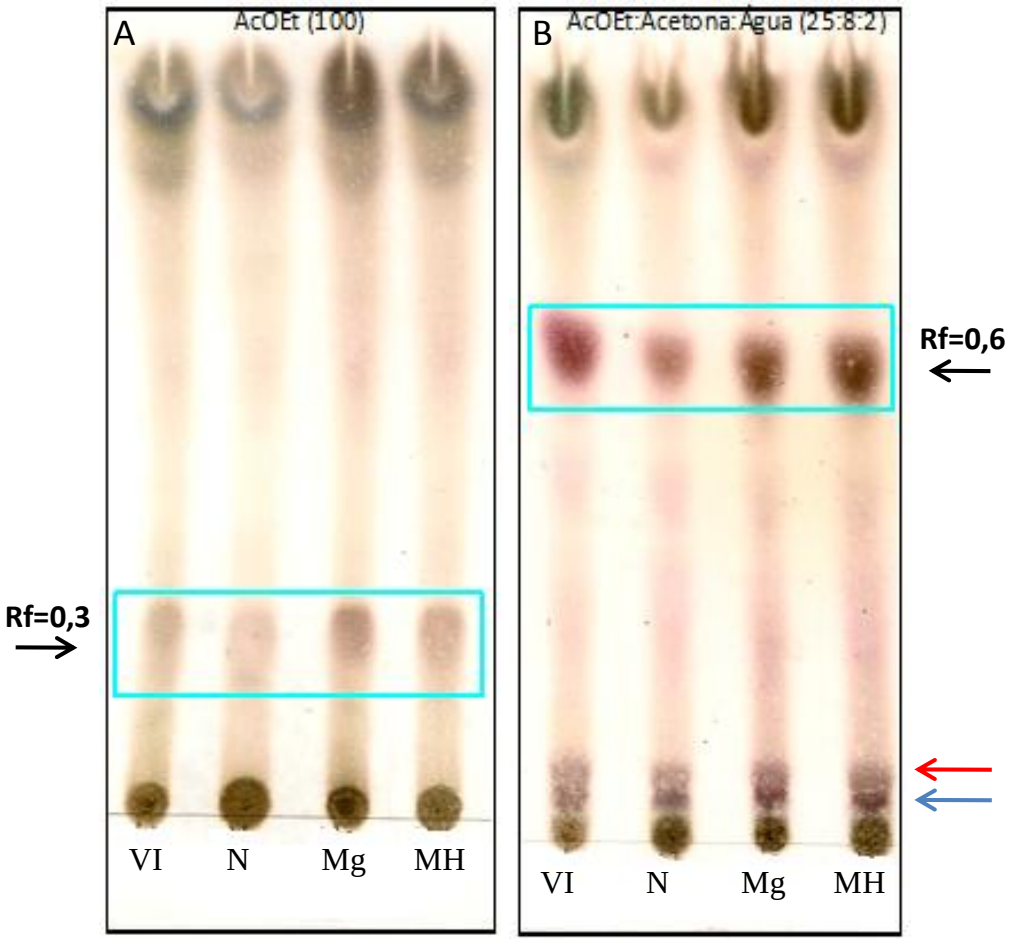

Figura 20 - Perfil fitoquímico comparativo entre diferentes populações de *P. alliacea* L. mantidas *ex vitro* VI (Vila Isabel), N (Niterói), Mg (Magé) e MH (Marechal Hermes).
Legenda: (A) acetato de etila (100). (B) Acetato de etila:acetona:água (25:8:2) indicando melhor separação cromatográfica. Separação de duas substâncias (setas vermelha e azul) que não foram visualizadas ao serem eluídas em AcOEt (100).

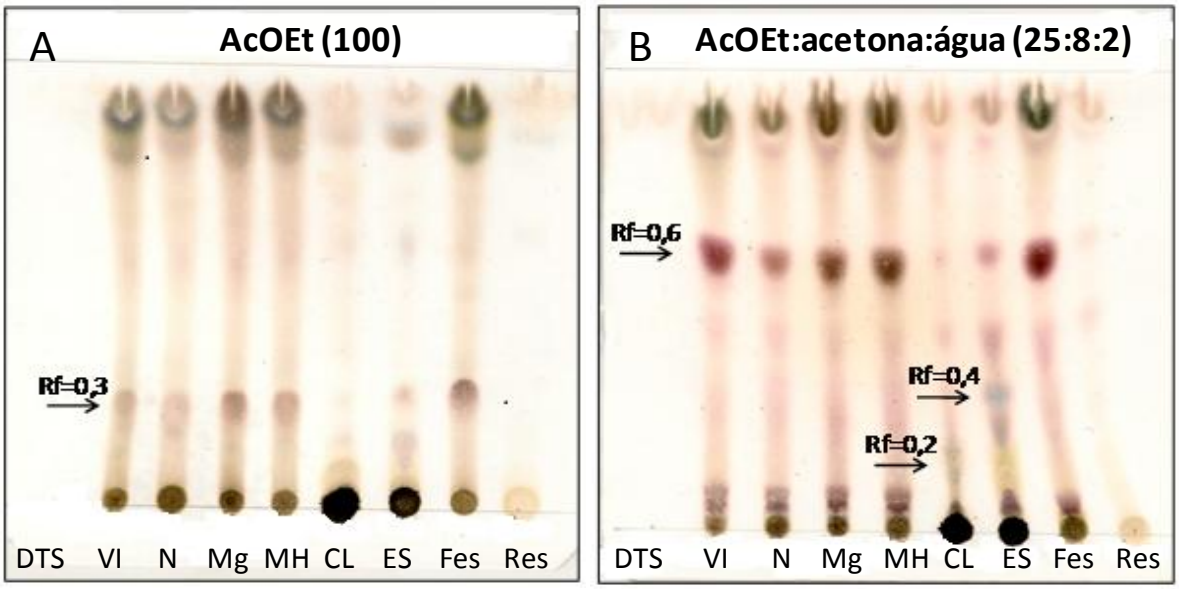

Figura 21 - Perfil fitoquímico comparativo entre o padrão DTS, diferentes populações de *P. alliacea* L. mantidas *ex vitro* VI (Vila Isabel), N (Niterói), Mg (Magé) e MH (Marechal Hermes) e estruturas obtidas de sistemas *in vitro* Cl (Calo), ES (Embrião Somático), Fes (Folhas de plantas provenientes de embrião somático) e Res (Raízes de plantas provenientes de embriões somáticos), realizado em cromatoplacas de sílica eluídas em (A) acetato de etila (100) e (B) acetato de etila:acetona:água (25:8:2).

8.2.2 Cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS)

O pico produzido na corrida cromatográfica utilizando o padrão DTS foi obtido através da comparação com o banco de dados NIST do GC/MS (Figura 22 A).

A extração com etanol em diferentes sistemas de *P. alliacea* estabelecidos *in vitro* forneceu baixa complexidade de compostos voláteis, como demonstrado na Figura 22. Os picos predominaram na região entre 13 e 20 min dos cromatogramas. Os extratos etanólicos de embrião, folhas e calo (Figura 22 C, B e D) apresentaram picos comuns com tempos de retenção de 14,68; 15,80 e 17,03 minutos. Apenas as folhas de embrião (Figura 22 B) apresentaram uma região com TR entre 21 e 23 min com grande número de picos de baixa intensidade.

Tendo em vista que não pode ser detectado DTS nas amostras extraídas com etanol, foram preparados extratos de embrião de *P. alliacea* com diferentes solventes. As análises por GC/MS estão apresentadas na Figura 23. Houve diferença nas intensidades dos picos quando comparamos os outros extratos com hexano, havendo predominância de picos de maior

intensidade na região entre 10 a 20 min para os embriões frescos (Figura 23 A) e de picos majoritários entre 20 e 27 min para os embriões secos (Figura 23 B). O cromatograma por GC/MS do extrato de embriões secos obtido com acetato de etila (Figura 23 C) mostrou uma predominância de picos de maneira semelhante ao extrato com hexano (Figura 23 B), enquanto a extração com diclorometano produziu picos de maior intensidade ao longo de toda a região entre 13 e 27 min do cromatograma (Figura 23 D).

Quanto à presença de DTS nos diferentes extratos verificou-se que, o extrato hexânico obtido de embrião fresco apresentou 19 picos em seu cromatograma, sendo o DTS eluído com tempo de retenção de 17,5 minutos. O extrato hexânico obtido de embrião seco apresentou 18 picos não sendo detectado o DTS neste extrato. O extrato em acetato de etila obtido de embriões secos apresentou 20 picos em seu cromatograma, não sendo detectada também a presença de DTS. Já o extrato em diclorometano da mesma estrutura, apresentou 24 picos em seu cromatograma, incluindo o DTS, eluído com tempo de retenção de 17,8 minutos. O extrato hexânico obtido de raízes secas provenientes de plantas convertidas a partir de embriões somáticos apresentou 22 picos, sendo o DTS eluído com tempo de retenção de 17,8 minutos (Figura 23 E). O maior número de picos obtido com a extração em diclorometano, de embriões somáticos secos, indica que, para esta estrutura, este solvente foi mais eficiente no processo de extração. Os resultados para a identificação do dibenzil trissulfeto nos diferentes extratos deverão ser posteriormente confirmados através de co-injeção com o padrão DTS.

