



MINISTÉRIO DA
**CIÊNCIA, TECNOLOGIA,
INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES**



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA
COORDENAÇÃO DE TECNOLOGIA E INOVAÇÃO
LABORATÓRIO DE BIOPROSPECÇÃO E BIOTECNOLOGIA

CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS DE *Minquartia guianensis* AUBL.
(OLACACEAE) E ISOLAMENTO DO *TRANS*-DECOSIL-4-HIDROXI-3-
METOXICINAMATO

FABIANNE LOPES MORAIS

Manaus-AM

Abril, 2017

FABIANNE LOPES MORAIS

CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS DE *Minquartia guianensis* AUBL.
(OLACACEAE) E ISOLAMENTO DO TRANS-DESCOSIL-4-HIDROXI-3-
METOXICINAMATO

Orientadora: Dra. Cecilia Veronica Nunez.

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa Integrado de Pós-Graduação em Botânica do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia- INPA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração em Botânica.

Manaus- AM

Abril, 2017

M827 Morais, Fabianne Lopes

Cultura de tecidos vegetais de *Minquartia guianensis* Aubl.

(Olacaceae) e isolamento do *trans*-decosil-4-hidroxi-3-metoxicinamato

/ Fabianne Lopes Moraes. --- Manaus: [s.n.], 2017. 80 f.: il. color.

Dissertação (Mestrado) --- INPA, Manaus, 2017.

Orientadora: Cecília Verónica Nunez.

Área de concentração: Botânica.

CDD 583.52

Sinopse:

Estudou-se a cultura de tecidos de uma espécie vegetal de uso medicinal e de elevado valor econômico da região amazônica. Os calos foram obtidos, extraídos, fracionados e gerou o isolamento de uma substância.

Palavras chave: Olacaceae, cultura de tecidos *in vitro*, calo, fitoquímica.



DIVISÃO DOS
CURSOS DE
PÓS-GRADUAÇÃO

AULA DE QUALIFICAÇÃO

PARECER



Aluna: **FABIANNE LOPES MORAIS**
Curso: BOTÂNICA
Nível: Mestrado
Orientadora: CECÍLIA VERÔNICA NUNEZ (INPA)

Título

“CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS IN VITRO DE *Minquartia guianensis* AUBL. E SEU PERFIL FITOQUÍMICO”

BANCA JULGADORA

TITULARES:

LORENA MAYARA CARVALHO DE CURSINO
EDUARDO OSAMU NAGAO
PATRÍCIA MELCHIONNA ALBUQUERQUE

SUPLENTE:

MARIA GRACIMAR PACHECO DE ARAÚJO (UFAM)
EVA MARIA ALVES CAVALCANTI ATROCH (UFAM)

EXAMINADORES	PARECER	ASSINATURA
LORENA MAYARA DE CARVALHO CURSINO	(x) Aprovado () Reprovado	<i>Loirena Mayara de Carvalho Cursosino</i>
EDUARDO OSAMU NAGAO	(x) Aprovado () Reprovado	<i>Eduardo Osamu Nagao</i>
PATRÍCIA MELCHIONNA ALBUQUERQUE	(x) Aprovado () Reprovado	<i>Patricia Albuquerque</i>
MARIA GRACIMAR PACHECO DE ARAÚJO	() Aprovado () Reprovado	
EVA MARIA ALVES CAVALCANTI ATROCH	() Aprovado () Reprovado	

Manaus(AM), 19 de abril de 2016.

OBS:

Michael John Gilbert Hopkins
Coordenador do Programa de



ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA DO INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA

Aos dezoito dias do mês de abril de 2017 às 14:00h, na sala de seminários da Biblioteca INPA-Campus I, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Dr. Júlio Cezar de Souza, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (CPPN/INPA), Dra. Patrícia Melchionna Albuquerque, da Universidade do Estado do Amazonas, Escola Superior de Tecnologia(UEA) e Dra. Daiane Martins, da Universidade Federal do Amazonas(UFAM), tendo como suplentes: Dr. Eduardo Ossamu Nagao, da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e Dra. Maria Gracimar Pacheco de Araújo, da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). Sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**, intitulada: "CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS E PERFIL FITOQUÍMICO DE *Minquartia guianensis* Aubl. (OLACACEAE)" discente: **Fabianne Lopes Morais**, sob orientação: Cecília Verônica Nunez. Após a exposição, dentro do tempo regulamentar, a discente foi argüida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final:

EXAMINADORES	PARECER	ASSINATURA
JÚLIO CEZAR DE SOUZA	<input checked="" type="checkbox"/> APROVADO	<input type="checkbox"/> REPROVADO
PATRICIA MELCHIONNA ALBUQUERQUE	<input checked="" type="checkbox"/> APROVADO	<input type="checkbox"/> REPROVADO
DAIANA MARTINS	<input checked="" type="checkbox"/> APROVADO	<input type="checkbox"/> REPROVADO
EDUARDO OSSAMU NAGAO	<input type="checkbox"/> APROVADO	<input type="checkbox"/> REPROVADO
MARIA GRACIMAR PACHECO DE ARAÚJO	<input type="checkbox"/> APROVADO	<input type="checkbox"/> REPROVADO

Manaus (AM), 19 de abril de 2017.

OBS: _____

Nada mais havendo, foi lavrado a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Dr. Michael John Gilbert Hopkins
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Botânica
PO. 258/ 2014 - DC/BO/ INPA

À minha mãe Maria do Rosário, às minhas queridas irmãs Cinthia, Fabíola e Marcelli, aos meus irmãos Carlos e Robson e ao meu esposo Cristian pelo amor, confiança e apoio na vida e em mais esta jornada. Com amor e gratidão dedico-lhes esta dissertação.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por todas as bênçãos em minha vida e por me dar saúde, força e coragem para enfrentar os mais diversos desafios e por tudo que conquistei até hoje.

Agradeço à minha família, em especial minhas irmãs Fabíola, Marcelli e Cinthia e aos meus irmãos Carlos e Robson pelo amor, carinho, amizade, apoio moral e muitas vezes financeiro desde a graduação e por estarem sempre ao meu lado. Ao meu esposo Cristian por todo amor e apoio e por estar sempre comigo. Aos meus cunhados Romain Studer e Jean Willemin pelo carinho e apoio. À minha querida Mãe Maria do Rosário pelo amor, dedicação e orações e por tudo que sou hoje. Aos meus avós maternos Francisco e Maria (*In memoriam*), por todo amor durante minha infância e adolescência, aos meustios, tias, primos e primas por torcerem e acreditarem em mim.

À minha orientadora Dra. Cecilia Veronica Nunez pela confiança, amizade e ensinamentos científicos valiosos para minha formação intelectual e para este trabalho.

Aos meus amigos, por todos os momentos felizes que passamos juntos, em especial Thayse de Almeida, Fabiana Nunes, Vana Duarte, Cristiane Souza, Karen Samine, Arthur Luís (*In memoriam*), Francina de Almeida, Karen Lima, Regiane Guimarães e Roseli Guimarães.

Aos meus amigos da graduação e da Botânica, pela amizade e pela troca de conhecimento científico que adquirimos juntos ao longo desta caminhada, em especial Alcimara Chames, Fabiele Cruz, Lian Campos, João Paulo.

Aos amigos do Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia, Júlio Souza, Cristine Rescarolli, Sabrina Zanca, Felipe Jesus, Priscilla Pinheiro e Aline Brilhante, Vanessa Santos, David, Lorena Cursino, Maria Carolina de Souza, Maitê Fachin, Weison Lima, Maria Izabel, Taís pela amizade, companheirismo, troca de conhecimento técnico e científico que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Aos professores do PPG de Botânica do INPA, pelos valiosos ensinamentos.

Ao CALTQPN, pelas análises de Ressonância Magnética Nuclear e Espectrometria de massas.

Ao CNPq pela concessão da bolsa e apoio financeiro para o projeto.

Ao INPA pela infraestrutura e amparo, que possibilitou a realização deste trabalho.

“A terra fez brotar a vegetação: plantas que dão sementes de acordo com as suas espécies, e árvores cujos frutos produzem sementes de acordo com suas espécies.
E Deus viu que ficou bom.”

Gênesis 1:12

RESUMO

Minquartia guianensis (Olacaceae) é uma espécie vegetal de elevado valor econômico na região Amazônica, é intensamente explorada pelo setor madeireiro para diversos fins devido à alta durabilidade de sua madeira. A espécie também é utilizada para fins medicinais por índios e populações ribeirinhas, contra infecções intestinais, reumatismo, dores e irritações cutâneas. Estudos químicos relatam a presença de diversas substâncias com grande potencial biológico. O presente trabalho visou obter calos *in vitro* de *M. guianensis* a fim de identificar e isolar as substâncias químicas de seus extratos. Para isto, este trabalho seguiu duas frentes, sendo a primeira com a multiplicação e análise fitoquímica dos calos obtidos de estudos prévios; e a segunda, seguindo as etapas de formação de novos calos a partir de uma nova coleta. Os calos previamente estabelecidos *in vitro*, foram multiplicados em meio de cultura MS (Murashige e Skoog) com reguladores de crescimento, ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e cinetina (CIN). Após secagem e moagem, os calos foram extraídos com diclorometano (DCM), metanol (MeOH) e água (H₂O). O extrato DCM forneceu a substância *trans*-docosil-4-hidroxi-3-metoxicinamato (*trans*-ferulato de docosila). Quanto à formação de novos calos, foram coletadas folhas e sementes de um espécime adulto de *M. guianensis* no INPA, que foram submetidos a processos de desinfestação em fungicida + estreptomicina, etanol 70%, hipoclorito de cálcio e hipoclorito de sódio, onde foi possível obter um protocolo eficiente de desinfestação para os explantes foliares. As sementes foram inoculadas em meio de cultura MS com adição de ácido giberélico (GA₃) e após 120 dias obtiveram-se quatro plântulas. As folhas das plântulas obtidas da germinação *in vitro* e do espécime *in vivo*, foram inoculados em meio de cultura MS 100%; MS 50% e WPM (Wood Plant Medium) adicionado com os reguladores de crescimento 2,4-D e CIN, onde foi possível a formação de calos em todos os tratamentos, porém houve oxidação e morte do tecido foliar em todos os tratamentos. Este é o primeiro relato de cultura de tecidos da espécie *M. guianensis* e do isolamento da substância *trans*-docosil-4-hidroxi-3-metoxicinamato produzida por calos.

Palavras-chave: Olacaceae, cultura de tecidos *in vitro*, calo, fitoquímica.

ABSTRACT

Miconia guianensis (Olacaceae) is a plant species of high economic value in the Amazon region, is intensively exploited by the timber sector for several purposes due to the high durability of its wood. The species is also used for medicinal purposes by Indians and riverine populations, against intestinal infections, rheumatism, pains and skin irritations. Chemical studies report the presence of several substances with great biological potential. The present work aimed to obtain callus *in vitro* of *M. guianensis* in order to isolate the chemical substances from their extracts. For this, this work followed two fronts, being the first with the multiplication and phytochemical analysis of callus obtained from previous studies; and the second, following the steps of formation of new calluses from a new collection. The previously established callus *in vitro* were multiplied in MS culture medium (Murashige and Skoog) with growth regulators 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and kinetin (CIN). After drying and milling, the calluses were extracted with dichloromethane (DCM), Methanol (MeOH) and Water (H₂O). The DCM extract provided the substance *trans*-docosyl-4-hydroxy-3-methoxycinnamate (docosyl *trans*-ferulate). Regarding the formation of new callus, leaves and seeds of an adult specimen of *M. guianensis* were collected at INPA, which were submitted to disinfection in fungicide + streptomycin, 70% ethanol, calcium hypochlorite and sodium hypochlorite, where it was possible to obtain an efficient disinfection protocol for leaf explants. The seeds were inoculated in MS medium with addition of gibberellic acid (GA₃) and after 120 days four seedlings were obtained. The leaves of the seedlings obtained from *in vitro* germination and the *in vivo* specimen were inoculated in 100% MS culture medium; MS 50% and WMP (Wood Medium Plant) added with the growth regulators 2,4-D and CIN, where callus formation was possible in all treatments, but there was oxidation and leaf tissue death in all treatments. This is the first report of tissue culture of the *M. guianensis* species and the isolation of the *trans*-docosyl-4-hydroxy-3-methoxycinnamate substance produced by calluses.

Key words: Olacaceae, *in vitro* tissue culture, callus, phytochemistry.

SUMÁRIO

RESUMO	x
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE FIGURAS	xv
LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS	xix
1. INTRODUÇÃO.....	19
2. REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1. Família Olacaceae.....	21
2.2. <i>Minquartia guianensis</i> Aubl. (Aublet).....	23
2.2.1. Descrição botânica da espécie <i>M. guianensis</i>.....	25
2.2.2. Potenciais biológicos de <i>M. guianensis</i>.....	27
2.3. Cultura de tecidos vegetais	28
2.3.1. Estabelecimento vegetal <i>in vitro</i>	29
2.3.2. Calogênese	31
3. OBJETIVOS.....	34
3.1. Objetivo Geral	34
3.2. Objetivos Específicos.....	34
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1. Material vegetal	35
4.2. Multiplicação de calos	35
4.3. Protocolo de obtenção dos extratos	36
4.4. Análises Cromatográficas e Fracionamentos.....	39
4.5. Estabelecimento de explantes <i>in vitro</i> e indução de calos.....	41
4.6. Pré-desinfestação.....	42
4.7. Desinfestação	42
4.8. Germinação	43

4.9. Indução de calo	44
5.1. Multiplicação de calos	45
5.2. Extração dos calos	47
5.3. Fracionamento cromatográfico do extrato DCM dos calos secos... 51	51
5.4. Identificação estrutural da substância isolada..... 53	53
5.5. Desinfestação	64
5.6. Germinação	66
5.7. Indução de Calo	68
6. CONCLUSÃO	70
7. REFERÊNCIAS	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Reveladores químicos e físicos utilizados nas placas cromatográficas para revelar a presença de diversas classes químicas nos extratos de calos de <i>M. guianensis</i> .	40
Tabela 2: Sistema de eluição e frações coletadas do fracionamento da fração 10-13 do extrato DCM dos calos liofilizados.	41
Tabela 3: Tempos de imersão dos tratamentos de pré-desinfestação de explantes (Folhas e Sementes) de <i>M. guianensis</i> .	42
Tabela 4: Tratamentos de desinfestação de explantes de <i>M. guianensis</i> com diferentes combinações e tempos de imersão em agentes químicos desinfetantes, em câmara de fluxo laminar.	43
Tabela 5: Biomassa obtida dos extratos brutos dos calos secos de <i>M. guianensis</i> .	47
Tabela 6: Dados de RMN de ^{13}C , ^1H e HMBC de <i>trans</i> -docosil-4-hidroxi-3-metoxicinamato em CDCl_3 comparados com a literatura* (ACHENBACH et al., 1985).	56
Tabela 7: Resultados de desinfestação de folhas de <i>M. guianensis</i> .	64
Tabela 8: Tratamentos para a indução de calos de <i>M. guianensis</i> .	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição geográfica da família Olacaceae	21
Figura 2: Distribuição geográfica da espécie <i>Minquartia guianensis</i> Aubl., no Brasil.	24
Figura 3: Espécime de <i>Minquartia guianensis</i>	24
Figura 4: Aspectos morfológicos de <i>M. guianensis</i> : (A) Detalhe das folhas exibindo o padrão de venação e margem íntegra e (B) Ramo com botões florais.	26
Figura 5: Frascos de vidro com tampas de plástico utilizados para a multiplicação de calos de <i>M. guianensis</i> , contendo 20 mL de meio de cultura MS 100% adicionado de 4 mg.L-1 de ácido 2,4-D e 2 mg.L-1 CIN.....	36
Figura 6: Fluxograma do protocolo de extração dos metabólitos secundários presentes nos calos de <i>Minquartia guianensis</i>	37
Figura 7: Fluxograma da preparação dos extratos de calos de <i>Minquartia guianensis</i>	38
Figura 8: Explantes foliares assépticos de <i>M. guianensis</i> , transferidos para meios de cultura: MS (100%); MS (50%) e WPM adicionados de 4 mg. L-1 de 2,4-D e 2 mg. L-1 de CIN para indução de calo.	44
Figura 9: Média da massa de crescimento dos calos de <i>M. guianensis</i> em gramas, pelo tempo em semanas.	45
Figura 10: Multiplicação de calos <i>in vitro</i> de <i>M. guianensis</i> em meio MS 100% adicionado de 4 mg.L-1 de 2,4D e 2 mg. L-1 de CIN.....	46
Figura 11: Fotografia das placas (CCDC) dos extratos brutos DCM dos calos de <i>M. guianensis</i> - calos liofilizados e calos frescos. Eluente: Hexano/AcOEt 6:4.	48
Figura 12: Fotografia das placas (CCDC) dos extratos brutos metanólicos dos calos de <i>M. guianensis</i> - calos liofilizados e calos frescos. Eluente: AcOEt/MeOH 6:4.....	48
Figura 13: Fotografia das placas (CCDC) dos extratos brutos aquosos dos calos de <i>M. guianensis</i> - calos liofilizados e calos frescos. Eluente: MeOH 100%.	49
Figura 14: Espectro de RMN de 1H do extrato bruto (DCM) dos calos seco dos calos de <i>M. guianensis</i> , em CDCl ₃ (60 MHz).....	50