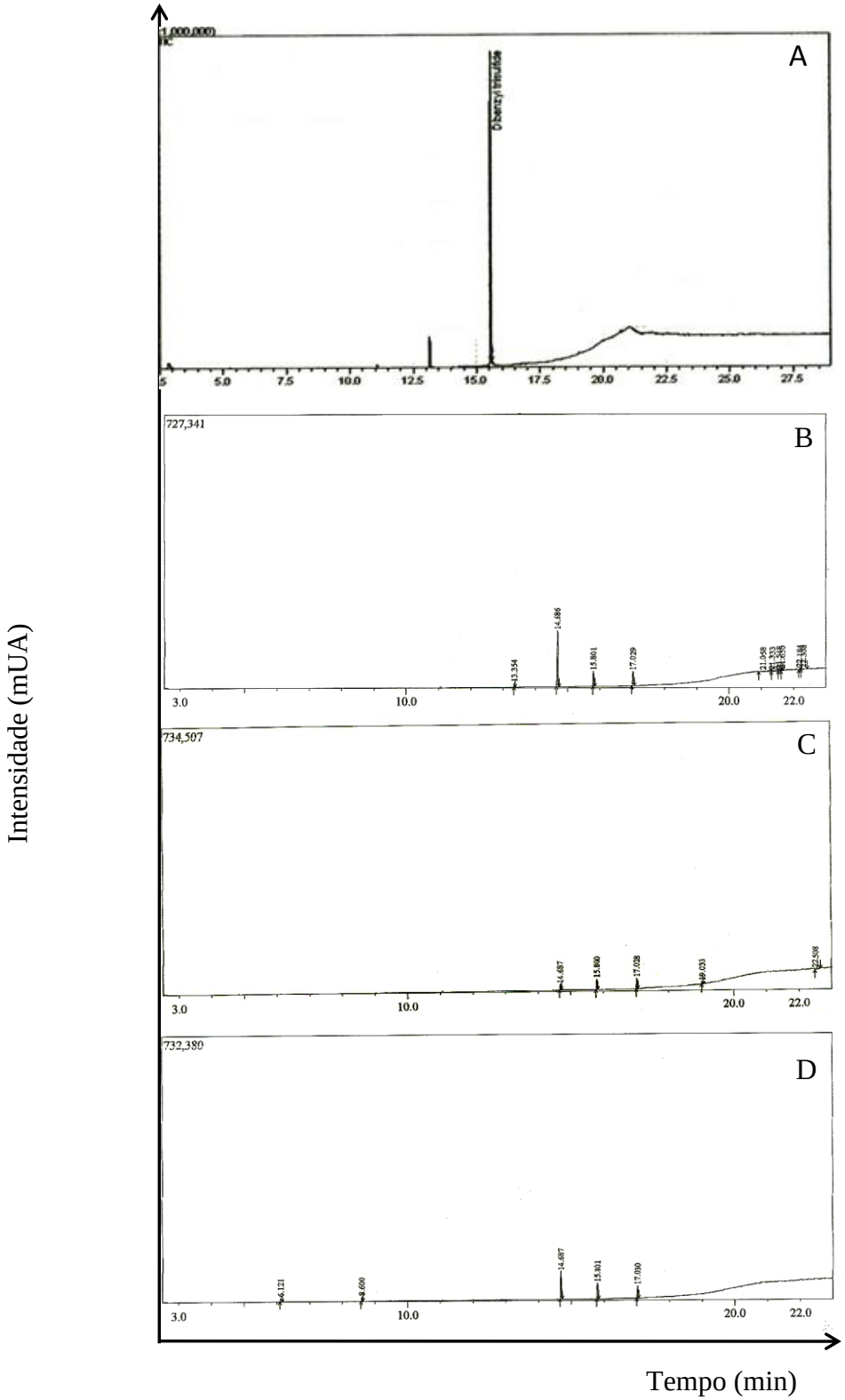

Figura 22 - Cromatogramas obtidos por GC/MS referentes ao padrão de dibenzil trissulfeto e aos extratos etanólicos de diferentes sistemas de *P. alliacea* L. estabelecidos *in vitro*.
Legenda: A) Padrão de dibenzil trissulfeto. B) Folhas de plantas provenientes de embriões somáticos. C) Embriões somáticos D) Calo. Foi utilizada uma coluna capilar Rester RTX – 5MS (30 m x 0,25 mm de d.i. e 0,25 µm d.f.) e hélio como gás de arraste com fluxo constante de 1,55 mL/min. Aplicados 1 µl de cada amostra.

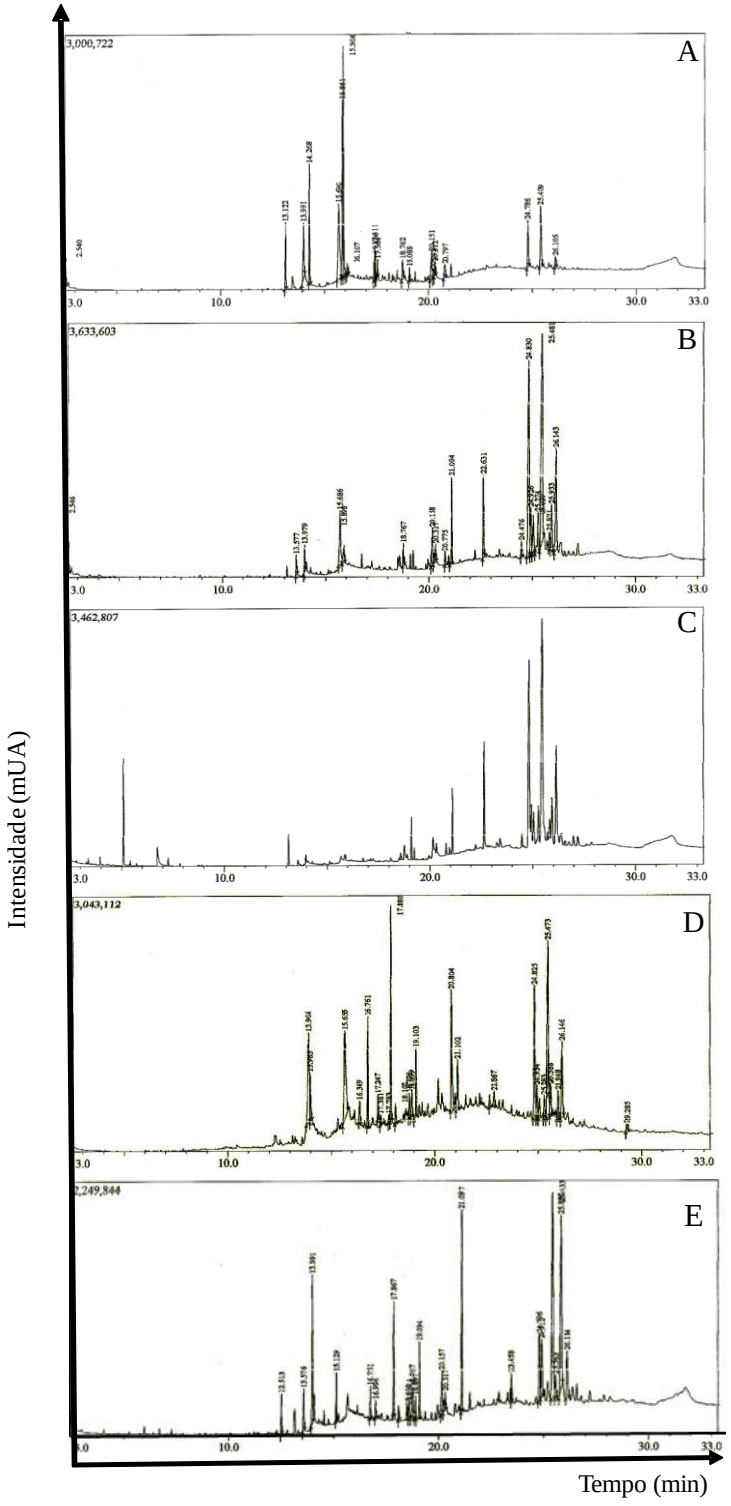

Figura 23 - Cromatogramas de diferentes extratos de embriões somáticos de *Petiveria alliacea* L. obtidos por GC/MS. A) Extrato de embrião fresco com hexano; B) Extrato de embrião seco com hexano; C) Extrato de embrião seco com acetato de etila; D) Extrato de embrião seco com diclorometano. E) Extratos hexânicos de raízes secas de plantas provenientes de embriões. Foi utilizada uma coluna capilar Rester RTX – 5MS (30 m x 0,25 mm de d.i. e 0,25 μm d.f.) e hélio como gás de arraste com fluxo constante de 1,55 mL/min. Aplicados 1 μl de cada amostra.