Figura 15: Espectro de RMN de ^1H do extrato bruto (DCM) dos calos frescos dos calos de <i>M. guianensis</i> , em CDCl_3 (60 MHz).	50
Figura 16: Fotografia das placas (CCDC) do extrato bruto DCM dos calos secos de <i>M. guianensis</i> - Eluente: Hexano/AcOEt 6:4.	51
Figura 17: Fotografia das placas (CCDC) das frações do fracionamento (CC) do extrato bruto DCM dos calos secos de <i>M. guianensis</i> - Eluente: Hexano/Acetona 7:3.	52
Figura 18: Fotografia das placas (CCDC) das frações reunidas do fracionamento (CC) do extrato bruto DCM dos calos secos de <i>M. guianensis</i> - Eluente: Hexano/Acetona 9:1.	52
Figura 19: Fotografia das placas (CCDC) das frações reunidas do fracionamento (CC) do extrato bruto DCM dos calos secos de <i>M. guianensis</i> - Eluente: Hexano/Acetona 7:3.	52
Figura 20: Fotografia das placas (CCDC) do fracionamento (CC) da fração 10-13 do extrato bruto DCM dos calos de <i>M. guianensis</i> - calos secos - Eluente: Hexano/Acetona 7:3.	53
Figura 21: Estrutura química da molécula <i>trans</i> -docosil-4-hidroxi-3-metoxicinamato (<i>trans</i> -ferulato de docosila) isolada do extrato DCM dos calos secos de <i>M. guianensis</i>	54
Figura 22: Estrutura da molécula <i>trans</i> -docosil-4-hidroxi-3-metoxicinamato (<i>trans</i> -ferulato de docosil) em azul as correlações HMBC e em vermelho, COSY.	55
Figura 23: Figura 23 - Espectro de RMN de ^1H do <i>trans</i> -docosil-4-hidroxi-3-metoxicinamato isolado dos calos de <i>M. guianensis</i> , em CDCl_3 (300 MHz).	57
Figura 24: Figura 24 - Expansão do espectro de RMN de ^1H do <i>trans</i> -docosil-4-hidroxi-3-metoxicinamato isolado dos calos de <i>M. guianensis</i> , em CDCl_3 (300 MHz).	57
Figura 25: Expansão do espectro de RMN de ^1H do <i>trans</i> -docosil-4-hidroxi-3-metoxicinamato isolado dos calos de <i>M. guianensis</i> , em CDCl_3 (300 MHz).	58
Figura 26: Expansão do espectro de RMN de ^1H do <i>trans</i> -docosil-4-hidroxi-3-metoxicinamato isolado dos calos de <i>M. guianensis</i> , em CDCl_3 (300 MHz).	58
Figura 27: Expansão do espectro de RMN de ^1H do <i>trans</i> -docosil-4-hidroxi-3-metoxicinamato isolado dos calos de <i>M. guianensis</i> , em CDCl_3 (300 MHz).	59

Figura 28: Mapa de contorno do espectro de HSQC do <i>trans</i> -docosil-4-hidroxi-3-metoxicinamato isolado dos calos de <i>M. guianensis</i> , em CDCl ₃ (300 e 75 MHz).....	59
Figura 29: Expansão do mapa de contorno do espectro de HSQC do <i>trans</i> -docosil-4-hidroxi-3-metoxicinamato isolado dos calos de <i>M. guianensis</i> , em CDCl ₃ (300 e 75 MHz).	60
Figura 30: Expansão do mapa de contorno do espectro de HSQC do <i>trans</i> -docosil-4-hidroxi-3-metoxicinamato isolado dos calos de <i>M. guianensis</i> , em CDCl ₃ (300 e 75 MHz).	60
Figura 31: Mapa de contorno do espectro de HMBC do <i>trans</i> -docosil-4-hidroxi-3-metoxicinamato isolado dos calos de <i>M. guianensis</i> , em CDCl ₃ (300 e 75 MHz).....	61
Figura 32: Expansão do mapa de contorno do espectro de HMBC do <i>trans</i> -docosil-4-hidroxi-3-metoxicinamato isolado dos calos de <i>M. guianensis</i> , em CDCl ₃ (300 e 75 MHz).	61
Figura 33: Expansão do mapa de contorno do espectro de HMBC do <i>trans</i> -docosil-4-hidroxi-3-metoxicinamato isolado dos calos de <i>M. guianensis</i> , em CDCl ₃ (300 e 75 MHz).	62
Figura 34: Mapa de contorno do espectro de COSY do <i>trans</i> -docosil-4-hidroxi-3-metoxicinamato isolado dos calos de <i>M. guianensis</i> , em CDCl ₃ (300 MHz)...	62
Figura 35: Expansão do mapa de contorno do espectro de COSY do <i>trans</i> -docosil-4-hidroxi-3-metoxicinamato isolado dos calos de <i>M. guianensis</i> , em CDCl ₃ (300 MHz).	63
Figura 36: Expansão do mapa de contorno do espectro de COSY do <i>trans</i> -docosil-4-hidroxi-3-metoxicinamato isolado dos calos de <i>M. guianensis</i> , em CDCl ₃ (300 MHz).	63
Figura 37: Expansão do mapa de contorno do espectro de COSY do <i>trans</i> -docosil-4-hidroxi-3-metoxicinamato isolado dos calos de <i>M. guianensis</i> , em CDCl ₃ (300 MHz).	63
Figura 38: Estágios de germinação de Sementes de <i>M. guianensis in vitro</i> : A (1° estágio de germinação: fase de “gancho” aos 30 dias). B (2° estágio: fase de haste aos 90 dias). C (plântula na fase-bi-foliar aos 120 dias).....	66

Figura 39: A) explante foliar com formação parcial de calos; B) explantes oxidados e morte do tecido na porção central do explante foliar de *M. guianensis*.....68

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

- 2,4-D – Ácido 2,4 diclofenoxiacético
AcOEt – Acetato de Etila
CaClO – Cloreto de cálcio
CC – Coluna Cromatográfica
CCDC – Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
CDCl₃ – Clorofórmio delterado
Ce(SO₄)₂ – Sulfato cérico
CIN – Cinetina
COSY – Homonuclear Correlation Spectroscopy
DCM – Diclorometano
DMSO – Dimetilssulfóxido
GA₃ – Ácido giberélico
HEX – Hexano
HMBC – Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC – Heteronuclear Single-Quantum Correlation
INPA – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
LC-MS – Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas
MeOH – Metanol
MHz – Mega Hertz
MS – Murashige e Skoog
NaClO – Cloreto de sódio
R_f – Fator de retenção
RMN de ¹³C – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono Treze
RMN de ¹H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
UV – Ultravioleta
WPM – Wood Plant Medium

1. INTRODUÇÃO

Uma das técnicas mais promissoras para o estudo sustentável das plantas é a cultura de tecidos de plantas *in vitro*. Segundo Gonçalves e Romano (2013), a técnica de cultura vegetal *in vitro* é considerada uma ferramenta eficaz para a produção em larga escala de metabólitos secundários de plantas de interesse, sem para isto, pôr em risco populações selvagens de espécies vegetais.

Nesta técnica, utilizam-se inicialmente pequenos fragmentos da planta, denominados explantes, que podem ser retirados de qualquer parte do vegetal, os quais são induzidos sob condições controladas e assépticas a produzir plântulas ou outros tecidos específicos da planta com alto padrão de qualidade genética e sanitária. Esta técnica também possibilita a produção de metabólitos secundários por meio da cultura de plântulas e calos *in vitro* (ULISSES et al, 2010). Estudos atuais revelam que é possível a produção de substâncias de interesse em culturas de calos *in vitro* de forma eficiente (COSTA, P. et al., 2012; KOKOTKIEWICZ, et al., 2012).

A floresta Amazônica é reconhecida como o maior reservatório natural de diversidade vegetal do mundo abrangendo cerca de um terço de todo o estoque genético da Terra (PASTORE JR, 2011). Embora a flora amazônica seja apontada como uma grande fonte de substâncias bioativas, são poucos os estudos realizados em relação a sua natureza química e farmacológica (FORZZA et al., 2010.; BREITBACH et al., 2013) e, além disso, uma grande parte de seus produtos florestais nativos são utilizados de forma não sustentável, acarretando a perda da cobertura vegetal e por consequência extinção da diversidade de espécies de interesse (PEREIRA et al., 2011; SOUZA et al., 2006). Segundo dados do Museu Paraense Emilio Goeldi (FREITAS & MARULL, 2015) o bioma amazônico equivale a um terço das reservas de florestas tropicais úmidas do mundo, e possuem mais de 30 mil espécies de vegetais catalogadas, 10% da flora mundial com cinco mil espécies de árvores.

Estudos fitoquímicos da espécie *M. guianensis* descreveram o isolamento de diversas substâncias biologicamente ativas, tais como: ácido minquartinóico, lichexantona, triterpenos: eritrodiol, eritrodiol esterificado com ácido graxo, betulina, betulina esterificada com ácido graxo, éter derivado do eritrodiol, 13,28-epoxi-3-acetoxi-11-oleaneno, 3 β , 13 β e lupeol, taraxerol, lupen-3-ona e esqualeno, que se

mostraram ativos contra vários tipos de doenças como, por exemplo, o câncer, a malária, o HIV entre outras, por possuírem atividade antitumoral, antifúngica, antiviral, antibacteriana e também, atividade inseticida (MARLES et al., 1989; EL-SEEDI et al., 1994; CURSINO et al., 2009).

Segundo Cursino e colaboradores (2011 e 2012), frações de extratos de *M. guianensis* apresentaram atividade antifúngica contra *Cryptococcus gattii* e atividade antibacteriana contra *Aeromonas hydrophila*; e triterpenos isolados a partir de extratos das folhas e ramos evidenciaram, através de ensaio *in vitro*, atividade parcial contra *Plasmodium falciparum* resistentes à cloroquina. Estes estudos demonstram a importância e o potencial bioativo desta espécie para fornecer substâncias de interesse para uso clínico.

Visando uma possível produção em larga escala de substâncias de interesse de *M. guianensis*, sem prejudicar a existência de suas populações selvagens, este estudo teve como objetivo cultivar calos de *Minquartia guianensis in vitro* para obter extratos, isolar e identificar as substâncias químicas presentes nos mesmos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Família Olacaceae

A família Olacaceae possui uma distribuição pantropical (figura 1) e pertence à ordem Santalales. Desta família, são conhecidas 180 espécies incluídas em 27 gêneros, sendo 13 gêneros e 87 espécies com distribuição neotropical (VICENTINI & ROSSI, 2009).

No Brasil, ocorrem apenas 12 gêneros com 53 espécies, com maior dispersão na Amazônia (FLORA DO BRASIL 2020, 2017). Seus representantes compõem-se de plantas lenhosas, lianas e algumas hemiparasitas, que crescem sobre as raízes de outras plantas (VICENTINI & ROSSI, 2009).

Figura 1: Distribuição geográfica da família Olacaceae



Fonte: TROPICOS, 2017.

Estudos químicos e biológicos, realizados com extratos e substâncias isoladas de várias espécies de plantas da família Olacaceae, mostraram atividades biológicas frente a múltiplas patologias, como exemplo, o ácido minquartinóico, isolados das espécies *Ochanostachys amentaceae* e *Minquartia guianensis*, que se mostrou ativo contra o HIV, *Plasmodium falciparum* e *Leishmania major* (RASHID et al., 2001; MARLES et al., 1989; RASMUSSEN et al., 2000)

Em estudos químicos com plantas da família Olacaceae foram relatados o isolamento e identificação de diversos ácidos graxos, como por exemplo, ácidos palmítico, láurico, mirístico, palmitoléico, esteárico, oléico, linoléico, linolênico, araquidônico, gondôico, behênico, erúcico, lignocérico, nervônico, cerótico de *Curupira tefeensis* (SPITZER et al., 1990), além dos ácidos ximênico, 9(Z),11(Z)-octadecadienoico, 9,11-octadienóico e ácido exocárpico (SPITZER et al., 1991).

O extrato da espécie *Liriosma avata* apresentou potencial anti-inflamatório, porém, substâncias isoladas foram pouco ativas quando testadas em ensaio de microdiluição contra a bactéria *Staphylococcus aureus* (PICERNO et al., 2008). O extrato etanólico de *Strombosia schefferi* possui ação de neuroproteção (SIQUEIRA et al., 2004), sendo que, em outro estudo, apresentou baixa citotoxicidade frente larvas de *Artemia salina* com CL₅₀ maiores que 1000 µg/mL (MOSHI et al., 2009).

Óleos extraídos das sementes de *Scorodocarpus borneensis* foram ativos contra fungos do gênero *Microsporum*, *Acremonium* e também da espécie *Candida albicans* (RABMAN et al., 2002), e seu extrato metanólico mostrou fotocitotoxicidade em estudo *in vitro* frente a células obtidas de humanos com leucemia (HL-60) (ONG et al., 2009). O extrato etanólico de *Ptychopetalum olacoides* possui atividade antidepressiva (PIATO et al., 2009), antioxidante *in vivo* (SIQUEIRA et al., 2007) e atividade contra amnésia (SILVA et al., 2009).

O extrato etanólico das folhas de *Ximenia caffra* var. *caffra* foi testado contra o patógeno *Neisseria gonorrhoeae* e apresentou atividade inibitória de 43,9%, o extrato foi então submetido a uma partição com diclorometano (DCM), que por sua vez apresentou uma ação maior e inibiu em 78,8%, a bactéria. Deste último extrato, foi isolada substância bisnorsesquiterpeno vomifoliol que apresentou atividade significativa de 63,1% contra a bactéria (NAIR et. et al., 2013).