9 **DISCUSSÃO**

O tratamento de tecidos vegetais cultivados *in vitro* com reguladores de crescimento pode levar a uma grande variedade de respostas, incluindo formação de calos, embriões somáticos e formação de raízes (MORINI *et al.*, 2000). Neste trabalho, o desenvolvimento do processo calogênico a partir dos explantes foliares foi claramente influenciado pelo tipo de regulador de crescimento usado: Zeatina, TDZ, PIC e 2,4-D.

Uma resposta organogênica foi observada em presença de 2,4-D com a formação de raízes adventícias diretamente na superfície dos explantes foliares. Embora não fosse objetivo deste trabalho aprofundar os estudos acerca da resposta organogênica, esses resultados abrem uma perspectiva de investigação visando ao estabelecimento de um sistema de cultura de raízes que poderia ser de grande interesse econômico, uma vez que essa espécie apresenta grande produção de metabólitos bioativos, sobretudo DTS, nas raízes (KINGHORN *et al.*, 1998, KUBEC; MUSAH, 2001, OKADA *et al*., 2008).

Sob as condições descritas, o processo calogênico deixou de ocorrer em explantes foliares inoculados em meio MS suplementado com Zeatina, que tornaram-se cloróticos e não apresentaram resposta morfogênica. A resposta calogênica em presença de TDZ, neste trabalho, não foi considerada ideal para iniciar a cultura de células em suspensão devido à baixa capacidade multiplicativa. Alguns trabalhos relatam que a associação de TDZ com auxinas como, por exemplo, 2,4-D, pode ser essencial para a maior produção de calos com boa taxa de proliferação e totipotencialidade quando transferidos para meio de regeneração (CHANG; CHANG, 1998, LIN *et al.*, 2000). Neste trabalho, em presença da auxina Picloram, houve produção de calo com consistência friável e coloração amarelada em explantes mantidos na concentração de 20,0 µM .

Durante o processo de desdiferenciação induzida em explantes foliares, foi obtida uma resposta calogênica e também a produção de estruturas globulares, caracterizados como embriões somáticos, que, aparentemente originam os calos friáveis, principalmente em presença de PIC a 20,0 µM, havendo a necessidade de confirmação através da análise histológica do processo. Sabe-se que células competentes e não competentes podem produzir calos (VON ARNOLD, 2008), todavia, somente as primeiras possuem capacidade para originar embriões somáticos, sendo sua expressão possibilitada pelo uso adequado de reguladores de crescimento. Os resultados desse trabalho demonstraram que tecidos diferentes podem ser observados na superfície dos explantes foliares após 60 dias de cultura em presença de PIC ou 2,4-D e a ocorrência de embriogênese somática a partir de explantes

foliares de *P.alliacea* L., foi confirmada através da análise histológica do processo regenerativo. Nesse trabalho foi determinada a origem direta da embriogênese a partir de tecidos próximos ao feixe vascular. Segundo Yeung (1995) uma das evidências do início da histodiferenciação do embrião é a formação da protoderme, tecido de revestimento do embrião, que foi possível identificar no presente estudo. No entanto, um aprofundamento na investigação da origem desses embriões, através de microscopia das etapas mais precoces da cultura, poderia fornecer informações mais precisas sobre o início do processo, uma vez que a técnica utilizada com os explantes de 35 dias não permitiu uma visualização suficientemente esclarecedora.

Embriões somáticos podem ser obtidos sem a passagem pela fase de calo diretamente da superfície de explantes vegetais como observado neste trabalho, no entanto, a embriogênese indireta ocorre mais frequentemente do que embriogênese direta tanto em culturas de calos como em culturas de células em suspensão (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Calos total ou parcialmente embriogênicos podem ser induzidos e o uso de auxinas em altas concentrações geralmente tem sido um requisito importante para a obtenção de culturas embriogênicas. Normalmente, para o desenvolvimento de embriões somáticos um segundo meio é requerido onde a auxina é reduzida ou retirada (GUERRA *et al*., 1999) por prejudicar o processo de histodiferenciação, podendo interferir no desenvolvimento normal do embrião (STUART *et al*., 1998). O modo de ação das auxinas no processo embriogênico não está totalmente esclarecido, mas em cultura de tecidos têm sido as substâncias mais utilizadas na indução da embriogênese somática (KAUR; KOTHARI, 2004, MERKLE, 1995, *apud*, DA SILVA, 2005).

A adição de 2,4-D em meios nutritivos é frequentemente empregada para promover a formação de células embriogênicas, em diferentes sistemas (GUERRA; NODARI, 2006). Estudos sugerem que o 2,4-D pode controlar a metilação do DNA e a transcrição de genes que codificam proteínas específicas influenciando processos moleculares e fisiológicos que podem levar a formação de embriões somáticos (FEHÉR *et al.*, 2003). Assim como foi observado neste trabalho, explantes foliares de *Cydonia oblonga* Mill mantidas *in vitro* em presença de 2,4-D, apresentaram a formação de embriões somáticos, além da indução de estruturas nodulares de coloração vermelha e brotos no mesmo explante foliar (MORINI *et al*., 2000).

Picloram também é uma auxina muito potente, capaz de induzir embriogênese somática em diferentes espécies (GEORGE; EAPEN, 1990, VISHNOI; KOTHARI, 1996, CASTILLO *et al*., 1998, MENDOZA; KAEPPLER, 2002). Neste trabalho, os embriões somáticos foram obtidos em culturas suplementadas com diferentes concentrações de 2,4-D

ou Picloram, sendo as maiores produções de embriões alcançadas quando explantes foliares foram inoculados em meio contendo PIC a 20,0 µM ou 2,4-D a 22,6 µM mantidos no claro. Embriões somáticos também foram obtidos por Webster e colaboradores (2008), porém, em condição de indução diferenciada do presente estudo. No referido trabalho, a indução de embriões somáticos através da via indireta, se deu por meio da adição de 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido naftalenoacético (ANA) adicionados aos meios de cultura e suplementados com glicose ou sacarose, obtendo-se calos rizogênicos/embriogênicos.

A embriogênese somática tem sido considerada como um sistema importante na produção de substâncias bioativas. Em *Corydalis ambigua,* a cavidina, alcalóide com alto potencial contra o câncer, com atividade anti-alérgica, anti-inflamatória e inseticida, foi encontrada em quantidade mais elevada em embriões somáticos mantidos em suspensão (1,05%) em comparação a tubérculos (0,08%) e folhas (0,07%) (HIRAOKA *et al.*, 2001). Em estudos fitoquímicos realizados com *Huperzia selago*, produtora de huperzina A, importante alcalóide utilizado no tratamento contra a doença de Alzheimer, foi demonstrado haver diferença no conteúdo deste metabólito dependendo da origem da planta, visto que brotos de plantas *in vitro* derivadas de embriões somáticos apresentaram 2,5 vezes mais huperzina A quando comparados a brotos de plantas de campo (SZYPULA *et al.*, 2005). Fatores químicos e físicos como a temperatura, por exemplo, podem estimular ou inibir a produção de metabólitos especiais em embriões somáticos pela ativação ou silenciamento de genes causados por diferentes estresses (SHOHAEL *et al.*, 2006, SHOHAEL *et al.*, 2007). Além disso, a fase de diferenciação de embriões e plantas provenientes deste sistema pode exercer influência na capacidade biossintética destes tecidos. Estudos realizados em *Nothapodytes foetida*, espécie utilizada no tratamento da AIDS e câncer de mama, sugerem que a produção de alcalóides foi aumentada após as fases mais avançadas de diferenciação de estádios embrionários, bem como em plântulas provenientes de embriões somáticos, dois anos após a aclimatização (FUZELE; SADTIVE, 2003). Em sistemas embriogênicos, a capacidade de produção de metabólitos bioativos pode ser determinada pelo monitoramento da produção de substâncias bioativas nesses tecidos (JEONG *et al*., 2005).

A ocorrência de embriogênese somática a partir de explantes foliares de *P.alliacea* L. pode representar um importante sistema a ser explorado na obtenção de metabólitos com interesse para a indústria farmacêutica. Como citado anteriormente, a análise química de diferentes partes da planta tem revelado grande quantidade de derivados sulfurados com atividade antifúngica, antibacteriana, antioxidante e anticancerígena (KUBEC; MUSAH, 2005; OKADA *et al*., 2008). Em estudos realizados por Webster e colaboradores (2008) foi

relatada a presença de dibenzil trissulfeto em extratos de embriões somáticos de *P. alliacea* L. em quantidade aproximadamente trinta vezes maior em comparação a calos rizogênicos/embriogênicos. Sabe-se atualmente, que o dibenzil trissulfeto representa uma importante substância imunomodulatória por apresentar atividade biológica influenciando eventos de sinalização celular em diferentes linhagens de células cancerígenas (ROSNER *et al*., 2001, WILLIAMS *et al*., 2007).

Além da produção de metabólitos, a embriogênese somática representa também um sistema alternativo para a micropropagação. A regeneração de plantas via embriogênese somática *in vitro* pode reduzir o tempo de multiplicação em muitas espécies e oferecer um sistema eficiente para a propagação clonal em massa. Em espécies medicinais como, por exemplo, em *N. foetida*, a obtenção de plantas através desta via tem demonstrado ser uma abordagem interessante, visto que esta espécie se propaga normalmente através de sementes, não havendo relatos sobre sua propagação por estacas ou enxertia (FUZELE; SADTIVE, 2003). A embriogênese somática também tem sido uma alternativa para a preservação de espécies com risco de extinção em conseqüência da exploração excessiva, por apresentarem importantes componentes bioativos com interesse farmacológico. Em *Eleutherococcus chiisanensis*, produtora de saponinas, são necessários mais de 18 meses de estratificação da semente para a germinação de embriões zigóticos, por essa razão o enraizamento de estacas é utilizado como principal forma de propagação, porém, com uma baixa eficiência. Sistemas embriogênicos para a obtenção de novas plantas podem ser cruciais para a conservação dessa espécie (JEONG *et al*., 2005).

Como foi observado, a indução de embriogênese somática *in vitro* pode gerar um processo altamente repetitivo, provavelmente devido à falta de alguns dos controles existentes naturalmente na planta intacta para a formação do embrião, resultando no desenvolvimento de pequenos embriões adicionais a partir dos embriões somáticos primários. Algumas vezes o termo poliembrionia é utilizado para designar a formação desses embriões acessórios ou secundários. Este processo também pode ser chamado de embriogênese repetitiva ou embriogênese somática recorrente sendo possível ocorrer a partir de embriões somáticos originados de diferentes tipos celulares como cultura de anteras, células em suspensão e cultura de calos (GEORGE, 2008). No presente estudo, embriões somáticos transferidos para meio MS ½ apresentaram acentuada taxa multiplicativa que se manteve ao longo de 5 subculturas, além da obtenção de plantas completas fenotipicamente normais em todas as subculturas.

Em relação à cultura de células em suspensão a partir dos calos friáveis obtidos na etapa anterior, observou-se uma diminuição do crescimento celular ao longo das subculturas. Segundo alguns autores, o crescimento celular e a produção de metabólitos em culturas *in vitro*, podem ser inversamente proporcionais, pois muitas culturas iniciam a produção de metabólitos após a diminuição do crescimento celular (COLLIN, 2001, WAI-LENG; LAI-KENG, 2004; MAHARIK *et al.*, 2009). Neste trabalho, as culturas de células em suspensão apresentaram ainda a formação de aglomerados de tamanhos variados ("*clusters*") que se mantiveram apesar da agitação constante dos frascos das culturas, em todas as condições testadas ao longo das subculturas. É importante ressaltar que não é possível obter suspensões com células totalmente dispersas devido à adesão natural da parede celular das células vegetais (GEORGE, 2008). Células em suspensão tendem a se agregar formando grandes aglomerados que são continuamente submetidos ao estresse hidrodinâmico causado pela agitação, necessária à manutenção das culturas (EDAHIRO; SEKI, 2006). Entretanto, certo grau de aglomeração é necessário para o funcionamento do metabolismo celular e alguns estudos relatam que a formação de agregados celulares induz a produção de metabólitos secundários (MADHUSUDHAN; RAVISHANKAR, 1996). Portanto, aglomerados de pequeno tamanho têm sido preferidos para fins biotecnológicos. Por outro lado, Hulst e colaboradores (1989), demonstraram que a resistência ao transporte de gases observada através de partículas grandes causava um decréscimo de oxigênio no centro dos agregados celulares, resultando no aumento da produção de metabólitos secundários. Em culturas de células de morango a concentração de antocianina mostrou ter correlação com o tamanho dos agregados celulares mantidos em suspensão. Assim, o controle do tamanho do agregado celular pode influenciar a produção de produtos de interesse através de culturas de células em suspensão (EDAHIRO; SEKI, 2006), constituindo mais um sistema interessante para pesquisa de metabólitos secundários.

Uma forma de controlar o tamanho dos agregados poderia ser definida através do tratamento com diferentes concentrações de auxinas. Esses fitorreguladores aumentam a especificidade de enzimas que atuam na dissolução da lamela média na parede das células vegetais e quando associadas a baixas concentrações de citocininas podem levar ao aumento da dispersão. Contudo, o uso de baixos níveis de auxina visando à obtenção de células mais dispersas pode manter as células em estado indiferenciado, o que constitui uma desvantagem quando o objetivo da cultura em suspensão é a produção de metabólitos especiais (GEORGE, 2008). Nesse trabalho, as culturas em suspensão originadas de calos não apresentaram aumento de biomassa, mas podem constituir um sistema interessante para a pesquisa de

metabólitos excretados no meio, pois como foi observado, o filtrado das culturas apresentou consistência fortemente espumante indicando a excreção de metabólitos da classe das saponinas para o meio líquido, abrindo uma perspectiva de avaliação desse sistema.

As culturas em suspensão originadas de tecido embriogênico secundário continuaram o processo embriogênico repetitivo em meio líquido e conversão em taxas mais baixas que aquelas obtidas em meios sólidos. Segundo alguns autores, o número de embriões somáticos pode ser aumentado rapidamente em culturas de células em suspensão mantidas sob agitação (FEREOL *et al.*, 2005, VARGAS *et al.*, 2005).

A obtenção de plantas completas a partir dos embriões somáticos no presente estudo demonstrou a possibilidade de utilização desse sistema para a micropropagação dessa espécie. Diferentes tratamentos para aclimatização foram comparados porque plantas cultivadas *in vitro* requerem processo de adaptação ao ambiente *ex vitro* (CAMPOSTRINI; OTONI, 1996) e plantas de *P. alliacea* L. transferidas diretamente do ambiente *in vitro* para *ex vitro* não sobreviveram. A etapa de aclimatização exige cuidados especiais, pois a planta passa de um ambiente onde há baixa transpiração para um novo ambiente onde normalmente ocorre uma alta taxa de transpiração, podendo ocorrer estresse hídrico (SOUZA, 2006). Durante este processo, as plantas sofrem modificações morfológicas, anatômicas e fisiológicas para que sobrevivam ao novo ambiente. Nestas condições, ocorre a passagem de um estado heterotrófico para autotrófico, além disso, a planta é transferida de um estado asséptico ficando sujeita ao ataque de microorganismos (SILVA *et al*., 2007). Neste trabalho, as plantas convertidas em cultura foram aclimatizadas, inicialmente, com o auxílio de campânula ou filme plástico a fim de manter a umidade relativa do ar alta, facilitando as adaptações morfo-fisiológicas necessárias. Como observado em outras espécies, as condições iniciais do processo de aclimatização influenciaram a taxa de sobrevivência e o aumento de biomassa das plantas aclimatizadas (PACHECO *et al*., 2006, SILVA *et al*., 2007). Embora não tenham sido evidenciadas diferenças significativas no número de nós e no comprimento das folhas, as plantas protegidas inicialmente por campânulas apresentaram taxas significativamente maiores de sobrevivência e na largura das folhas, traduzindo a maior expansão da área foliar, provavelmente devido à maior proteção contra o estresse hídrico nesse tratamento, indicando a utilização desse protocolo para a produção de plantas sadias em larga escala a partir de embriogênese somática.

Em relação ao monitoramento fitoquímico entre os sistemas de cultura *in vitro* e plantas de *P. alliacea* das quatro populações mantidas em casa de vegetação durante 02 anos, observou-se diferenças significativas, confirmando que a cultura de tecidos pode alterar as

rotas metabólicas (FONTOURA *et al*., 2005, BAO *et al*., 2008). Um maior número de manchas pode ser observado em extratos eluídos em acetato de etila:acetona:água (25:8:2) em comparação aos extratos eluídos em AcOEt (100), provavelmente devido à maior polaridade dos solventes utilizados como fase móvel, o que possibilitou uma melhor separação das substâncias ocasionando o surgimento de duas outras substâncias deslocadas da origem quando eluídas com acetato de etila:acetona:água.

Sabe-se que plantas apresentam variação quanto à sua constituição genética e atividade fisiológica, ao longo de diferentes gradientes ambientais e mesmo pertencendo à mesma espécie podem responder de forma diferenciada dependo do ambiente em que estão inseridas apresentando, desta forma, variação na produção de metabólitos especiais (CASTRO *et al*., 2001). A variação de fatores como altitude, temperatura, disponibilidade de água, macro e micronutrientes encontrados no solo, pode resultar em variações populacionais, ou seja, indivíduos de uma mesma espécie que possuem diferenças, mesmo que não sejam exteriorizadas, quanto à sua constituição química. Raças químicas, também chamadas de quimiotipos, são caracterizadas por variações populacionais que, apesar de apresentarem fenótipos semelhantes, possuem genótipos diferentes (FERREIRA, 2010). No presente estudo, não foram observadas nas condições descritas, diferenças entre a constituição química nos perfis cromatográficos de folhas de campo obtidas de diferentes populações de *P. alliacea* em ambos sistemas de eluentes, possivelmente, por estarem mantidas por 2 anos em casa de vegetação sob as mesmas condições ambientais, não apresentando desta forma quimiotipos diferentes.