Estudos com os extratos: hexânico, etanólico e metanólico das folhas de *Olax zeylanica* mostraram poderosa ação inseticida contra o inseto-praga *Sitophilus oryzae* (gorgulho) que atacam plantações de arroz. O efeito repelente de mais destaque deste estudo foi do extrato metanólico com 97% de ação, enquanto que em doses mais baixa induziu mais do que 50% de repelência de gorgulhos indicando uma forte ação repelente das folhas pulverizadas (FERNANDO & KARUNARATNE, 2013).

Da espécie *Heisteria silvanii* foi identificado o ácido 9,10-epoxiesteárico (SPITZER et al., 1997). Os ácidos, palmítico, oleico, esteárico, linoleico e ácido

linolênico foram identificados em *Mappia foetida* (HOSAMINI & PATTANASHETTAR, 2005). Em *Onguekoa gore* foram identificados os ácidos isânico e *cis*-octadecenedienóico (GUSTONE et al., 1963). Em *Ptychopetalum olacoides* os ácidos encontrados foram esteárico e palmítico (MONTRUCCHIO et al., 2005).

2.2. *Minquartia guianensis* Aubl. (Aublet)

Dos 27 gêneros da família Olacaceae, *Minquartia* é considerado um gênero monotípico, sendo representado por apenas uma espécie aceita oficialmente, a *Minquartia guianensis* Aubl. (FLORA DO BRASIL 20-20, 2017).

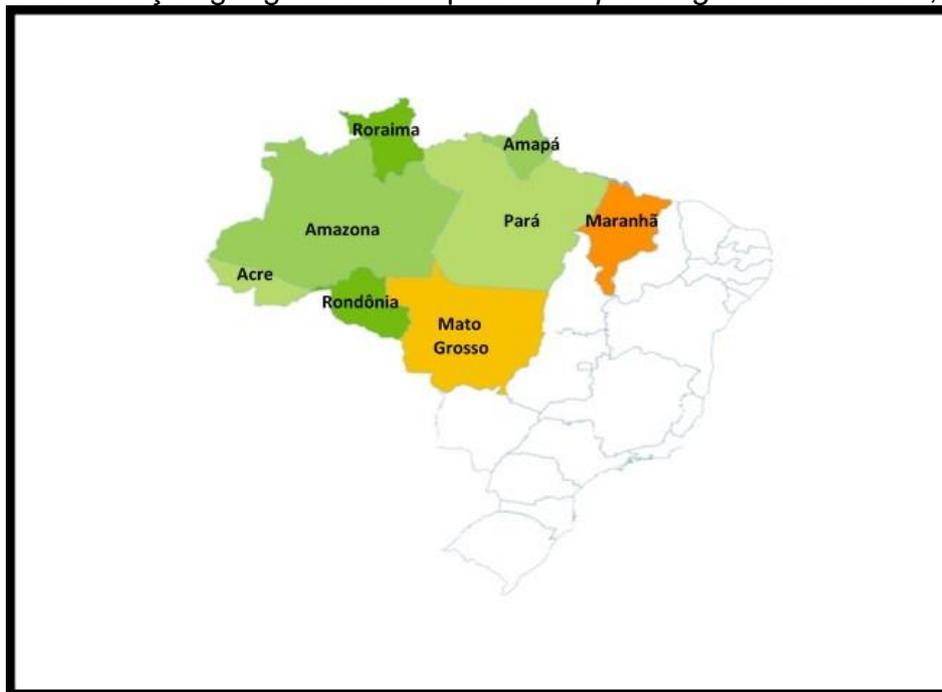
A espécie *M. guianensis* está distribuída em países da América do Sul e América Central. No Brasil, está dispersa nos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia e Roraima (figura 2) (TROPICOS, 2017).

No Brasil é conhecida popularmente como acariquara, acariquara-roxa, acari, arariúba, acachimba e em outros países como: cariquara-negra (Bolívia); arataweri (Caribe); cuajada-negra, manu-negro, palo-de-piedra (Costa Rica); puente-candado, guayacán-negro, minche (Colômbia); guayacán, pechiche (Equador); negrowanania (Guiana); maka, bagui-bagui, bois-de-minquar, Paicoussa-rouge (Guina Francesa); criollo, black-manuwood (Panamá); plátano, manu (Nicarágua); huacapu (Peru); mincoa (Suriname); arekuma (Venezuela (Silva, 2006).

São sinônimas desta espécie: *Eganthus poeppigii* Tiegh, *Endusa punctata* Radlk, *Minquartia macrophylla* Ducke, *M. parvifolia* A.C. Sm., *M. punctata* (Radlk.), *Secretania loranthacea* Müll. Arg (TROPICOS, 2017).

M. guianensis (figura 3) é uma planta de vida longa, perenifólia, que se adapta melhor em ambientes sombreados (criófito), seletiva higrófito, é encontrada em solos arenosos ou argilosos, desde terras baixas até 1000 m de altitude, com precipitação média anual variando de 2500 a 6500 mm e temperatura média anual de 22 a 35 °C. Ocorre predominantemente em matas primárias e secundárias de terra-firme, podendo ser encontrada em menor frequência em matas de galerias e matas de várzeas. (Silva 2006; LORENZI, 2014).

Figura 2: Distribuição geográfica da espécie *Minquartia guianensis* Aubl., no Brasil.



Fonte: FLORA DO BRASIL-2020, 2017.

Figura 3: Espécime de *Minquartia guianensis*.



Fonte: da autoria própria.

2.2.1. Descrição botânica da espécie *M. guianensis*

M. guianensis é uma espécie de grande a médio porte (10-25 m) dotada de copa ovalada pequena. (LORENZI, 2014). Seu tronco é geralmente reto, acanalado e fenestrado (quando adulto), de 40-120 cm de diâmetro, libera um látex branco quando cortado, com casaca fina, base reforçada sem sapopemas (SILVA, 2006), mas, também pode ser encontradas árvores de *M. guianensis* com sapopemas e que podem apresentar troncos não fenestrados perenes (Camargo e Ferraz, 2004).

Os galhos mais grossos são glabros e angulosos e os galhos finos são de cor acinzentada ou ferrugínea, com certa pilosidade (pelos ramificados) e corte transversal circular. A casca é de coloração marrom-acinzentada, com fissuras verticais retas, pequenas placas oblongas e pode apresentar látex. (CAMARGO & FERRAZ, 2004, SILVA, 2006).

As folhas são alternas e simples com margem inteira (figura 4 A), de forma oblonga a elíptica, algumas vezes lanceolada. O ápice é abrupto, curto e acuminado, a base é obtusa a arredondada-truncada e o comprimento das folhas variam de 10-16 cm e a largura de 4-6 cm. As nervuras laterais ocorrem de 10-14 pares, linearmente ascendentes e sub-paralelas entre si, perfazendo curvas antes de chegar à margem. As nervuras são sub-impressas na face adaxial e proeminentes na face abaxial (CAMARGO & FERRAZ, 2004; SILVA, 2006). O pecíolo é acanalado e mede de 2-3 cm. A inflorescência é simples em forma de espigas solitárias, com 2 a 9 cm de comprimento (Figura 4 B), nas axilas foliares das partes terminais dos galhos mais finos, florescendo principalmente entre os meses de junho-julho, o pedúnculo é curto e a raque espessa e possui pubescência ferrugínea (CAMARGO & FERRAZ, 2004; LORENZI, 2014).

As flores são hermafroditas de cor creme e perfumadas, o cálice tem formato de copo medindo 1,5 - 2 mm diâmetro e normalmente possuem de 5 - 6 pétalas, geralmente grupos de 2 a 5 flores são distribuídas irregularmente na raque. A polinização é feita por besouros, abelhas, e, algumas vezes, por pássaros (CAMARGO & FERRAZ, 2004; SILVA, 2006).

Minquartia guianensis apresenta frutificação supra-anual com baixa produtividade e pode levar até uma década para uma alta produção de frutos.

O fruto é do tipo drupa monospérmica e apresenta coloração de acordo com estágio de maturação: inicialmente verde-escuro em seguida amarelo e por último roxo-escuro (quase preto), o formato é elíptico ou ovalado, com base e ápice

arredondados e amadurece principalmente entre julho e agosto, o exocarpo é fino e membranoso, com superfície lisa, glabra, brilhosa, o fruto quando imaturo tem látex abundante e gosto adstringente; ao amadurecer, o mesocarpo carnoso amolece e adquire coloração amarelada e gosto adocicado (CAMARGO et al. 2008; LORENZI, 2014).

Figura 4: Aspectos morfológicos de *M. guianensis*: (A) Detalhe das folhas exibindo o padrão de venação e margem íntegra e (B) Ramo com botões florais.



Fonte: da autoria própria.

O propágulo é em forma de pirênio, sua superfície é marrom clara verrugosa e glabra, consistência lenhosa e peso médio de 1,5 g; formato elíptico, com base arredondada e ápice acuminado, a dispersão dos propágulos é feita por zoocoria, tanto na copa, feita por aves de grande e médio porte, quanto no chão, após a queda natural dos frutos por animais como cutias, veados e ratos que se alimentam dos frutos e os disseminam (CAMARGO & FERRAZ, 2004; SILVA, 2006).

M. guianensis é uma das espécies florestais de grande valor econômico da região Amazônica por conta da durabilidade e densidade de sua madeira, muito resistente à degradação do ambiente devido à presença de substâncias antifúngicas, repelentes ou tóxicas que evitam o apodrecimento e ataques de cupins, e por isso, é muito explorada na região para construção civil, na produção de estacas, mourões, trapiches e postes de iluminação na região Amazônica. Além disso, esta espécie também possui atributos ornamentais, podendo ser empregada

na arborização urbana, devido ao formato do tronco e copa (CAMARGO & FERRAZ, 2004; LORENZI, 2014).

2.2.2. Potenciais biológicos de *M. guianensis*

No Equador, algumas populações indígenas utilizam o chá da casca de *M. guianensis* no tratamento de infecções intestinais, causadas por parasitas, e contra reumatismo, artrite e outras dores musculares e irritações cutâneas (RIBEIRO et al., 1999). As cascas de *M. guianensis* também são utilizadas na produção de um remédio natural, conhecido como Huacapu, que possui atividade antitumoral, anti-helmíntico, anti-inflamatório, antiparasitária, antisséptica, antimalárica, analgésica e purgativa (TAYLOR, 2006).

Na literatura foram relatados diversos estudos fitoquímicos e biológicos desta espécie. Marles e colaboradores (1989) isolaram uma substância citotóxica um poliacetileno, também conhecido como ácido minquartinóico, que apresentou atividade citotóxica em ensaio *in vitro* contra células cancerosas (Leucemia linfocítica P-388). Ácidos graxos e ésteres foram identificados nesta espécie, como o ácido 17-hidróxiesteárico, o ácido (*R*)-*O*-metilmandélico, o éster (-)-(*R*)-*O*-metilmandélico quatro ácidos acetilênicos e o ácido *trans*-14-octadecenóico (MORRIS et al., 1963; RASMUSSEN et al., 2000).

Cursino e colaboradores (2009) isolaram do extrato diclometânico das folhas de *M. guianensis* os triterpenos lupeol, esqualeno, lupen-3-ona e taraxerol, e do extrato diclometânico dos galhos o triterpeno 3- β -metóxi-lup-20-(29)-eno. E em outro estudo, isolaram o ácido minquartinóico, indicando este como sendo o responsável pelo potencial antifúngico contra o patógeno *Cryptococcus gattii* (CURSINO et al., 2011). O ácido minquartinóico foi testado contra algumas doenças tropicais e mostrou ser eficiente contra a malária e a leishmaniose (RASMUSSEN et al., 2000), e o HIV (MARLES et al., 1989).

Vários estudos com a espécie *M. guianensis* já evidenciaram atividades bioativas a partir de extratos da espécie: Quignard e colaboradores (2003) realizaram estudos com os extratos metanólicos das cascas, que mostraram atividade citotóxica frente à *Artemia franciscana*; Ruiz e colaboradores (2011), a partir de estudos com extratos hidroalcoólicos das cascas observaram atividade contra *Plasmodium falciparum*; Cursino e colaboradores (2008), a partir de estudos com

extratos metanólicos e diclometânicos dos galhos, observaram atividade frente a fungos filamentosos dermatofíticos.

Cursino e colaboradores (2011) também avaliaram a atividade antibacteriana de extratos desta espécie frente às bactérias gram-negativas *Shigella flexneri* (M90T), *Salmonella choleraesuis* (6958), *Escherichia coli* (E2348/69), e gram-positivas *Staphylococcus aureus* (33591) resistente à *Staphylococcus aureus* 25923 sensível a meticilina, *Bacillus cereus* 9634, *Bacillus liquefaciens* onde os extratos diclometânicos das folhas foram os que apresentaram inibição frente aos microrganismos. Já Camargo (2011), observou que extratos hexânicos de folhas e galhos de *M. guianensis* se mostraram ativos contra bactérias gram-positivas e *Streptococcus aureus*, enquanto que os extratos metanólicos dos galhos foram ativos contra o fungo *Candida albicans*.

Cursino e colaboradores (2012) avaliaram em ensaio *in vitro* o potencial biológico de frações e substâncias isoladas de extratos de folhas e galhos de *M. guianensis* contra *Plasmodium falciparum* resistente à cloroquina. Neste estudo, o extrato diclorometânico das folhas e três triterpenos isolados apresentaram atividade parcial ou moderada. Dentre as substâncias testadas, o triterpeno taraxerol apresentou atividade significativa (64%) na maior concentração (50 µg/mL), demonstrando o potencial desta espécie para o desenvolvimento de um novo antimalárico.

2.3. Cultura de tecidos vegetais

A cultura de tecidos vegetais pode ser definida como um conjunto de técnicas desenvolvidas para promover o crescimento de células, tecidos e órgãos vegetais em ambiente estéril e controlado (ULISSES et al., 2010).

A micropropagação ou propagação clonal é a área mais importante da cultura de tecidos e aquela de maior impacto (TORRES et al., 1998), pois viabiliza a produção em larga escala de plântulas ou biomassa vegetal em curto espaço de tempo em área reduzida de laboratório, como também pode auxiliar em programas de melhoramento genético de plantas (MORAIS et al., 2012). O processo consiste em inocular fragmentos isolados de tecido vivo, nucleado e não lignificado, denominados explantes desinfestados e cultivados assepticamente, por longos

períodos de tempo em um meio de cultura apropriado (AMARAL & SILVA, 2003; ULISSES et al., 2010).

Esta técnica tem como objetivo realizar a clonagem vegetal para obter uma nova planta idêntica à original, que é definida como uma propagação assexuada. E surgiu como uma ferramenta para a produção em larga escala de biomassa vegetal, para diversos fins, tanto para a agricultura, quanto para a extração de substâncias bioativas de interesse em escala industrial (ULISSES et al., 2010; CID & TEIXEIRA, 2014), entre as quais, se podem citar a vincristina, a vinblastina, a colchicina, o taxol, o forscolina, a artemisinina, as saponinas, entre outras, que são fitoquímicos de interesse em medicina e biologia e tem sido possível produzir em curtos períodos de tempo e movimentar milhares de dólares em todo o mundo (BHATIA et al., 2015).

Sendo assim, essa tecnologia deve ser aprimorada constantemente para que seja capaz de suprir a demanda, além de possibilitar formas alternativas para a exploração sustentável de algumas espécies, principalmente aquelas alocadas em ecossistemas ameaçados (MORAIS et al., 2012; MURTHY et al., 2015).

2.3.1. Estabelecimento vegetal *in vitro*

O estabelecimento *in vitro* é a primeira fase da micropropagação, onde os explantes são inoculados em parcelas assépticas sobre um meio de cultura específico para a sobrevivência dos mesmos. Explante é qualquer parte da planta a ser usado para o cultivo *in vitro* que possua a capacidade de se rediferenciar e se regenerar em tecidos, órgãos ou podendo até mesmo resultar em um novo indivíduo com a mesma carga genética da planta matriz (CID & TEIXEIRA, 2014). O estado fisiológico, a origem e o tipo de explantes (folha, raiz, embrião etc.) da planta matriz são fatores fundamentais para o processo de regeneração dos explantes e para o sucesso da cultura *in vitro* (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

O processo de desinfestação é uma etapa imprescindível para o estabelecimento das culturas *in vitro*, onde consiste em remover contaminantes (microrganismos) existentes na superfície do explante oriundo de material de campo ou casa de vegetação (CID & TEIXEIRA, 2014). Para este processo, podem ser empregadas imersões em substâncias desinfestantes como etanol, substâncias a base de cloro, tais como hipoclorito de sódio e de cálcio, cloreto de mercúrio, ácido clorídrico, peróxido de hidrogênio, alguns ácidos e bases concentrados, entre outros

(SILVA, 2012). A concentração das soluções desinfestantes e o tempo de imersão no tratamento de desinfestação dependem principalmente do tipo de explante a ser desinfestado, pois a exposição prologada deste aos agentes químicos desinfestantes pode danificar ou causar a morte do mesmo.

Para que ocorra o desenvolvimento e o estabelecimento de culturas assépticas *in vitro*, é necessário fornecer aos explantes as condições nutricionais adequadas e a devida sinalização hormonal, para isto, as formulações do meio de cultura combinados com reguladores de crescimento e o ajuste do pH são essenciais (MORAIS et al., 2014). A formulação do meio nutritivo baseia-se nas exigências dos vegetais quanto aos nutrientes minerais, vitaminas e fonte de carbono e estão sujeitos a modificações para atender as necessidades específicas do cultivo *in vitro*, o qual pode variar para cada espécie vegetal em diferentes fases do processo (estabelecimento, enraizamento, multiplicação) (CALDAS et al., 1998; CID & TEIXEIRA, 2014).

O meio de cultura MS desenvolvido por Murashige e Skoog em 1962, é normalmente o mais utilizado em cultura de tecidos e é constituído de sais minerais (micro e macronutrientes), vitaminas, nitrogênio reduzido, ferro, mio inositol entre outras substâncias orgânicas, uma fonte carbono podendo ser suplementado com reguladores de crescimento e adicionado ou não com ágar para meios sólidos ou semissólidos. Porém, existem vários tipos de meios de cultura que como exemplo o meio WPM (Wood Plant Medium) desenvolvido por Lloyd e MaCown (1981) cuja composição de nutrientes é mais diluída e foi formulado para a propagação de espécies lenhosas (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998; CID & TEIXEIRA, 2014).

Segundo Freitas (2009) o crescimento e desenvolvimento de uma planta dependem de sinalização interna e externa que são transportadas de um polo para outro no corpo da planta através dos hormônios vegetais. Os hormônios vegetais são substâncias orgânicas ativas produzidas pelas plantas em baixas concentrações e tem como finalidade induzir respostas fisiológicas, tais como indução de raízes, indução de brotos, alongamento de entrenós, entre outros (CID & TEIXEIRA, 2014). Os hormônios vegetais de ocorrência natural, ou seja, aqueles produzidos pelas plantas (auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico e ácido jasmônico) são denominados fitorreguladores e seus análogos sintéticos (Picloram, TDZ, Benzilaminopurina entre outros) são chamados reguladores de crescimento (HARTMANN et al., 2002).

A utilização de reguladores de crescimento sintéticos no meio de cultura tem como propósito suprir possíveis deficiências endógenas de hormônios nos explantes. As auxinas e citocininas são os reguladores de crescimento mais utilizados em cultura de tecidos, pois promovem o crescimento e a diferenciação celular dos vegetais (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Sendo assim, o tipo de regulador, sua concentração e sua combinação com outros reguladores, podem induzir o desenvolvimento do explante formando novos órgãos, podem induzir a formação de massas de células indiferenciadas, chamados de calos, ou podem induzir a formação de embriões somáticos, processo denominado de embriogênese somática (TORRES, 1998).

2.3.2. Calogênese

O processo de calogênese consiste na formação de calos em tecidos vegetais cultivados *in vitro*. Calo é uma massa de células indiferenciadas que se proliferam de forma desordenada e apresentam certo grau de diferenciação. Os calos se desenvolvem a partir de um pequeno pedaço de órgão de determinada planta e têm a capacidade de se diferenciar em tecidos, órgãos e até embriões, podendo regenerar plantas inteiras. Esta capacidade é explicada pelo conceito da totipotência, onde, teoricamente, qualquer célula vegetal nucleada possui a capacidade de formar uma nova planta (TORRES & CALDAS, 1990; PIERIK, 1990; TERMIGNONI, 2005; ZIMMERMANN, 2014).

Para a indução de calos, qualquer tecido vegetal pode ser utilizado como explante. Entretanto, procura-se utilizar explantes que contenham maior proporção de tecido meristemático ou que apresentem maior capacidade de expressar a totipotência (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Segundo Rodrigues e Almeida (2010), a cultura de calos é desejável para induzir variação somaclonal e estudos fisiológicos, principalmente quando se deseja relacionar a presença de metabólitos secundários com o crescimento celular. Estudos comparativos de metabólitos secundários produzidos em plantas obtidas da natureza com plântulas e/ou calos cultivados *in vitro* tem sido realizados:

- Costa e colaboradores 2012, em estudos de atividade antioxidante realizados com *Thymus lotocephalus*, revelaram que extratos hidroalcoólicos de calos da espécie apresentaram maior concentração

de substâncias antioxidantes, com destaque para o ácido rosmarínico, do que em plantas coletadas no campo;

- Kokotkiewicz e colaboradores 2012 extraíram os flavonoides calicosin-7-O- β -glucosídeo, rotindina e ononina a partir de calos de *Cyclopia subternata* Vogel, que possuem atividade antioxidante, antimutagênica, anticancerígena, fitoestrogênica, antidiabética e redutor de colesterol;
- Rodrigues e Almeida 2010 constataram por meio de triagem fitoquímica, a presença de heterosídeos cardiotônicos em cultura de calos provenientes de segmentos foliares de *Cissus sicyoides* L, que exercem função cardioprotetora.

Para a indução do processo de calogênese, normalmente a concentração e o balanço de auxinas e citocininas são fatores determinantes na diferenciação celular e no padrão de desenvolvimento *in vitro* (GUEYE et al., 2009), onde, explantes oriundos de tecidos jovens, não lignificados, são mais apropriados para a cultura de calo (PIERIK, 1990; TERMIGNONI, 2005).

O cultivo de calos pode ser multiplicado por sucessivas subculturas, podendo permanecer *in vitro* por longos períodos de tempo, e são de grande importância para estudos morfogênicos *in vitro* e para a obtenção de metabólitos secundários, através da suspensão de células, incluindo fármacos, representando uma biotecnologia de grande interesse científico e comercial (RODRIGUES & ALMEIDA, 2010).

Na busca de princípios ativos oriundos de plantas, há um interesse no aprofundamento do conhecimento de espécies vegetais pouco estudadas ou sem estudos prévios, principalmente sobre sua constituição química, visando contribuir com novas alternativas para a produção desses metabólitos secundários de interesse, sem que haja a necessidade de extrativismo excessivo (MURTHY et al., 2015).

Neste sentido, a calogênese é um método eficaz para desenvolver propagação massiva de plantas de interesse por meio de organogênese ou embriogênese somática sendo também útil no cultivo de células para manipulações genéticas como: hibridação somática, poliploidização, modificações nos genes de plantas, além disso, também pode ser utilizada para o cultivo em suspensão celular para o estudo da célula e a síntese de substâncias produzidas pelo metabolismo primário e secundário de vegetais (MORAIS et al., 2012).

Sendo assim, estudos fitoquímicos nos extratos dos calos são necessários para determinar as classes químicas presentes que poderão ser empregados na produção de novos fitoterápicos (SILVA, et al., 2010). Desta forma, torna-se necessário integrar tecnologias que permitam a produção em larga escala e o uso sustentável de espécies de plantas de interesse (NDHLALA et al., 2013).

Tendo em vista a importância do potencial metabólico da espécie vegetal *Minquartia guianensis* diante do exposto, e que até o presente momento não foram encontrados na literatura especializada, estudos relacionado à cultura de tecidos, seja referido à espécie ou à família, que possibilite a produção em larga escala de metabólitos de interesse provenientes de *M. guianensis*, este estudo propôs realizar o estudo *in vitro* da espécie, a fim de produzir calos (massa celular indiferenciada) para obter os extratos, isolar as substâncias presentes e comparar com os constituintes químicos encontrados na planta *in vivo*.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Cultivar calos de *Minquartia guianensis in vitro* para obter extratos, isolar e identificar as substâncias presentes nos mesmos.

3.2. Objetivos Específicos

- Estabelecer um protocolo para desinfestação de explantes de *Minquartia guianensis*;
- Germinar sementes de *M. guianensis in vitro* para obter plântulas axênicas para serem utilizadas como explantes na obtenção de calos;
- Estabelecer uma condição de cultivo para indução de calos *in vitro* de *M. guianensis*;
- Obter massa de calos para obtenção dos extratos e fracionamento cromatográfico; Estabelecer um protocolo de extração dos metabólitos secundários dos calos de *M. guianensis*;
- Realizar a análise fitoquímica e fracionamento cromatográficos dos extratos dos calos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Material vegetal

Para o experimento de multiplicação dos calos foram utilizados calos previamente estabelecidos *in vitro*, provenientes de estudos anteriores, onde foram induzidos a partir de segmentos foliares de um espécime adulto de *Minquartia guianensis*, coletado na Reserva Adolfo Ducke, Manaus/AM, em junho de 2014, onde uma exsicata foi depositada no herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia / INPA, sob número 261555.

Para o estabelecimento das culturas *in vitro* foram utilizados explantes oriundos de segmentos de folhas jovens e sementes de *Minquartia guianensis*, coletados de um espécime situado no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Foi realizado depósito de exsicata do material vegetal coletado no herbário da instituição sob o número 269654.

Portanto, o presente trabalho seguiu duas frentes, sendo a primeira com a multiplicação e fitoquímica de calos obtidos de estudos prévios; e a segunda, seguindo as etapas de formação de novos calos a partir de uma nova coleta.

O estudo foi realizado no Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia - LABB, Coordenação de Tecnologia e Inovação, do INPA.

4.2. Multiplicação de calos

Os calos obtidos da fase de indução *in vitro* realizados anteriormente em um estudo preliminar com a espécie *Minquartia guianensis* foram repicados (oito repiques no total) a fim de se obter uma maior quantidade de biomassa para o estudo fitoquímico. Foram inoculados em frascos de vidro com tampas de plástico (figura 5) contendo 20 mL de meio de cultura MS adicionados de 4 mg.L⁻¹ de ácido 2,4-diclofenoxiacético (2,4-D) e 2 mg.L⁻¹ de cinetina (CIN) adicionado com 30 g.L⁻¹ de sacarose, 7 g.L⁻¹ de ágar. O pH do meio foi ajustado para 5,7 ± 1 antes da autoclavagem. As culturas foram mantidas em sala de crescimento à temperatura de 28 ± 2 °C, sob luz branca e 16 horas de fotoperíodo durante 120 dias com manutenção (troca de meio de cultura) a cada 30 dias. Após 120 dias do início dos experimentos, a massa seca dos calos foi coletada para o processo de extração e análise do perfil fitoquímico de seus metabólitos secundários. A análise dos dados

foi realizada por análise de variância (ANOVA) pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

Figura 5: Frascos de vidro com tampas de plástico utilizados para a multiplicação de calos de *M. guianensis*, contendo 20 mL de meio de cultura MS 100% adicionado de 4 mg.L⁻¹ de ácido 2,4-D e 2 mg.L⁻¹ CIN.



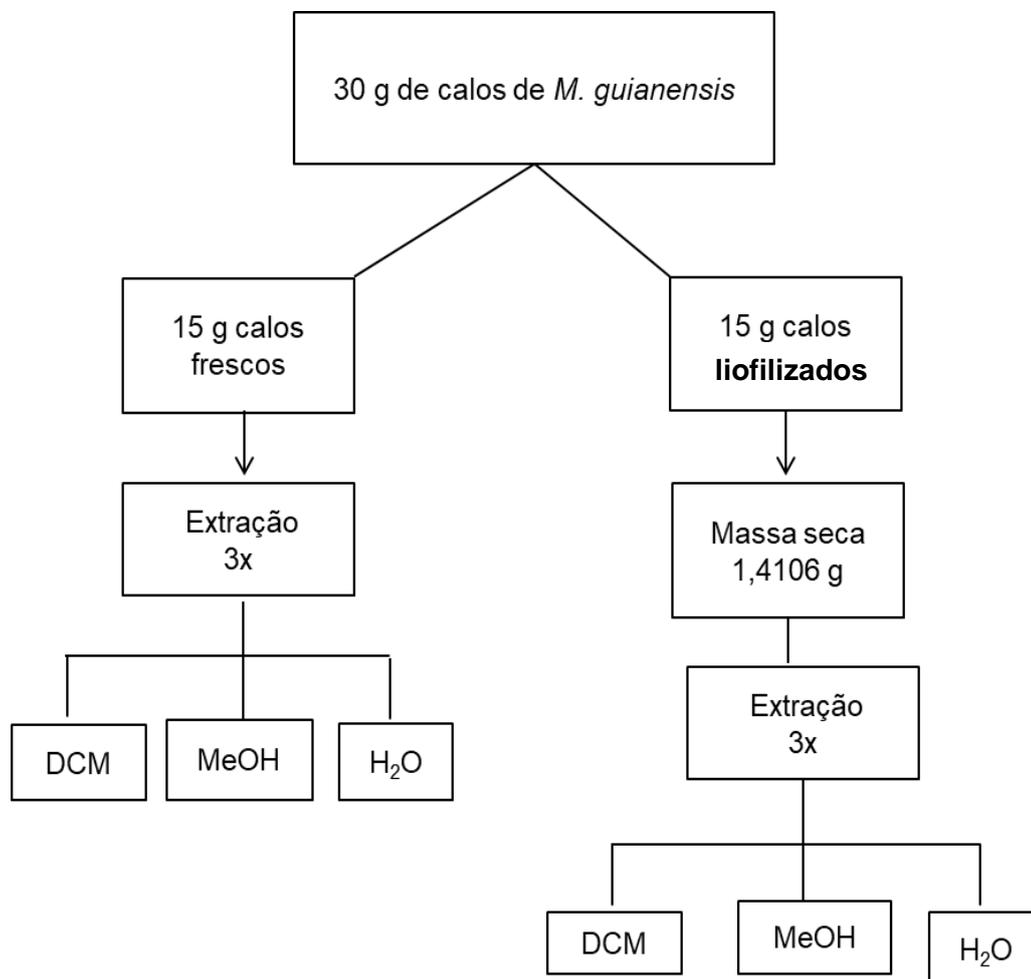
Foto: da autoria própria.

4.3. Protocolo de obtenção dos extratos

Uma vez que este é o primeiro trabalho realizado pelo grupo de pesquisas com calos de *Minuartia guianensis*, foi necessário definir um protocolo para a extração mais eficiente dos metabólitos secundários presentes nos extratos brutos dos calos. Assim, duas metodologias foram avaliadas:

- 1^a) Extração a fresco: onde 15 g de massa fresca de calos foram submetidos diretamente ao processo de extração para a obtenção dos extratos brutos, e
- 2^a) Extração a seco: 15 g de massa fresca foram liofilizados e pesados novamente para estimar a massa seca (figura 6), e posteriormente extraídos com solventes para extração dos metabólitos.