Neste estudo, diferentes amostras apresentaram substâncias semelhantes de coloração roxa no Rf=0,6 em extratos eluídos em acetato de etila:acetona:água, e Rf=0,3 em extratos eluídos com AcOEt (100), o que sugere a presença do mesmo terpenóide nos diferentes sistemas. Várias espécies de plantas possuem terpenos na composição de seus óleos essenciais e estudos demonstram que muitas atividades biológicas destas substâncias, como por exemplo, antimicrobiana, antiinflamatória e analgésica, podem estar relacionadas (CASTRO *et al*., 2001).

Extratos de calo apresentaram manchas menos evidentes em relação aos outros sistemas. Estudos fitoquímicos em diferentes espécies demonstraram diferenças significativas em extratos de calos quando comparados à extratos de plantas mantidas *in vivo* e plantas propagadas *in vitro*. Em *Viguiera discolor*, a análise fitoquímica dos carboidratos indicou maiores quantidades destas substâncias em extratos de raízes quando comparados a extratos de calos (ITAYA *et al*., 2005). Além disso, em *Pimpinella,* gênero produtor de stigmasterol,

importante substância anticancerígena, a análise fitoquímica demonstrou produção superior em extratos de folhas em comparação aos resultados obtidos em extratos provenientes de cultura de calos (ROOSTIKA *et al*., 2007). A maior produção de sustâncias em plantas de campo pode ser entendida, em muitos casos, pela presença de diferentes tipos celulares com diferentes funções e conseqüentemente com metabolismo diferenciado, o que possibilita a produção de maior variedade de substâncias em comparação à cultura de calos, composta por células desdiferenciadas e sem especialização. Além disso, as plantas ficam expostas a diferentes estresses como: competição com outras espécies, alelopatia, herbivoria, ataque de patógenos e intempéries ambientais, que podem levá-las à morte. A produção de metabólitos especiais permitiu a sobrevivência e a seleção de espécies com maior diversidade química.

Algumas substâncias, como por exemplo, hipericinas e hiperforinas, produzidas por *Hypericum perforatum*, exigem a presença de estruturas glandulares para sua síntese (PASQUA *et. al*., 2003, GADZOVSKA *et. al*., 2007). Desta forma, a presença de manchas fracamente expressas nos extratos de células de calos neste trabalho poderia ser uma conseqüência do baixo grau de diferenciação e, consequentemente, baixa produção desses metabólitos, encontrada neste sistema de cultura. Contudo, segundo Collin (2001), muitas vezes a produção de substâncias bioativas pode ser modulada em culturas *in vitro* através da alteração de fatores como composição do meio de cultura e principalmente o ajuste de reguladores de crescimento adicionados no meio, direcionando culturas de calos para a produção de metabólitos com interesse farmacológico.

Em extratos obtidos com calos e embriões somáticos eluídos com acetato de etila:acetona:água, foram observadas manchas com duas colorações semelhantes (amareladas) com mesmo Rf (0,2) sugerindo a presença de flavonóides nestes extratos. Flavonóides apresentam diversas funções, entre elas, ação fungicida e bactericida, sendo muitas vezes indicados como antiinflamatórios e antimicrobianos (CASTRO *et al*., 2001). Alguns medicamentos são fabricados a partir de flavonóides, principalmente para o tratamento de doenças circulatórias, hipertensão e na ação como cofator da vitamina C. Outros estudos sugerem que alguns flavonóides podem ter ação antitumoral, além de atuar como antioxidantes e anti-hemorrágicos (SIMÕES *et al*., 2003).

Manchas mais claras também foram observadas em extratos preparados com raízes de plantas provenientes de embriões somáticos em ambos eluentes, possivelmente pela baixa concentração obtida nos extratos, devido a pouca biomassa produzida nas condições *in vitro* ou porque este tipo celular preconiza outra rota metabólica levando à produção variável dessa substância. A presença de uma nítida mancha (Rf=0,4) de coloração azulada observada

somente em extratos obtidos a partir de embriões somáticos eluídos em acetato de etila:acetona:água, demonstra uma diferença metabólica neste sistema. Estudos fitoquímicos mais aprofundados devem ser realizados para a elucidação estrutural e identificação desta substância.

A cromatografia gasosa com fase gasosa acoplada à espectrometria de massas, realizada com extrato hexânico de raízes de plantas provenientes de embriões somáticos demonstrou a presença do DTS, confirmado através da comparação com o pico obtido através do padrão adquirido comercialmente. A presença de picos semelhantes em extratos de embriões somáticos extraídos com diclorometano e hexano também sugere a produção desta substância neste sistema estabelecido *in vitro*. Além de atividades antifúngica, acaricida e inseticida, diferentes trabalhos têm relacionado o dibenzil trissulfeto a importantes atividades biológicas, como por exemplo, ação antineoplásica com função anti-proliferativa e citotóxica em diferentes linhagens de células cancerígenas (ROSNER, 2001, WILLIAMS *et al*., 2007, URUEÑA *et al*., 2008).

A ocorrência de precursores de DTS tem sido relatada mais freqüentemente em raízes de plantas mantidas *ex vitro*. Um dos principais entraves ao estabelecimento do DTS como droga fitoderivada é o baixo rendimento de extratos utilizando diferentes partes da planta que torna-se um desafio para a utilização ao nível industrial por necessitar de grandes quantidades de substâncias naturais para a fabricação de medicamentos (JOHNSON *et al*., 1997, WILLIAMS *et al*., 1997). Ao contrário da natureza complexa de algumas drogas promissoras usadas para o tratamento do câncer, como o taxol e vimblastina, o DTS apresenta-se como uma molécula simples. Diferentes derivados de DTS já foram sintetizados com sucesso, todos tendo como base o trissulfeto, considerado essencial para a atividade biológica, alguns com alto potencial citotóxico, entre eles o fluorapacin. Modificações estruturais na molécula de dibenzil trissulfeto, podem levar à formação de bis(4-fluorobenzyl) trissulfeto que serve como base para a produção de fluorapacin, disponibilizando uma nova classe de agentes antineoplásicos (BAO *et al*., 2008). Além disso, a transformação química do DTS em metil anidrido sulfônico benzila, originou uma molécula com potente ação anti-fúngica que tem sido utilizada com sucesso na agricultura (WILLIAMS, *et al*., 2007).

Não se tem relatos da ocorrência desta substância em raízes de plantas obtidas a partir de embriões somáticos. A ocorrência de dibenzil trissulfeto em embriões somáticos foi relatada por Webster e colaboradores (2008) em extratos etanólicos de calos rizogênicos/embriogênicos e embriões somáticos que foram submetidos à análise cromatográfica por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), revelando a presença de

DTS em ambos os extratos, sendo as concentrações em embriões somáticos superior aos calos. As concentrações de dibenzil trissulfeto em embriões somáticos, também foram superiores quando comparados às concentrações obtidas, em trabalhos anteriores, com extratos de diferentes tecidos mantidos *in vivo* (WILLIAMS *et al*., 1997). Neste trabalho, a alta taxa multiplicativa obtida através da produção de embriões somáticos primários, pode fornecer uma importante ferramenta para a modulação de dibenzil trissulfeto objetivando uma produção ao nível industrial, tendo em vista que foi possível a identificação de DTS através da cromatografia com fase gasosa nos sistemas *in vitro*. Além de embriões somáticos, cultura de raízes de plantas provenientes de embriões, podem ser estabelecidas visando à otimização da produção de DTS neste sistema.

10 **CONCLUSÃO**

- Foram estabelecidos dois protocolos eficientes de embriogênese somática direta induzida por PIC a 20,0 µM ou 2,4-D a 22,6 µM em explantes foliares de *P.alliacea* L.;

- A origem direta da embriogênese foi determinada, com base na análise histológica, a partir de tecidos próximos ao feixe vascular;

- Os embriões somáticos induzidos diretamente em meio suplementados com PIC se dividem na cultura, estabelecendo um processo de embriogênese secundária crescente, até a quinta subcultura, decaindo após esse período e dando lugar a um processo degenerativo em meio semi-sólido;

- O protocolo para indução de embriogênese somática em presença de PIC permitiu uma freqüência de conversão de plantas (5%) suficiente, em função do grande número de embriões produzidos no sistema;

- A aclimatização de plantas provenientes da conversão de embriões somáticos foi realizada com sucesso e o protocolo utilizando campânulas para manutenção de teores mais elevados de umidade relativa no ambiente *ex vitro*, permitiu a recuperação de plantas em freqüências de 90%;

- As auxinas Picloram e 2,4-D foram os fitorreguladores mais adequados à produção de calos friáveis a partir de explantes foliares de folhas de plantas mantidas *in vitro*;

- Culturas de células em suspensão estabelecidas a partir de calos obtidos em meios suplementados com PIC a 20,0 µM ou 2,4-D a 22,6 µM apresentaram decréscimo de biomassa ao longo das subculturas, constituindo, entretanto, um sistema interessante para pesquisa de metabólitos especiais, com provável produção de saponinas;

- O acompanhamento das suspensões embriogênicas estabelecidas a partir das culturas em PIC a 20,0 µM mostrou uma continuidade do processo de embriogênese secundária ao longo de 120 dias;

- O sistema de solventes que promoveu melhor separação das substâncias na cromatografia em camada delgada, foi acetato de etila:acetona:água (25:8:2) em relação ao acetato de etila (100);

- A análise fitoquímica realizada através de TLC permitiu a visualização de substâncias pertencentes ao grupo dos terpenos em todos os extratos etanólicos e flavonóides em extratos de calo e embriões somáticos eluídos com acetato de etila:acetona:água(25:8:2);

- A presença de uma mancha azulada com Rf=0,2, exclusivamente no extrato de embriões somáticos, requer maior aprofundamento na investigação fitoquímica dos extratos obtidos de diferentes sistemas de cultura dessa espécie.