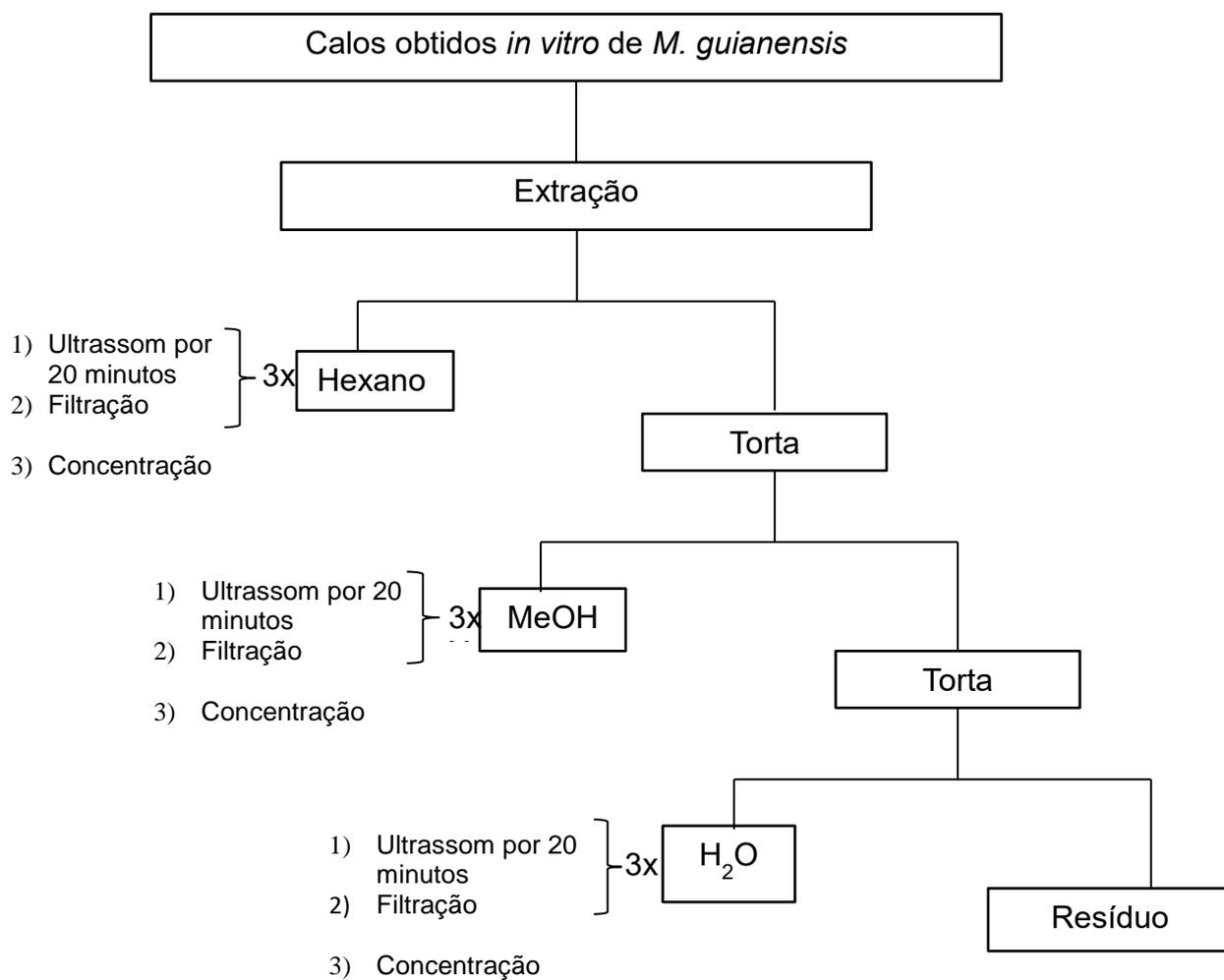
Figura 6: Fluxograma do protocolo de extração dos metabólitos secundários presentes nos calos de *Minquartia guianensis*.



Ambos os materiais (calos frescos e liofilizados) foram macerados com o auxílio de almofariz e pistilo e extraídos com solventes orgânicos em ordem crescente de polaridade como diclorometano (DCM), metanol (MeOH) e água (H₂O). Tanto o material fresco quanto seco foi extraído primeiro com DCM, usando ultrassom por 20 min, filtrado e este procedimento repetido mais duas vezes. Os materiais vegetais (tortas) foram colocados para secar em bandeja ao ar livre (na bancada do laboratório com ar condicionado) e no dia seguinte extraídos com MeOH, utilizando ultrassom por 20 min, filtrados e novamente extraídos com MeOH e ultrassom mais duas vezes. As tortas foram novamente secas em temperatura ambiente e no dia seguinte extraídas com água destilada, usando o mesmo procedimento (figura 7). Os extratos diclorometânicos e metanólicos foram

concentrados em rotaevaporador (modelo FISATOM) e os aquosos foram secos em liofilizador.

Figura 7: Fluxograma da preparação dos extratos de calos de *Minquartia guianensis*.



4.4. Análises Cromatográficas e Fracionamentos

Inicialmente os extratos brutos dos calos foram analisados por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), para verificar as classes químicas presentes e também para comparar os extratos obtidos dos calos frescos e liofilizados. Com o uso de tubos capilares de vidro, alíquotas dos extratos brutos foram aplicadas em placas cromatográficas de sílica gel 60, com indicador de fluorescência UV_{254} , com 0,20 mm de espessura (MACHEREY – NAGEL - MN).

A eluição das cromatoplasmas foi realizada com diferentes combinações e proporções de solventes orgânicos (com grau de pureza comercial) para obter o sistema mais eficiente de separação das classes químicas presentes nos extratos. Após a seleção do sistema mais eficiente de separação, as placas foram analisadas sob a luz ultravioleta (revelador físico) nos comprimentos de onda 254 e 365 nm e com reveladores químicos: sulfato cérico ($Ce(SO_4)_2$), vapores de iodo e anisaldeído sulfúrico (tabela 1). Os extratos brutos também foram analisados por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de 1H (equipamento de 300 MHz - Bruker, modelo Fourier - 300).

Tabela 1: Reveladores químicos e físicos utilizados nas placas cromatográficas para revelar a presença de diversas classes químicas nos extratos de calos de *M. guianensis*.

Reveladores	Classes Químicas
Solução de Anisaldeído sulfúrico	Terpenos, açúcares, esteroides. Considerado revelador universal.
Solução de Cloreto de alumínio	Flavonoides.
Solução de Cloreto ferro III	Substâncias fenólicas.
Solução de Dragendoff	Alcaloides e outras substâncias nitrogenadas.
Solução de DPPH	Substâncias antioxidantes.
Solução de Sulfato cérico IV	Terpenoides.
UV 254 nm	Alcaloides, derivados antroquinônicos, cumarinas.
UV 365 nm	Substâncias aromáticas, cumarinas, antroquinonas, carotenoides, clorofila.
Vapor de Iodo	Ligações duplas.

Após a determinação preliminar do perfil químico dos extratos dos calos de *M. guianensis*, o extrato DCM dos calos liofilizados (secos) foi selecionado para o fracionamento em cromatografia em coluna aberta (CC), com o intuito de isolar as substâncias presentes no mesmo.

O extrato diclorometânico dos calos secos foi fracionado em CC com torneira, medindo 31,5 cm x 1,5 cm, utilizando como fase estacionária sílica gel e eluição com gradiente de hexano (Hex) / acetato de etila (AcOEt) (proporções 95:5; 9:1; 8:2; 7:3; 6:4; 1:1), AcOEt 100%, AcOEt / metanol (MeOH) (9:1; 8:2; 7:3; 6:4; 1:1) e MeOH 100%. O volume de cada sistema consistiu de 200 mL e a massa da amostra utilizada foi de 165 mg para 16,5 g de sílica.

O fracionamento do extrato DCM dos calos secos resultou em 74 frações. Após análise por CCDC, as frações com aspectos químicos semelhantes foram reunidas. A fração nomeada 10-13 foi escolhida para seguir o fracionamento, por mostrar-se interessante quimicamente quando revelada com $Ce(SO_4)_2$, sugerindo a

presença de terpenos, o que é compatível com a literatura consultada (CURSINO et al., 2011). A amostra 10-13 (19,2 mg) foi fracionada em coluna aberta (sem torneira) de 5 mL (12 cm de altura e 0,5 cm de diâmetro) de sílica gel (100-200 mesh – ASTM, Merck), usando gradientes utilizando Hexano/DCM, AcOEt e Acetona, conforme descrito na tabela 2.

Tabela 2: Sistema de eluição e frações coletadas do fracionamento da fração 10-13 do extrato DCM dos calos liofilizados.

Eluente	Frações coletadas
Hexano/DCM 8:2	0-1
Hexano/ DCM 7:3	2-3
Hexano/DCM 1:1	4-5
DCM 100%	6-13
Hexano/AcOEt 9:1	14
Hexano/AcOEt 8:2	15
AcOEt 100%	16
Acetona 100%	17

Assim, a fração 6 foi analisada por RMN de ^1H e de ^{13}C (mono e bidimensionais), e também por Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas (LC-MS). As análises de Ressonância Magnética Nuclear foram realizadas em equipamento de 300 MHz (modelo BRAUKER).

4.5. Estabelecimento de explantes *in vitro* e indução de calos

Devido ao baixo número amostral do experimento realizado em estudos preliminares *in vitro* com a espécie *Minquartia guianensis* e ao não estabelecimento de um protocolo de desinfestação eficiente dos explantes, houve a necessidade de realizar uma nova coleta para desenvolver um protocolo detalhado e eficiente de desinfestação de explantes da espécie para utilizá-los na reprodução da indução e multiplicação de novos calos de *M. guianensis*.

4.6. Pré-desinfestação

Folhas e sementes de *M. guianensis* foram selecionadas e passaram previamente por processo de lavagem em água corrente, utilizando detergente neutro e esponja, e imersão em etanol, antibiótico e fungicida de contato (tabela 3) para retirar os possíveis microrganismos superficiais do material vegetal, para a posterior etapa de desinfestação em câmara de fluxo laminar.

Tabela 3: Tempos de imersão dos tratamentos de pré-desinfestação de explantes (Folhas e Sementes) de *M. guianensis*.

Material Vegetal	Tratamento	Etanol 70% + Tween20	Imersão em fungicida
Folhas jovens	MGF 01	6 min.	17 h
Folhas jovens	MGF 02	6 min.	17 h
Folhas jovens	MGF 03	7 min.	18 h
Folhas jovens	MGF 04	7 min.	18 h
Folhas jovens	MGF 05	5 min.	23 h
Folhas jovens	MGF 06	6 min.	23 h
Folhas jovens	MGF 07	7 min.	24 h
Folhas jovens	MGF 08	7 min.	24 h
Folhas jovens	MGF 09	3 min.	24 h
Sementes	MGS T1	1 min.	2 h

Solução fungicida com 2 g.L⁻¹ de Mancozeb® + Estreptomicina 100 mg.L⁻¹; MGF (*M. guianensis*-folhas); MGS (*M. guianensis*-sementes).

4.7. Desinfestação

Os explantes foliares foram submetidos a diferentes tratamentos de desinfestação em câmara de fluxo laminar com agentes químicos, como: solução fungicida contendo Mancozeb®, antibiótico Estreptomicina e detergente Tween® 20, etanol 70%, hipoclorito de cálcio, hipoclorito de sódio, em diferentes concentrações e combinações, com três lavagens em água destilada e esterilizada entre cada agente desinfestante (tabela 4) e imersos em solução de ácido ascórbico 100 mL⁻¹. Em seguida, os explantes foram inoculados em meio MS 100% semissólido e mantidos

em sala de crescimento à temperatura de 26 ± 2 °C, sob luz branca e 16 horas de fotoperíodo durante 30 dias. A análise dos dados foi realizada por análise de variância (ANOVA) pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

Tabela 4: Tratamentos de desinfestação de explantes de *M. guianensis* com diferentes combinações e tempos de imersão em agentes químicos desinfetantes, em câmara de fluxo laminar.

Material	Vegetal	Tratamento	Tempo de imersão (minutos)		
			Etanol 70%	CaClO (%)	NaClO 2%
Folhas jovens		MGF 01	1 min.	5 min. (3%)	3 min.
Folhas jovens		MGF 02	1 min.	1 min. (3%)	1 min.
Folhas jovens		MGF 03	5 min.	10 min. (4%)	5 min.
Folhas jovens		MGF 04	3 min.	30 min. (5%)	5 min.
Folhas jovens		MGF 05	3 min.	5 min. (4%)	5 min.
Folhas jovens		MGF 06	3 min.	10 min. (6%)	5 min.
Folhas jovens		MGF 07	3 min.	20 min. (4%)	25 min.
Folhas jovens		MGF 08	3 min.	5 min. (4%)	3 min.
Folhas jovens		MGF 09	3 min.	3 min. (4%)	3 min.

MGF (*M. guianensis*-folhas); CaClO (%) (percentagem de hipoclorito de cálcio); NaClO (hipoclorito de sódio).

4.8. Germinação

As sementes foram submetidas aos processos de pré-desinfestação e desinfestação, realizados respectivamente da seguinte forma: foram retirados os tegumentos de 20 sementes e depois lavados com água destilada e esterilizada, em seguida foram imersos em solução de etanol 70% + Tween®20 (3 gotas), sob agitação manual por 1 minuto, e lavados novamente com água destilada e esterilizada por três vezes. Em seguida, foram imersas em solução fungicida Mancozeb® (2 g.L⁻¹) + Estreptomicina (100 mg.L⁻¹) por 2 horas. Dentro da câmara de fluxo laminar, as sementes foram imersas por 1 minuto em etanol 70%, 5 minutos em hipoclorito de sódio 2% (com três lavagens com água destilada e esterilizada entre os agentes químicos) e por fim foram imersas em solução de ácido ascórbico

(100 mg.L⁻¹) e então inoculadas em meio de cultura MS 100% semi-sólido, adicionado de ácido giberélico (GA₃) na concentração 5 mg.L⁻¹. O pH do meio foi ajustado para 5,7± 1 antes da autoclavagem. As culturas foram mantidas em sala de crescimento à temperatura de 26 ± 2 °C, sob luz branca e 16 horas de fotoperíodo por 120 dias, com avaliação a cada 30 dias. As sementes assépticas germinadas e não germinadas foram transferidas para um novo meio de cultura MS100% acrescido de uma concentração de 10 mg.L⁻¹ de ácido giberélico (GA₃) e mantidas em cultivo por mais 120 dias. Ao final dos 120 dias do cultivo, as sementes que não iniciaram o processo de germinação foram consideradas inviáveis e foram descartadas.

4.9. Indução de calo

Os explantes foliares vivos e assépticos de *M. guianensis* (figura 7), obtidos no processo de desinfestação, foram transferidos para outro meio de cultura, dando início ao processo de indução de calos. Os meios de cultura utilizados para a indução dos calos foram o MS (100%), MS (50%) e WPM, adicionados com 4 mg.L⁻¹ de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e 2 mg.L⁻¹ de cinetina (CIN).

As culturas foram mantidas em sala de crescimento à temperatura de 26 ± 2 °C, sob luz branca e 16 horas de fotoperíodo. O delineamento experimental foi casualizado, com 24 repetições, onde cada repetição constou de um tubo de ensaio contendo um segmento de folha (figura 8). A análise dos dados foi realizada por análise de variância (ANOVA) pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

Figura 8: Explantes foliares assépticos de *M. guianensis*, transferidos para meios de cultura: MS (100%); MS (50%) e WPM adicionados de 4 mg. L⁻¹ de 2,4-D e 2 mg. L⁻¹ de CIN para indução de calo.

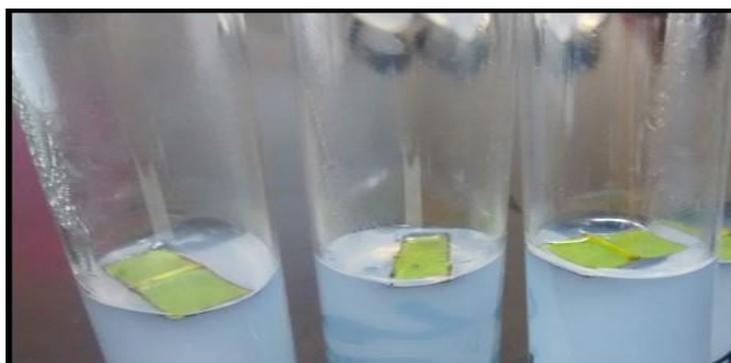


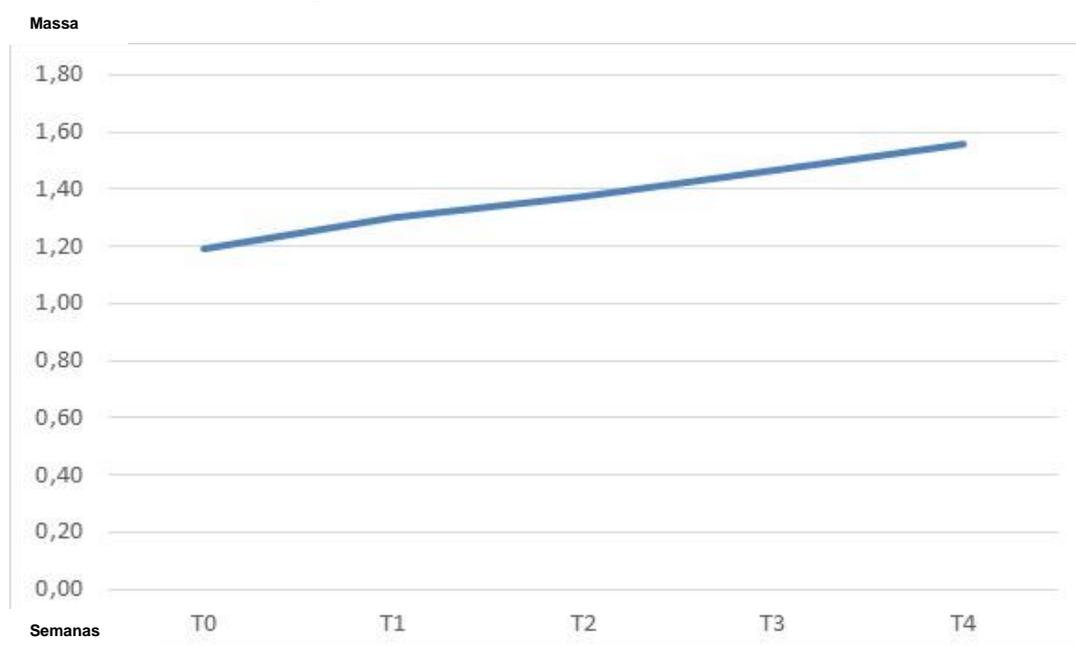
Foto: da autoria própria.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Multiplicação de calos

O meio de cultura MS 100%, adicionado de 4 mg.L^{-1} de 2,4-D e 2 mg.L^{-1} de CIN, promoveu a multiplicação de calos em *M. guianensis* no decorrer de quatro semanas (T1 a T4). Como podemos observar no gráfico abaixo (figura 9), observou-se um incremento de massa, em gramas, durante o período de 30 dias de cultivo dos calos. Pode-se observar a formação de uma curva de crescimento exponencial com o passar das semanas, porém não se observa uma fase lag, característica de multiplicação de calos. A ausência da fase lag já foi relatada anteriormente em culturas embriogênicas e de agregados celulares de *Ocotea catharinensis* (OLMEDO, 2005; GARCIA, 2005), onde as culturas apresentaram um modelo tipicamente exponencial de crescimento durante todo o período de avaliação.

Figura 9: Média da massa de crescimento dos calos de *M. guianensis* em gramas, pelo tempo em semanas.

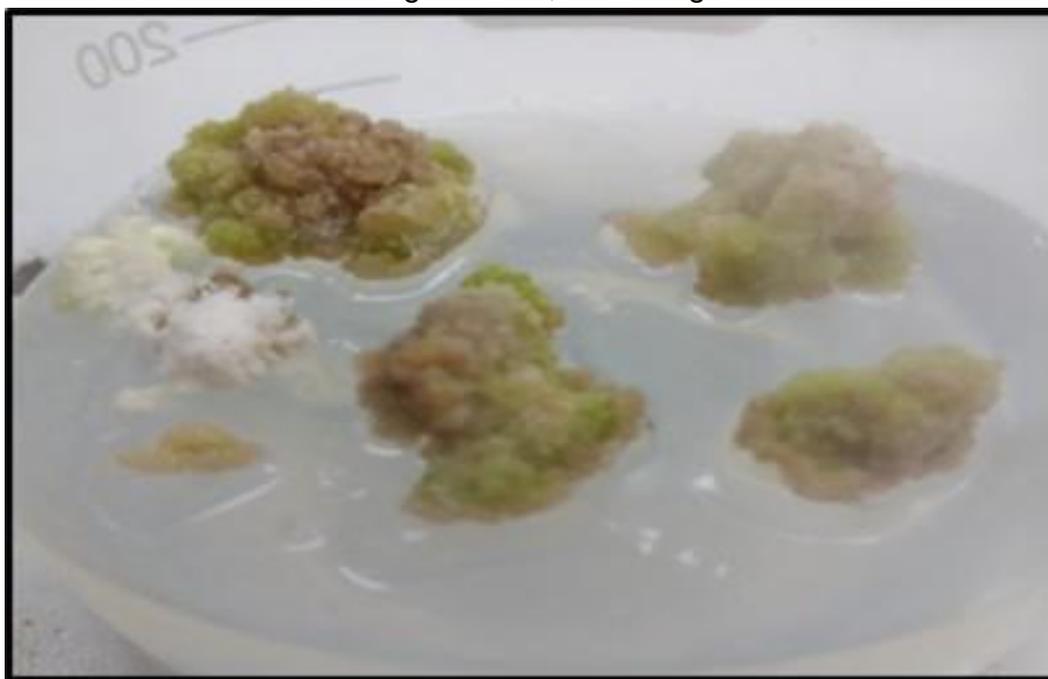


Não foi possível inferir a fase estacionária, pois os calos após o período de 30 dias começam a apresentar oxidação, característico de morte do tecido, sendo necessário o repique dos mesmos. Outros autores também relatam a necessidade de repique para conservar a integridade dos calos, como em culturas embriogênicas

de *Ocotea catharinensis* que foram subcultivadas durante a sua fase de crescimento exponencial, entre a terceira e quarta semanas de cultivo, mostrando melhor crescimento (RESCAROLLI, 2011); culturas de *Picea glauca-engelmannii* e *Picea mariana* também demonstraram a necessidade de serem subcultivadas, durante a fase de crescimento exponencial, o que possibilitou condições de cultura mais estáveis (LULSDORF et al., 1992).

Como visto neste estudo, a combinação da auxina 2,4-D e a citocinina CIN, na concentração utilizada, foi eficiente na multiplicação dos calos de *M. guianensis* (figura 10).

Figura 10: Multiplicação de calos *in vitro* de *M. guianensis* em meio MS 100% adicionado de 4 mg.L-1 de 2,4D e 2 mg. L-1 de CIN.



Para que ocorra a formação de calos, é necessário um balanço entre auxina e citocinina, o mesmo pode ser dito com relação à multiplicação dos calos, visto que o meio utilizado na fase de multiplicação neste estudo é o mesmo utilizado na indução dos calos feito no estudo anterior. O tipo e a concentração de reguladores de crescimento no meio de cultura são fatores determinantes no crescimento e no padrão de desenvolvimento na maioria dos sistemas de cultivo *in vitro* (HARTMANN et al., 2002). Diversos autores recomendam o uso de 2,4-D em conjunto com uma citocinina tanto para a indução quanto para a multiplicação de calos (GRATTAPAGLIA & MACHADO 1990; MACIEL et al., 2003 GEORGE, et al., 2008; JARDIM et al., 2010; COSTA et al., 2015).

Em cultura de tecidos, a combinação de citocininas e auxinas são comumente utilizadas para obtenção de calogênese. As auxinas exercem papel-chave na desinfestação celular, pois é o principal hormônio vegetal que atua no processo de divisão diferenciada das células vegetais tanto *in vivo* como *in vitro*, sendo o 2,4-D umas das auxinas mais utilizadas em processos de indução de calos (CAMPOS et al., 2009).

A produção de calos pode ser induzida apenas pela adição de auxina, que são capazes de iniciar a divisão celular e controlar os processos de crescimento e alongação celular (NOGUEIRA et al., 2007), mas, a adição de citocinina pode aumentar a proliferação celular e conseqüentemente aumentar a quantidade de massa do calo (TISSERAT, 1985). O balanço de auxina e citocinina devem ser ajustados até que se encontrem as concentrações apropriadas para que a massa de calo cresça.

5.2. Extração dos calos

A massa fresca bruta total obtida do processo de multiplicação dos calos de *M. guianensis* foi de 503,2072 g, que após o processo de liofilização (secagem) rendeu 58,0403 g de massa seca que foi submetida ao processo de extração com diclorometano, metanol e água.

As massas obtidas dos extratos dos calos de *M. guianensis* estão descritas na tabela 5.

Tabela 5: Biomassa obtida dos extratos brutos dos calos secos de *M. guianensis*.

Extrato bruto dos calos	Massa bruta fresca (g)	Massa seca para extração (g)	Massa final (g)
DCM	503,2072	58,0403	0,691.5
MeOH		42,5019	4,789
Aquoso		12,5167	2,6858

O método de extração mais eficiente foi aquele em que os calos foram previamente liofilizados (secos) antes de serem extraídos com solventes.

Os extratos frescos e liofilizados mostraram-se aparentemente idênticos quando analisados em CCDC (figuras 11, 12 e 13), onde os extratos brutos não apresentaram diferenças visíveis entre si. Estes eluíram igualmente nas placas cromatográficas e apresentaram o mesmo fator de retenção (R_f) das manchas e também a mesma coloração quando revelados com os reveladores químicos anisaldeído sulfúrico, iodo e sulfato cérico e quando observadas em luz UV - 254 e 365 nm.

Figura 11: Fotografia das placas (CCDC) dos extratos brutos DCM dos calos de *M. guianensis* - calos liofilizados e calos frescos. Eluente: Hexano/AcOEt 6:4.

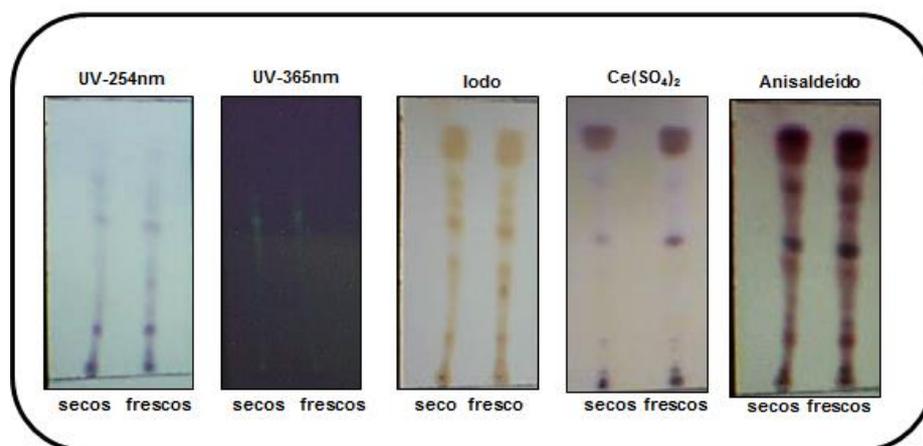


Figura 12: Fotografia das placas (CCDC) dos extratos brutos metanólicos dos calos de *M. guianensis* - calos liofilizados e calos frescos. Eluente: AcOEt/MeOH 6:4.

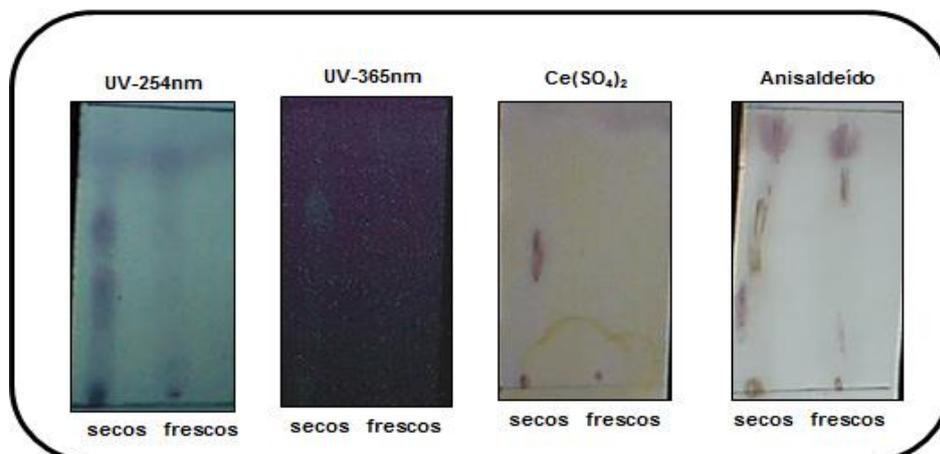
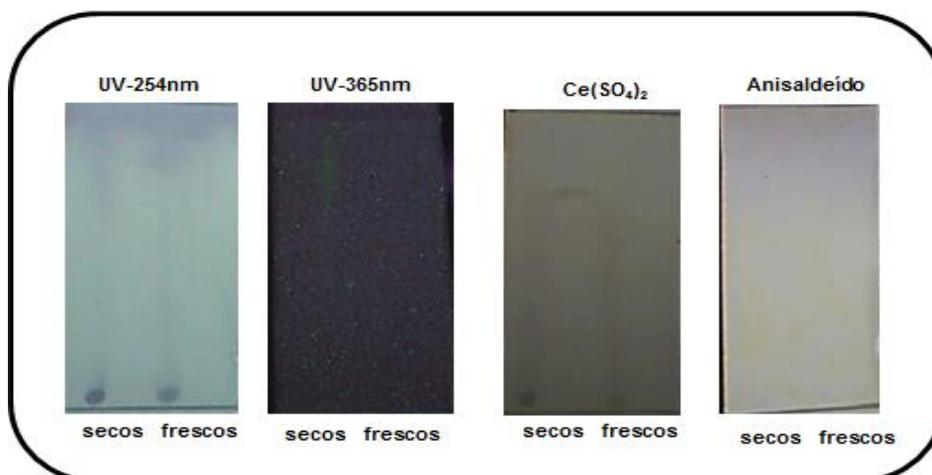


Figura 13: Fotografia das placas (CCDC) dos extratos brutos aquosos dos calos de *M. guianensis* - calos liofilizados e calos frescos. Eluente: MeOH 100%.



Porém, quando submetidos à diluição em solventes deuterados como clorofórmio-d e DMSO-d₆, os extratos brutos obtidos dos calos frescos formaram precipitados, dificultando a sua diluição enquanto, os extratos liofilizados dissolveram totalmente, viabilizando sua análise em técnicas espectroscópicas (figuras 14 e 15).