- A análise fitoquímica dos sistemas de cultura com base na pesquisa de DTS através de GC/MS identificou a presença do marcador nos extratos em diclorometano, a partir de embriões somáticos secos. Nos extratos em hexano a substância foi identificada a partir de embriões frescos e raízes secas, demonstrando o potencial dos sistemas desenvolvidos para a produção dessa substância;

- O sistema de produção de embriões somáticos apresentou maior diversidade de substâncias em comparação com os outros sistemas, quando extratos em diclorometano desse material foram analisados por GC/MS.

11 **PERSPECTIVAS**

- A formação de raízes adventícias diretamente na superfície de explantes foliares inoculados em presença de 2,4-D, disponibiliza um protocolo a ser otimizado, visando ao estabelecimento de cultura de raízes, para investigação fitoquímica;

- A ocorrência de embriogênese somática em explantes foliares, na presença de Picloram e 2,4-D, permite a exploração de novas metodologias no estudo da espécie, visto que sistemas embriogênicos têm sido considerados ferramentas importantes tanto para a micropropagação como na produção de substâncias com interesse farmacológico;

- Apesar da baixa produção de biomassa, as culturas de células em suspensão estabelecidas em presença de PIC e 2,4-D a partir de calos friáveis constituem sistemas promissores para a investigação biossintética futura e as metodologias disponíveis para elicitação podem tornar esse sistema interessante para fins de produção biotecnológica de substâncias bioativas;

- Uma vez definidos os protocolos para a produção, manutenção e multiplicação de germoplasma de *Petiveria alliacea* L. é necessário investir no estabelecimento de protocolos de conservação *in vitro* que possibilitem a conservação segura, em longo prazo, dos genótipos de maior interesse para utilização farmacológica;

- A detecção de uma substância de cor azulada com Rf=0,2, unicamente no extrato de embriões somáticos, requer o aprofundamento da análise fitoquímica visando à identificação da substância, que poderia ser utilizada também como marcador desse sistema, no monitoramento dos processos biotecnológicos de produção vegetal.

12 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ASLAM, J.; MUJIB, A.; NASIM, S.A.; SHARMA, M.P. Screening of vincristine yield in *ex vitro* and *in vitro* somatic embryos derived plantlets of *Catharanthus roseus* L. (G) Don. **Scientia Horticulturae**, v.119, p.325–329, 2009.

BALBUENA, T.S.; SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V.; KATO, M.J.; FLOH, E.I.S. *In vitro* morphogenesis and cell suspension culture establishment in *Piper solmsianum* C. DC. (Piperaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v.23, n.1, p. 274-281, 2009.

BAO, Y.; HE, Y.; XU, X.; MOB, X.; XU, X.; WANG, X.; AN, H. Quantitative determination of anti-tumor agent bis(4-fluorobenzyl) trisulfide, fluorapacin and its pharmaceutical preparation by high-performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 46, p. 206–210, 2008.

BENEVIDES, P.J.C.; YOUNG, M.C.M.; GIESBRECHT, A.M.; ROQUE, N.F.; BOLZANI, V.S. Antifungal polysulphides from *Petiveria alliacea* L. **Phytochemistry**, v.57, p.743–747, 2001.

BOURGARD, F.; GRAVOT, A.; MISELI, E.; GONTIE, E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Science**, v.161, p.839–851, 2001.

CÁCERES, A.; LÓPEZ, B.; GONZÁLEZ, S.; BERGER, I.; TADA, I.; MAKI, J. Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. I. Screening of activity to bacteria, fungi and American trypanosomes of 13 native plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.62, p.195–202, 1998.

CAMPOSTRINI, E.; OTONI, W.C. Aclimaticação de mudas: abordagens recentes. Boletim, **Associação Brasileira de Cultura de Tecidos de plantas**, n.25, p.12, 1996.

CANTELMO, L. **Cultura de tecidos desdiferenciados de *Petiveria alliacea* L. visando à produção de substâncias bioativas**. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) – Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes.Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

CARVALHO, J.M.F.C.; LIMA, M.M.A.; AIRES, O.S.R.; VIDAL, M.S.; PIMENTEL, M.W. Embriogênese Somática. **EMBRAPA Algodão**. Documentos, 152. Campina Grande, Paraíba, 2006.

CASTELLAR, A. **Cultura de tecidos e perfil fitoquímico de *Petiveria alliacea* L.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) – Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

CASTELLAR, A.; GAGLIARDI, R.F.; MANSUR, E. *In vitro* propagation and establishment of callus and cell suspension cultures of *Petiveria alliacea* L., avaluable medicinal plant. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, 2010 [Impresso].

CASTILLO, A.M.; EGANA, B.; SANZ, J.M.; CISTUE, L. Somatic embryogenesis and plant regeneration from barley cultivars grown in Spain. **Plant Cell Reports**, v.17, p.902–906, 1998.

CASTRO, H.G.; FERREIRA, F.A.; DA SILVA, D.J.H.; MOSQUIM, P.R. **Contribuição ao estudo das plantas medicinais:** Metabólitos Secundários.. Minas Gerais: Suprema, 2001. 104 p.

CHANG, C.; CHANG, W.C. Plant regeneration from callus culture of *Cymbidium ensifolium* var. *misericors*. **Plant Cell Reports**, v.17, p. 251–255, 1998.

COLLIN, H.A. Secondary product formation in plant tissue cultures. **Plant Growth Regulation**, v.34, p**.**119–134, 2001.

COUSIN, A.; NELSON, M.N. Twinned microspore-derived embryos of canola (*Brassica napus* L.) are genetically identical. **Plant Cell Reports**, v.28, p.831-835, 2009.

DA SILVA, C. V. **Estudo Morfoanatômico de Embriões Zigóticos e Somáticos de Jabuticaba-Branca (*Myrciara* sp.)**. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia). Universidade Federal de Viçosa, Minas gerais, 2005.

DE SOUZA, J.S. (Coord.) **Enciclopédia agrícola brasileira: C-D.** São Paulo: Edusp, 1998. v.2.

EDAHIRO, J.; SEKI, M. Phenylpropanoid metabolit supports cell aggregate formation in Strawberry cell suspension culture. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.102, n.1, p.8-13, 2006.

FEDER N.; O'BRIEN, T.P. Plant microtechnique: some principles and new methods. **American Journal of Botany**, v. 55, p.123-142, 1968.

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T.; OTVOS, K.; MISZKOLCZI, P. Induction of embryogenic competence in somatic plant cells: a review. **Biologia, Bratislava**, v. 57, n.1, p.5-12, 2002.

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T.P.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.74, p. 201–228, 2003.

FEHÉR, A. Why somatic plant cells start to form embryos? **Plant Cell Monographs**, p. 85-101, 2005.

FEREOL, L.; CHOVELON, V.; CAUSSE, S.; TRIAIRE, D.; ARNAULT, I.; AUGER, J.; KAHANE, R. Establishment of embryogenic cell suspension cultures of garlic (*Allium sativum* L.), plant regeneration and biochemical analyses. **Plant Cell Reports**, v.24, p.319–325, 2005.

FERRER, J.I. Principales referencias etnomédicas sobre el Anamú (*Petiveria alliacea Linn*) y princípios activos encontrados em La planta. Un acercamiento al tema**. Centro Nacional de Investigaciones Cientificas Ciencias Biológicas**, v. 38, n.1, p.27-30, 2007.

FERREIRA, L.S. **Análise de variação populacional e caracterização dos metabólitos secundários presentes nas folhas de Lychnophora granmongolense (Duarte) Semir & Leitão Filho**. Dissertação (Mestrado em Ciências - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

FIRN, R.D. Growth substance sensitivity: the need for clearer ideas, precise terms and purposeful experiments. **Physiologia Plantarum**, v.67, p.267-272, 1986.

FONTOURA, M.C.P.; SILVA, S,N.; ABREU, I.C.; GONÇALVES, J.R.S.; BORGES, M.O.R.; BORGES, A.C.R. Efeito de *Petiveria alliacea* L. na secreção e motilidade intestinal de roedores. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.7, n.2, p.37-43, 2005.

FUZELE, D.P.; SATDIVE, R.K. Somatic embryogenesis, plant regeneration, and the evaluation of camptothecin content in *Nothapodytes foetida*. ***In Vitro*** **Cellular** & **Developmental Biology** - **Plant**, v.39, p.212–216, 2003.