Acredita-se que tal interferência pode estar ligada com o fato de a água ser um solvente muito polar e provavelmente por conta disso, interferiu no processo de solubilização dos extratos que não foram liofilizados antes do processo de extração.

Figura 14: Espectro de RMN de ^1H do extrato bruto (DCM) dos calos seco dos calos de *M. guianensis*, em CDCl_3 (60 MHz).

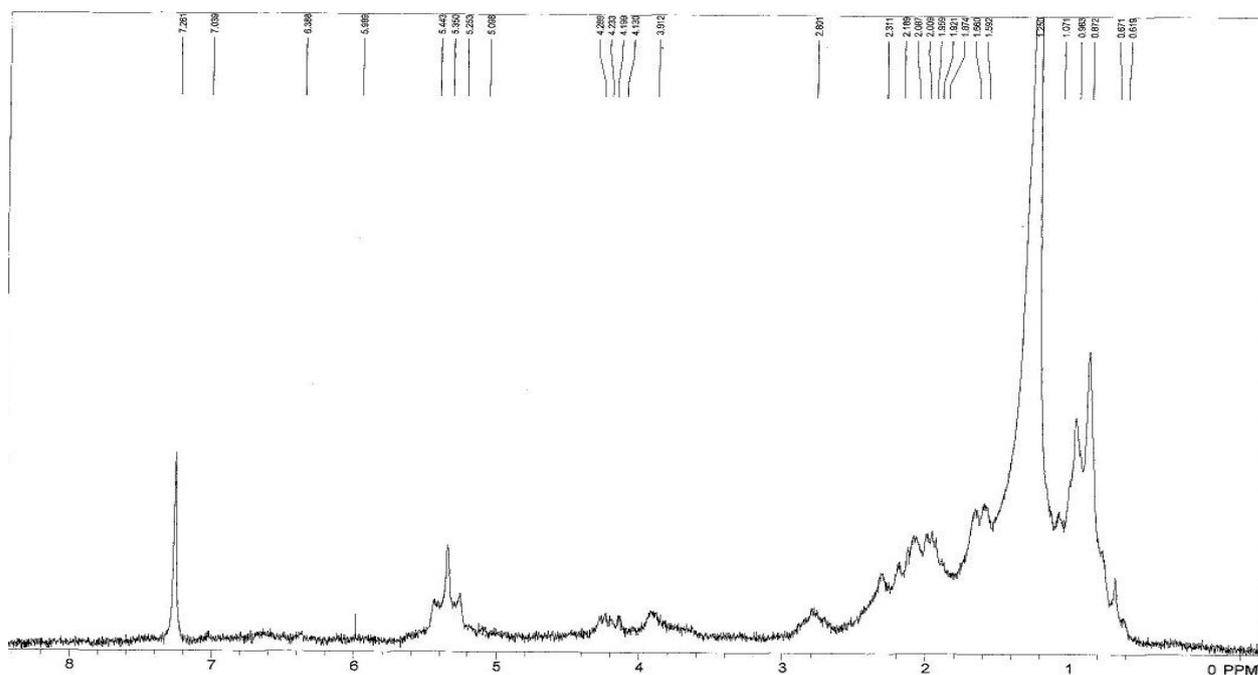
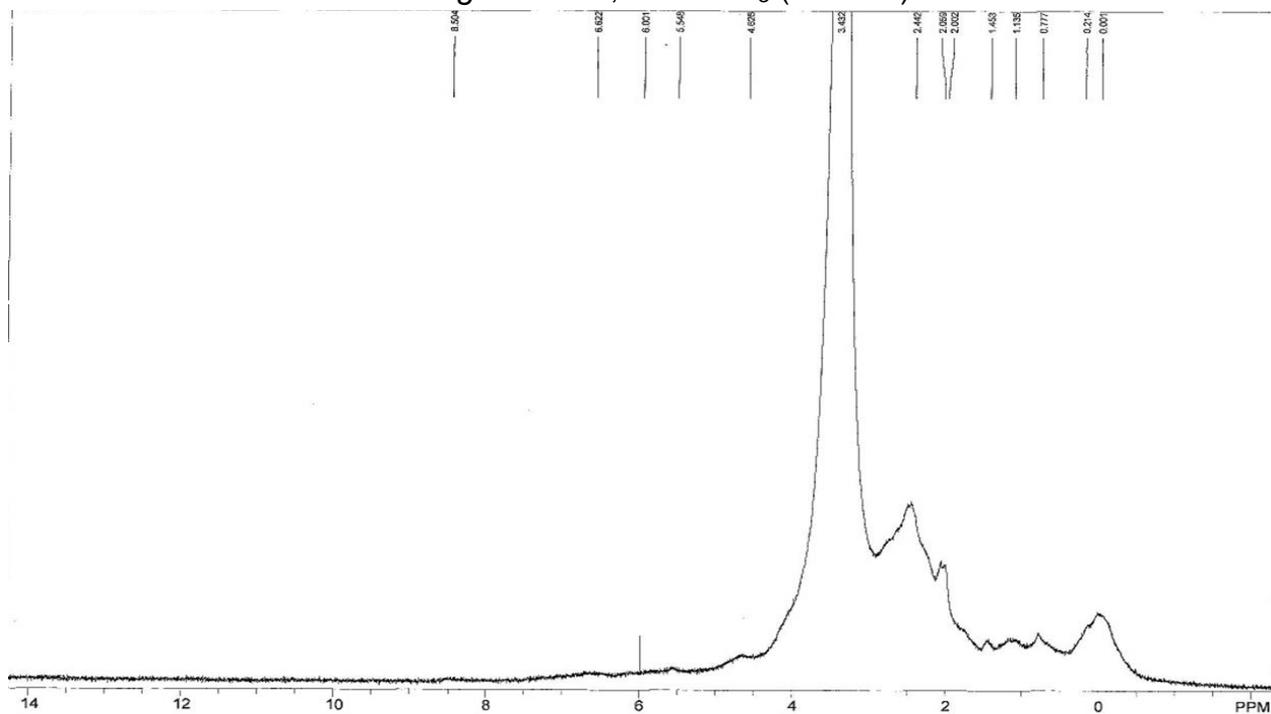


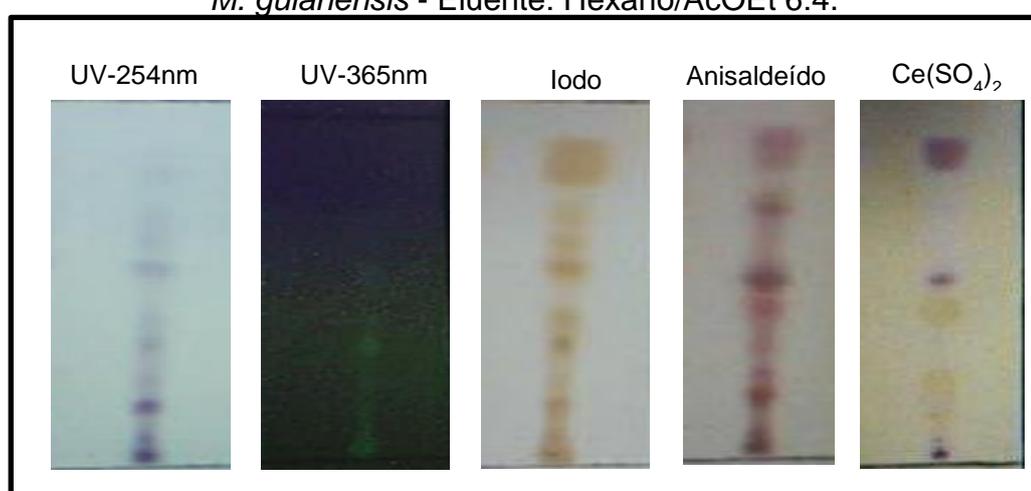
Figura 15: Espectro de RMN de ^1H do extrato bruto (DCM) dos calos frescos dos calos de *M. guianensis*, em CDCl_3 (60 MHz).



5.3. Fracionamento cromatográfico do extrato DCM dos calos secos

O extrato DCM dos calos secos foi analisado por CCDC e revelado para determinar possíveis classes químicas presentes. O sulfato cérico revelou a presença de substâncias características de terpenos no extrato DCM apresentando coloração roxa na placa (figura 16). O sistema de eluição utilizado foi Hex/AcOEt 6:4.

Figura 16: Fotografia das placas (CCDC) do extrato bruto DCM dos calos secos de *M. guianensis* - Eluente: Hexano/AcOEt 6:4.



Cursino (2011) também verificou a presença de terpenoides em extratos brutos DCM de folhas e galhos de *M. guianensis in vivo* coletados em meses distintos, utilizando como revelador químico sulfato cérico, eluídos com Hex/AcOEt 6:4.

Foram coletadas 74 frações do extrato bruto que foram analisadas novamente em CCDC e as frações quimicamente semelhantes foram reunidas (figuras 17, 18 e 19).

Figura 17: Fotografia das placas (CCDC) das frações do fracionamento (CC) do extrato bruto DCM dos calos secos de *M. guianensis* - Eluente: Hexano/Acetona 7:3.

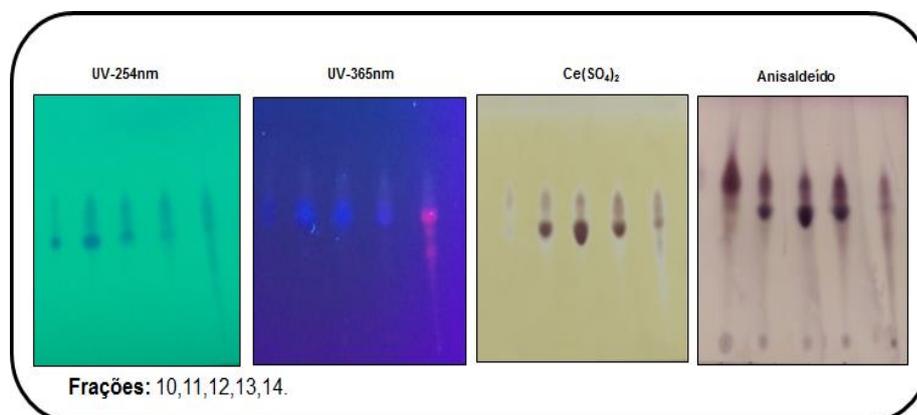


Figura 18: Fotografia das placas (CCDC) das frações reunidas do fracionamento (CC) do extrato bruto DCM dos calos secos de *M. guianensis* - Eluente: Hexano/Acetona 9:1.

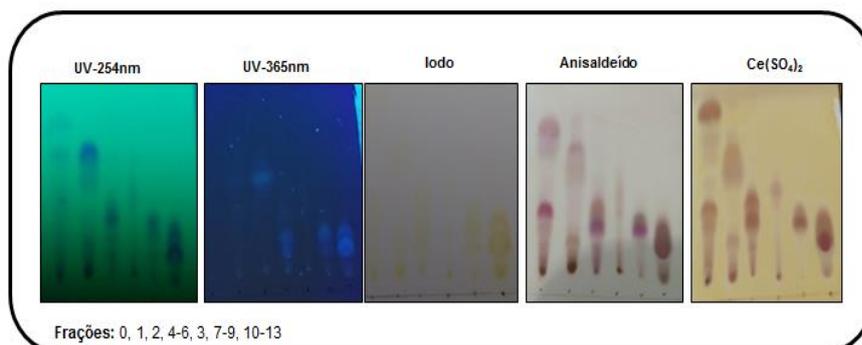
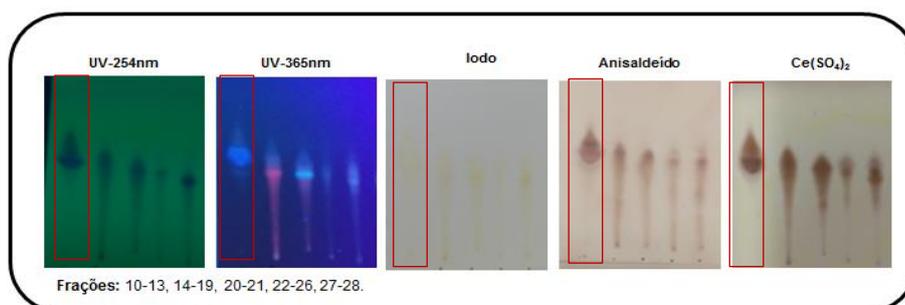


Figura 19: Fotografia das placas (CCDC) das frações reunidas do fracionamento (CC) do extrato bruto DCM dos calos secos de *M. guianensis* - Eluente: Hexano/Acetona 7:3.

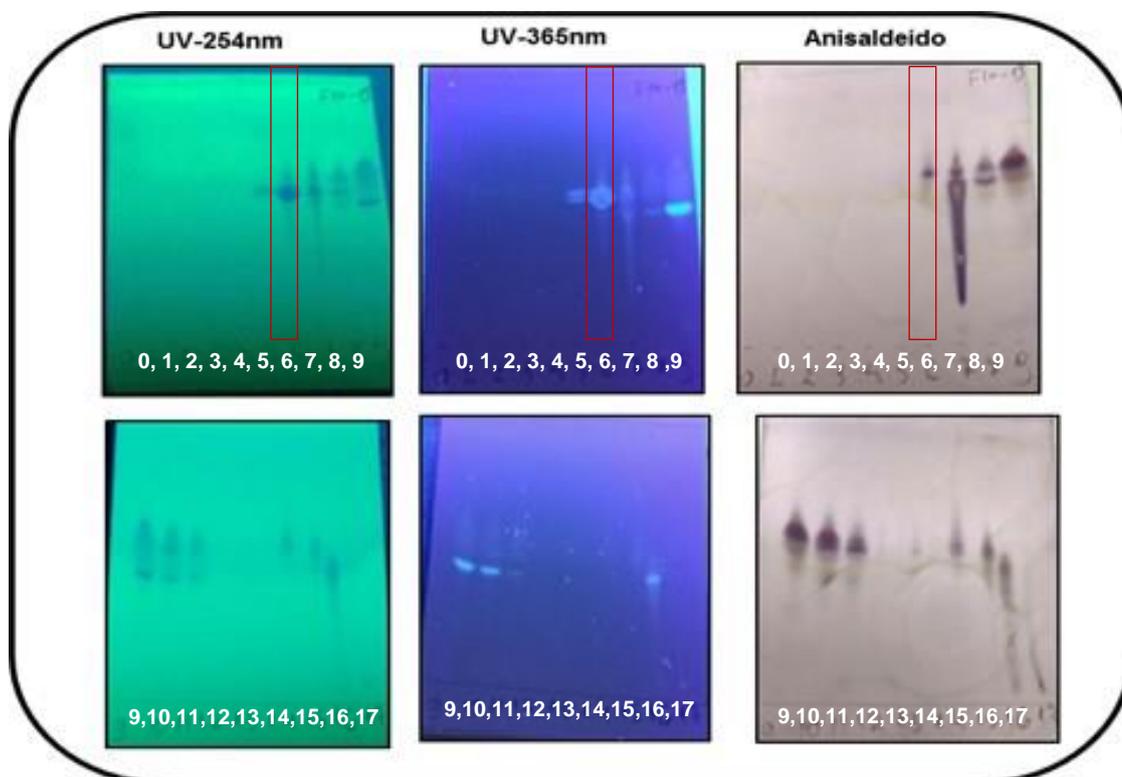


5.4. Identificação estrutural da substância isolada.

O perfil químico das frações e sub-frações do extrato DCM dos calos secos de *M. guianensis* foi analisado por CCDC e as frações com maior grau de pureza foram analisadas por Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (em equipamento de 300 MHz marca Bruker).