GADZOVSKA, S.; MAURY, S.; DELAUNAY, A.; SPASENOSKI, M.; JOSEPH, C.; HAGÉGE, D. Jasmonic acid elicitation of *Hypericum perforatum* L. cell suspension and effects on the production of phenylpropanoids and naphtodianthrones. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.89, p. 1-13, 2007.

GEORGE, L.; EAPEN, S. High frequency plant regeneration through direct shoot development and somatic embryogenesis from immature inflorescence cultures of finger millet (*Eleusine coracana* Gaertn.). **Euphytica**, v.48, p.269–274, 1990.

GEORGE, E.F. Plant Tissue Culture Procedure – Background. In: GOERGE, E. F.; HALL, M.A.; DE KLERK, G.J. **Plant Propagation by Tissue Culture**. 3th ed. The Netherlands: Springer, 2008. v.1, p. 1-28.

GILANI, A.H.; RAHMAN, A.U. Trends in ethnopharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p.43–49, 2005.

GOMES, P.B.; OLIVEIRA, M.M.S.; NOGUEIRA, C.R.A.; NORONHA, E.C.; CARNEIRO, L.M.V.; BEZERRA, J.N.S.; NETO, M.A.; VASCONCELOS, S.M.M.; FONTELES, M.M.F.; VIANA, G.S.B.; SOUZA, F.C.F. Study of Antinociceptive Effect of Isolated Fractions from *Petiveria alliacea* L. (tipi) in Mice. **Biologial & Pharmaceutical Bulletin**, v.28, n.1, p. 42-46, 2005.

GOMES, P.B. Avaliação dos efeitos centrais e antinoceptivos das frações isoladas da raiz de *Petiveria alliacea* L. (Tipi) em camundongos. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, 2006.

GOTTLIEB, O.R.; KAPLAN, M.A.C.; BORIN, M.R.M.B. **Biodiversidade:** um enfoque químico-biológico. Rio de Janeiro: UFRJ, 1996. 268 p.

GUERRA, M.P.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, J.B. Embriogênese somática e sementes sintéticas, In: A.C. Torres, L.S. Caldas; J.A. Buso. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Ed. da Embrapa, 1999. v. 2. p. 533-568.

GUERRA, M.P.; NODARI, R. **Introdução ao conceito de Biotecnologia**. 2006. [Curso de Agronomia, Apostila de Biotecnologia. Universidade Federal de Santa Catarina].

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow**. Molecular Aspects of Medicine**, v.27, p.1-93, 2006.

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

HIRAOKA, N.; KATO, Y.; KAWAGUCHI, Y.; CHANG, J.I. Micropropagation of *Corydalis ambigua* through embryogenesis of tuber sections and chemical evaluation of the ramets. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.67, p. 243–249, 2001.

HOSTETTAMANN, K.; QUEIROZ, E.F.; VIEIRA, P.C. **Princípios ativos de plantas superiores**. São Carlos: EduFSCar, 2003. 152 p.

HULST, A.C.; MEYER, M.M.T.; BRETELER, H.; TRAMPER, J. Effect of aggregate sizein cell-cultures of *Tagetes-patula* on thiophene production an cell-grow. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.30, p.18-25, 1989.

ITAYA, N.M.; VAZ, A.P.A.; KERBAUY, G.B.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L**.** Produção de frutanos em calos e plântulas clonadas *in vitro* de *Viguiera discolor* Baker (Asteraceae). **Acta Botanica Brasilica**, v.19, p.579-586, 2005.

JEONG,J.H.; JUNG, S.J.; MURTHY, H.N.; YU, K.W.; PAEK, K.Y.; MOON, H.K.; Y.E. CHOI, Y.E. Production of eleutherosides *in vitro* regenerated embryos and plantlets of *Eleutherococcus chiisanensis*. **Biotechnology Letters**, v.27, p.701–704, 2005.

JEONG, C.; CHAKRABARTY, D.; HAHN, E.; LEE, H.; PAEK, K. Effects of oxygen, carbon dioxide and ethylene on growth and bioactive compound production in bioreactor culture of ginseng adventitious roots. **Biochemical Engineering Journal**, v.27, p.252–263, 2006.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique.** McGraw-Hill, New York, 1940.

JOHNSON, L.; WILLIAMS, L. D. A.; ROBERTS, E. V. An insecticidal and acaricidal polysulphide metabolite from the roots of *Petiveria alliacea*. **Journal of Pest Science**, v.503, p.228–232, 1997.

JUNAID, A.; MUJIB, A.; BHAT, M.A.; SHARMA, M.P. Somatic embryo proliferation, maturation and germination in *Catharanthus roseus*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.84, p.325-332, 2006.

KARAMI, O.; DELJOU, A.; POUR, A M. Repetitive somatic embryogenesis in carnation on picloram supplemented media. **Plant Growth Regulation**, v.51, p.33–39, 2007.

KAUR. P.; KOTHARI, S.L. *In vitro* culture of kodo millet: influence of 2,4-D and picloram in combination with kinetin on callus initiation and regeneration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.77, p**.**73–79, 2004.

KIM, S.; KUBEC, R.; MUSAH, R.A. Antibacterial and antifungal activity of sulfur-containing compounds from *Petiveria alliacea* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v.104, p.188–192, 2006.

KINGHORN, A.D.; KENNELLY, E. J.; KIM, N.; WESTERNBURG, H.E. Studies on Some Edible and Medicinal Plants of Mesoamerica. **Proceedings of the Western Pharmacology Society**, v.41, p.253-258, 1998.

KUBEC, R.; MUSAH, R.A. Cysteine sulfoxide derivatives in *Petiveria alliacea*. **Phytochemistry**, v.58, p.981–985, 2001.

KUBEC, R.; KIM, S.; MUSAH, R.A. S-Substituted cysteine derivatives and thiosulfinate formation in *Petiveria alliacea*—part II. **Phytochemistry**, v. 61, p.675–680, 2002.

KUBEC, R.; MUSAH, R.A. γ-glutamyl dipeptides in *Petiveria alliacea*. **Phytochemistry**, v.66, p.2494-2497, 2005.

LIN, Y.; CHANG, C.; CHANG, W. Plant regeneration from callus culture of a *Paphiopedilum* hybrid. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.62, p.21–25, 2000.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2 ed. Instituto Plantarum. Nova Odessa, São Paulo, 576p., 2008.

MADHUSUDHAN, R.; RAVISHANKAR, G.A. Gradient of anthocyanin in cell aggregates of *Daucus carota* in suspension culture. **Biotechnology Letters**, v.18, p.1253-1256, 1996.

MAHARIK, N.; ELGENGAIHIB, S.; TAHA, H. Anthocyanin production in callus cultures of *Crataegus sinaica boiss*. **International Journal of Academic Research**, v.1, n.1, p.30-34, 2009.

MENDOZA, M.G.; KAEPPLER, H.F. Auxin and sugar effects on callus induction and plant regeneration frequencies from mature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.). ***In Vitro* Cellular** & **Developmental Biology - Plant**, v.38, p.39–45, 2002.

MORINI, S.; D'ONOFRIO, C.; G. BELLOCCHI, G.; FISICHELLA, M. Effect of 2,4-D and light quality on callus production and differentiation from *in vitro* cultured quince leaves. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**,v.63, p.47–55, 2000.

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

NONOHAY, J.S.; MARIATH, J.E.A.; WINGE, H. Histological analysis of somatic embryogenesis in Brazilian cultivars of barley, *Hordeum vulgare vulgare*, Poaceae. **Plant Cell Reports**, v.18, p.929–934, 1999.

NUNES, L.G. **Prospeccção Fitoquímica e Avaliação de Mutagenicidade in vitro de Três Espécies Vegetais**: *Strychnos pseudoquina* A. St.-Hill., *Coutarea hexandra* (Jacq.,) K. Schum e *Bathysa cuspidata* (A.St-Hil.) Hook. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola)**.** Viçosa, Minas Gerais, 2008.

OKADA, Y.; TANAKA, K.; SATO, E.; OKAJIMA, H. Antioxidant activity of the new thiosulfinate derivative, S-benzyl phenylmethanethiosulfinate, from *Petiveria alliacea* L. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v.6, p.1097–1102, 2008.

PACHECO, G.; GAGLIARDI, R.F.; COGLIATTI, M.B.; MANHÃES, H.B.; CARNEIRO, L.A.; VALLS, J.F.M.; MANSUR, E. Influence of substrates and *in vitro* preconditioning treatments on *ex vitro* acclimatization of *Arachis retusa*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.1, p.165-169, 2006.

PASQUA, G.; AVATO, P.; MONACELLI, B.; SANTAMARIA, A.R.; ARGENTIERI, M.P. Metabolites in cell suspension cultures, calli, and in vitro regenerated organs of *Hypericum perforatum* cv. Topas. **Plant Science**, v.165, p.977-982, 2003.

PATNAIK, J.; SAHOO, S.; DEBATA, B.K. Somaclonal variation in cell suspension culture-derived regenerants of *Cymbopogon martini* (Roxb.) wats var. *motia*. **Plant Breeding**, v.118, p.351-354, 1999.

PHILLIPS, G.C. *In vitro* morphogenesis in plant – recent advances. ***In vitro*** **Cellular and Developmental Biology**, v.40, n.4, p.342-345, 2004.

QUIROZ-FIGUEROA, F.R.; ROJAS-HERRERA, R.; GALAZ-AVALOS, R.M.; LOYOLA-VARGAS, V.M. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.86, p.285–301, 2006.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v.39, p.603-613, 2001.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 856 p.

REINERT, J. Uber die Kontrolle der Morphogenese und die Induktion von Advetivembryonen an Gewebekulturen aus karotten. **Planta**, v.53, p.318-33, 1959.

RODRIGUES, I.M.C.; SOUZA FILHO, A.P.S.; FERREIRA, F.A. Estudo fitoquímico de *Senna alata* por duas metodologias. **Planta Daninha**, v. 27, n. 3, p. 507-513, 2009.

RODRÍGUEZ, Z.L.; PÉREZ, M.E.G.; DUHARTE, A.B.; PEÑA, O.G.; CASTILLO, A.A. La tableta de anamú: un medicamento herbario inmunoestimulante**. Medisan**, v.8, n.3, p.57-64, 2004.

ROESER, K.R. Die Nadel der Schwarzkierser-Massen product and Kunstwertder Natur **Mikrokosmos**, v.61, p.33-36, 1972.

ROOSTIKA, I.; PURNAMANINGSIH, R.; DARWATI, I.; MARISKA, I. *In vitro* culture manipulation on Pruatjan for secondary metabolite production. **Journal AgroBiogen**, v.3, n.2, p.55-59, 2007.

ROSNER, H.; WILLIAMS, L.A.D.; JUNG, A.; KRAUS, W. Disassembly of microtubules and inhibition of neurite outgrowth, neuroblastoma cell proliferation, and MAP-kinase tyrosine dephosphorylation by dibenzyl trisulphide. **Biochimica and Biophysica Acta**, v.1540, p.166-177, 2001.

SASS, J.E. Elements of Botanical Microtechnique. McGraw-Hill, **Book Company Inc**., Londres, Nova York, 1958.

SHOHAEL, M.A.; ALI, M.B.; YU, E.H.; PAEK, K. Effect of temperature on secondary metabolites production and antioxidant enzyme activities in *Eleutheococcus senticosus* somatic embryos. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.85, p.219-228, 2006.

SHOHAEL, M.A.; ALI, M.B.; ALI, J.E.; PAEK, K. Glutathione metabolism and antioxidant responses during *Eleutherococcus senticosus* somatic embryo development in a bioreactor. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.89, p.121-129, 2007.

SILVA, J.V.; HERNANDEZ, F.F.F.; BEZERRA, F.C.; DINIZ, J.D.N. Aclimatization "*ex vitro*" of anturio seedlings in differents substrates. **Revista Ciência Agronômica**, v.38, n.2, p.188-191, 2007.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVOCK, P.R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5 ed., Porto Alegre, Florianópolis: UFRGS, 2003. 1102 p.

SLATER, A.; FOWLER, M.R.; SCOTT, N.W. **Plant Biotechnology**. 2 ed. Oxford University Press, 400p., 2008.

SOUZA, A.S.; JUNGHANS, T.G. **Introdução à micropropagação de plantas.** Bahia, Cruz das Almas: Embrapa, 2006. 152 p.

STEWARD, F.C.; MAPES, M.O.; MEARS, K. Growth and organized development of cultured carrots. II. Organization in cultures from freely suspended cells. **American Journal of Botany,** v.45, p.705-708, 1958.

STUART, D.A.; NELSEN, J.; NICHOL, J.W. Expression of 7S and 11S alfafa (*Medica sativa*) seed storage proteins in somatic embryos. **Journal of Plant Physiology**, v.132, p.134-139, 1998.

SUDHA G.; RAVISHANKAR, G. A. Involvement and interaction of various signaling compounds on the plant metabolic events during defense response, resistance to stress factors, formation of secondary metabolites and their molecular aspects. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture,** v.71, p.181-212, 2002.

SZYPUŁA, W.; PIETROSIUK, A.; SUCHOCKI, P.; OLSZOWSKA, O.; FURMANOWA, M.; KAZIMIERSKA, O. Somatic embryogenesis and *in vitro* culture of *Huperzia selago* shoots as a potential source of huperzine A. **Plant Science**, v.168, p.1443–1452, 2005.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**, 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TANIGUCHI, S.; IMAYOSHI, Y.; KOBAYASHI, E.; TAKAMATSU, Y.; ITO, H.; HATANO, T.; SAKAGAMI, H.; TOKURA, H.; NISHINI, H.; SUGITA, D.; SHIMURA, S.; YOSHIDA, T. Production of bioactive triterpenes by *Eriobotrya japônica* calli. **Phytochemistry**, v.59, p.315-323, 2002.

TAYLOR, L. **The Healing Power of Rainforest Herbs: A Guide to Understanding and using Herbal Medicinals**. Published by: Square One Publishers, 535p., 2005. Disponível em: http//www.rain-tree.com/paudarco.htm> Acesso em: 24 set. 2010.

TERMIGNONI, R.R. **Cultura de Tecidos Vegetais**. Rio Grande do Sul: UFRGS, 2005.182p.

TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília, DF: Ed. Embrapa, 1998. v.1, 507 p.

TUROLLA, M.S.R.; NASCIMENTO, E.S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42, n.2, p.45-53, 2006.

URUEÑA, C.; CIFUENTES, C.; CASTAÑEDA, D.; ARANGO, A.; KAUR, P.; ASEA, A.; FIORENTINO, S. *Petiveria alliacea* extracts uses multiple mechanisms to inhibit growth of human and mouse tumoral cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.8, n.60, p.1-17, 2008.

VANISREE, M.; LEE., C.Y.; LO, S.F.; NALAWADE, S.M.; LIN, C.Y.; TSAY, H.S. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v.45, p.1-22, 2004.

VARGAS, T.E.; GARCIA, E.; OROPEZA, M. Somatic embryogenesis in *Solanum tuberosum* from cell suspension cultures: histological analysis and extracellular protein patterns. **Journal of Plant Physiology**, v.162, p.449-456, 2005.

VICTÓRIO, P.C.; LAGE, C.L.S. Uso de Plantas Medicinais. **Revista Arquivos FOG – Saúde, Sociedade, Gestão e Meio Ambiente**, v.5, n.1, p.33-41, 2008.

VISHNOI, R.K.; KOTHARI, S.L. Somatic embryogenesis and efficient plant regeneration in immature inflorescence culture of *Setaria italica* (L.). **Beauv Cereal Research Communications**, v.24, p.291–297, 1996.

VON ADERKAS, P.; ROHR, R.; SUNDBERG, B.; GUTMANN, M.; DUMONT-BÉBOUX, N.; LELU, M. Abscisic acid and its influence on development of the embryonal root cap, storage product and secondary metabolite accumulation in hybrid larch somatic embryos. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.69, p.111-120, 2002.

VON ARNOLD, S. Somatic embryogenesis. In: GOERGE, E. F.; HALL, M.A.; DE KLERK, G-J (Eds). **Plant Propagation by Tissue Culture**. 3th ed. The Netherlands: Springer, 2008. v.1, p. 335-354.

WAI-LENG, L.; LAI-KENG, C. Establishment of *Orthosiphon stamineus* cell suspension culture for cell growth. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.78, p.101-106, 2004.

WEBSTER, S. A.; MITCHEL, S. A.; GALLIMORE, W. A.; WILLIAMS, L. A. D.; AHMAD, M. H. Biosynthesis of Dibenzyl Trisulfide (DTS) from somatic embryos and rhizogenous/embryogenic callus derived from Guinea hen weed (*Petiveria alliacea* L.*)* leaf explants . ***In vitro*** **Cellular and Development Biology**, v.44, p.112–118, 2008.

WILLIAMS, L.A.D.; THE T. L.; GARDENER, M. T.; FLETCHER, C. K.; NARAVANE, A.; GIBBS, N.; FLEISHHACKER, R. Immunomodulatory activities of *Petiveria alliacea* L.. **Phytother Res journal articles**, v.11, p.251–253,1997.

WILLIAMS, L.A.D.; ROSNER, H.; LEVY, H.G.; BARTON, E.N. A critical review of therapeutic potential of Dibenzyl Trisulphide isolated from *Petiveria alliacea* L. (Guinea heen weed, anamu). **West Indian Med**., v.56, p.13-17, 2007.

WINK, M. Physiology of secondary product formation in plants. In: CHARLWOOD, B.V., RHODES, M.J.C. (ed.). **Secondary products from plant tissue culture**. Claredon: Oxford, 1990. p.23-41.

XIMENES, S.C.C. **Ensaios toxicológicos pré-clínicos com extrato bruto seco das folhas de *Petiveria alliacea* Linné**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2008.

YEUNG, E.C. Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis. In: THORP, T.A. ***In vitro*** **embryogenesis in plants**. Dordrecht: Kluwer Academic, p.205-247, 1995.

ZIMMERMAN, J.L. Somatic embryogenesis: a model for development in higher plant. **Plant Cell**, v.5, p.1411-1423, 1993.