A fração obtida do extrato DCM dos calos secos denominada 10-13 (19,20 mg) foi fracionada novamente e forneceu 18 frações que foram analisada em CCDC (figura 20). Das frações coletadas, apenas a fração 6 (1mg) continha uma substância majoritária que pôde ser identificada. As demais continham misturas de substâncias (sitosterol, substâncias aromáticas, graxa), mas com pouca massa que não possibilitou o fracionamento para identificação das mesmas.

Figura 20: Fotografia das placas (CCDC) do fracionamento (CC) da fração 10-13 do extrato bruto DCM dos calos de *M. guianensis* - calos secos - Eluente: Hexano/Acetona 7:3.

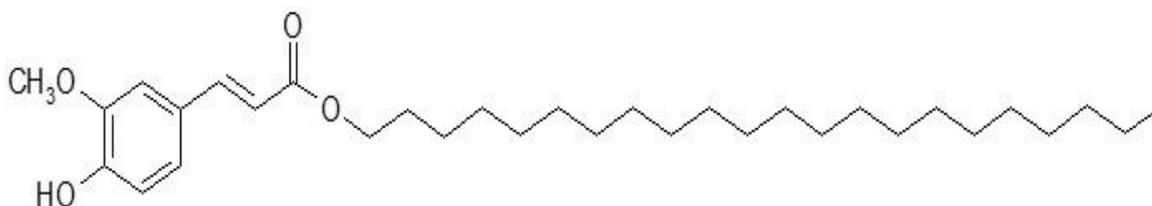


Cursino 2011 ao analisar os extratos brutos DCM de galhos de *M. guianensis* em CCDC também observou a presença de substâncias aromáticas quando analisados em luz ultra violeta em comprimento de onda 365nm. Já nos extratos das

folhas *in vivo* foi possível isolar classes de terpenoides com importante potencial biológico(Cursino et., al, 2009).

A fração 6 (1mg), identificada como *trans*-docosil-4-hidroxi-3-metoxicinamato (*trans*-ferulato de docosila) (figura 21), quando analisada em CCDC mostrou a presença de uma mancha com fluorescência azul nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm e coloração roxa quando revelada com anisaldeído sulfúrico e com $Ce(SO_4)_2$, e Rf de 0,6, quando eluída com hex/acetona 7:3.

Figura 21: Estrutura química da molécula *trans*-docosil-4-hidroxi-3-metoxicinamato (*trans*-ferulato de docosila) isolada do extrato DCM dos calos secos de *M. guianensis*.



A identificação estrutural da substância foi realizada pela análise dos espectros de RMN de 1H (300 MHz), COSY, HSQC e HMBC, os quais estão mostrados na Tabela 6 e Figuras 22 a 38, comparados com os dados da literatura (ACHENBACH et al., 1985). O espectro de RMN de 1H mostrou os sinais característicos de um ácido *trans*-ferúlico esterificado, observando-se três hidrogênios com deslocamentos químicos em δ_H 7,03 (1H, *d*, $J = 1,9$ Hz, H-2), 6,92 (1H, *d*, $J = 8,1$ Hz, H-5) e 7,08 (1H, *dd*, $J = 8,1$ e $1,9$ Hz, H-6), caracterizando a presença de um anel aromático 2,5,6-trissubstituído.

Observou-se também um simpleto em δ_H 5,84 o qual foi atribuído a uma hidroxila fenólica, assim como um sinal em δ_H 3,93 (3H, *s*) referente aos hidrogênios do grupamento metoxila, ambos ligados ao anel aromático. Foram observados sinais da presença de uma ligação dupla *trans* em δ_H 7,61 (1H, *d*, $J = 15,93$ Hz) e δ_H 6,29 (1H, *d*, $J = 15,93$ Hz) atribuídos a hidrogênios olefínicos conjugados à carbonila.

A cadeia alcoxílica característica destes ésteres foi determinada pela presença de sinais em δ_H 0,88 (3H, *t*, $J = 6,5$ Hz) correspondente aos hidrogênios de uma metila terminal, um simpleto largo em δ_H 1,30 e um multiplete em δ_H 1,68

referente a hidrogênios metilênicos e pelo sinal em δ_H 4,19 (H, *dd*, $J = 6,92$ e $6,70$ Hz) indicando a presença de hidrogênio oximetilênico.

Com os dados do espectro de massas de alta resolução tipo *Ion trap*, utilizando o modo positivo e negativo, foi possível determinar a massa molecular em 502 m/z , condizente com a fórmula molecular $C_{32}H_{54}O_4$, confirmando ao mesmo tempo o número de carbonos presentes na cadeia alquílica da substância.

A substância *trans*-docosil-4-hidroxi-3-metoxicinamato (*trans*-ferulato de docosil) (figura 22) está sendo descrita pela primeira vez em cultura *in vitro* de células vegetais, porém esta molécula já foi isolada de plantas da família Euphorbiaceae (DAVID et al., 2004), Rubiaceae (BALDÊ et al., 1991), Rutaceae (THONGTHOOM et al., 2010) e Fabaceae (ACHENBACH et al., 1985). Esta substância é um derivado do ácido ferúlico, o mesmo é conhecido e muito estudado, principalmente pelas suas propriedades antioxidantes (SILVA et al., 2010).

Figura 22: Estrutura da molécula *trans*-docosil-4-hidroxi-3-metoxicinamato (*trans*-ferulato de docosil) em azul as correlações HMBC e em vermelho, COSY.

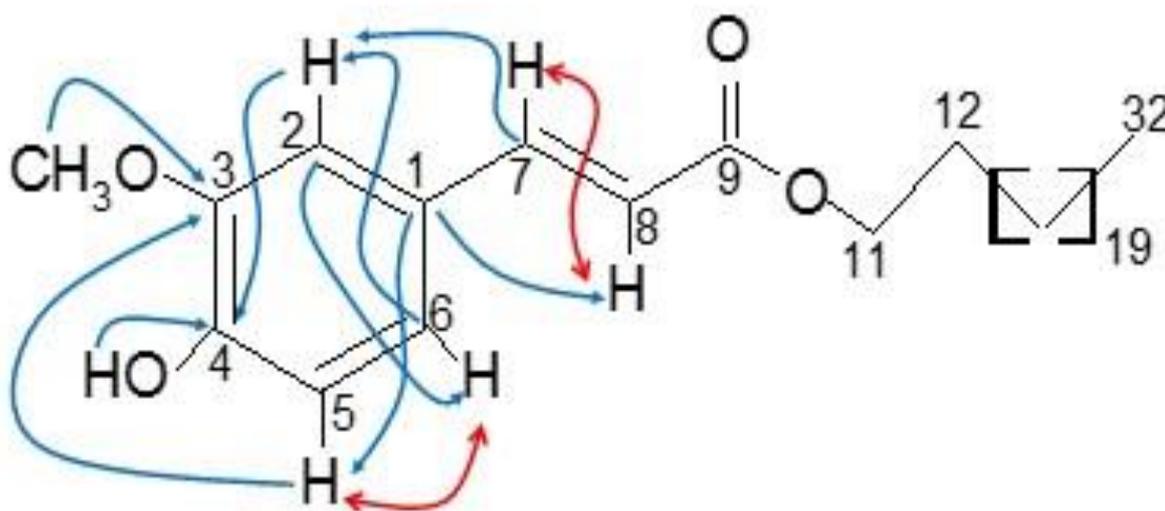


Tabela 6: Dados de RMN de ^{13}C , ^1H e HMBC de *trans*-docosil-4-hidroxi-3-metoxicinamato em CDCl_3 comparados com a literatura* (ACHENBACH et al., 1985).

Posição	δ_{C}	δ_{H} m (<i>J</i> em Hz) 300 MHz	HMBC (H \rightarrow C)	δ_{H} m (<i>J</i> em Hz) 250 MHz*
OH		5,84 s	C-4, C-5	5,83 s
1	126,87			
2	109,35	7,03 <i>d</i> (<i>J</i> = 1,86 Hz)	C-4, C-6, C-7	7,03 <i>d</i> (<i>J</i> = 2,0 Hz)
3	146,60			
4	147,40			
5	114,77	6,92 <i>d</i> (<i>J</i> = 8,10 Hz)	C-1, C-3	6,93 <i>d</i> (<i>J</i> = 8,5 Hz)
6	123,05	7,08 <i>dd</i> (<i>J</i> = 8,10 e 1,96 Hz)	C-2, C-4	7,08 <i>dd</i> (<i>J</i> = 8,5 e 2,0 Hz)
7	144,60	7,61 <i>d</i> (<i>J</i> = 15,93 Hz)	C-9	7,62 <i>d</i> (<i>J</i> = 16,5 Hz)
8	115,66	6,29 <i>d</i> (<i>J</i> = 15,93 Hz)	C-1	6,30 <i>d</i> (<i>J</i> = 16,5 Hz)
9	167,27			
11	64,63	4,19 <i>dd</i> (<i>J</i> = 6,92 e 6,70 Hz)	C-9, C-12, C- 13-31	4,19 <i>t</i> (<i>J</i> = 7,0 Hz)
12	28,75	1,68 <i>m</i>		1,70 <i>m</i>
13-31	25,90	1,30 <i>sl</i>		1,26 <i>sl</i>
32	14,17	0,88 <i>t</i> (<i>J</i> = 6,5 Hz)		0,88 <i>t</i> (<i>J</i> = 6,7 Hz)
MeO	55,93	3,93 s		3,93 s

*As correlações foram atribuídas baseadas nos experimentos COSY

Figura 23: Figura 23 - Espectro de RMN de ^1H do *trans*-docosil-4-hidroxi-3-metoxicinamato isolado dos calos de *M. guianensis*, em CDCl_3 (300 MHz).

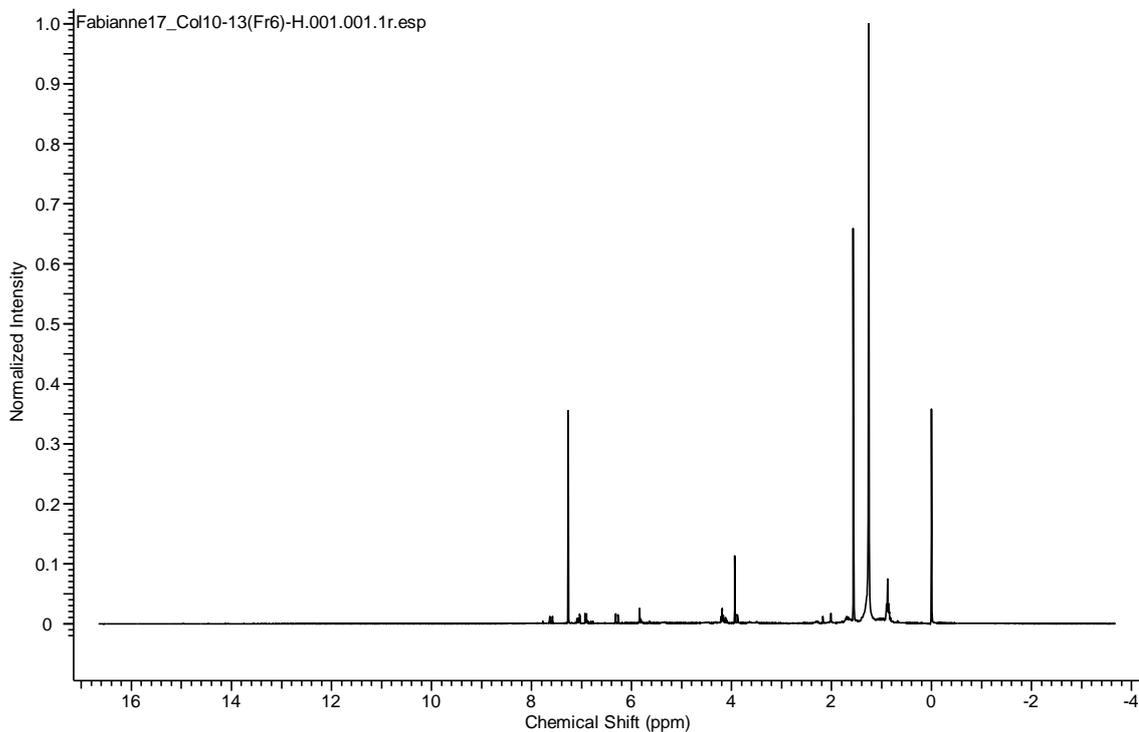


Figura 24: Figura 24 - Expansão do espectro de RMN de ^1H do *trans*-docosil-4-hidroxi-3-metoxicinamato isolado dos calos de *M. guianensis*, em CDCl_3 (300 MHz).

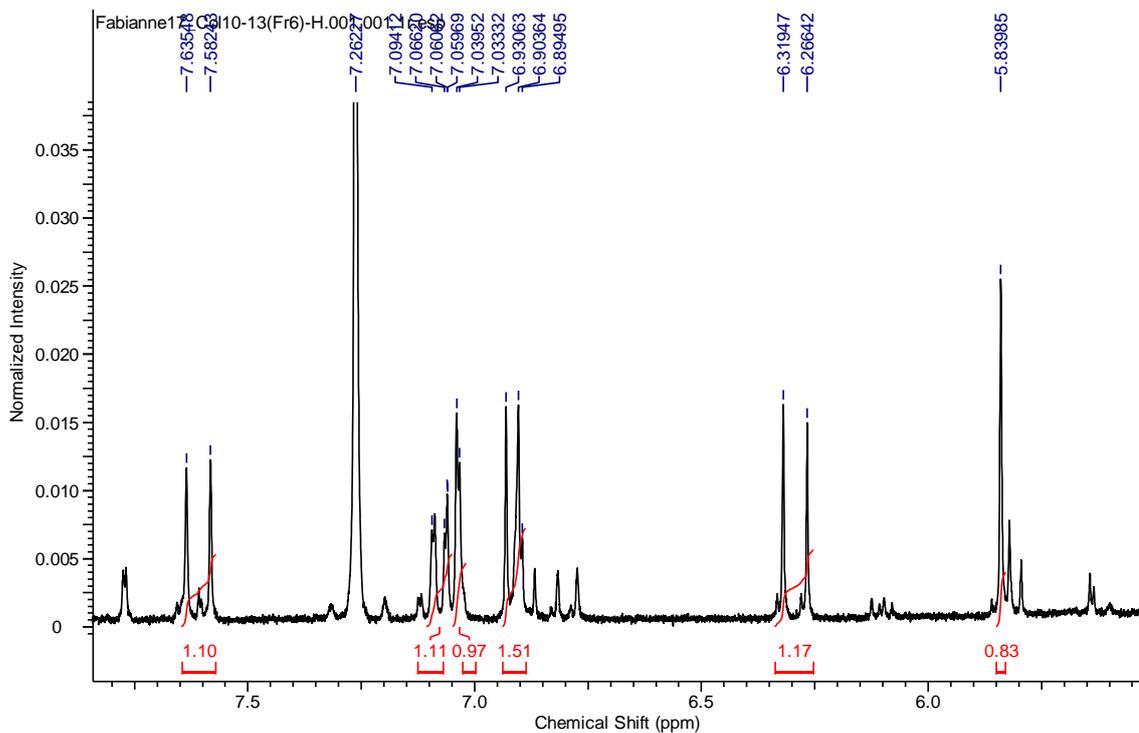


Figura 25: Expansão do espectro de RMN de ^1H do *trans*-docosil-4-hidroxi-3-metoxicinamato isolado dos calos de *M. guianensis*, em CDCl_3 (300 MHz).

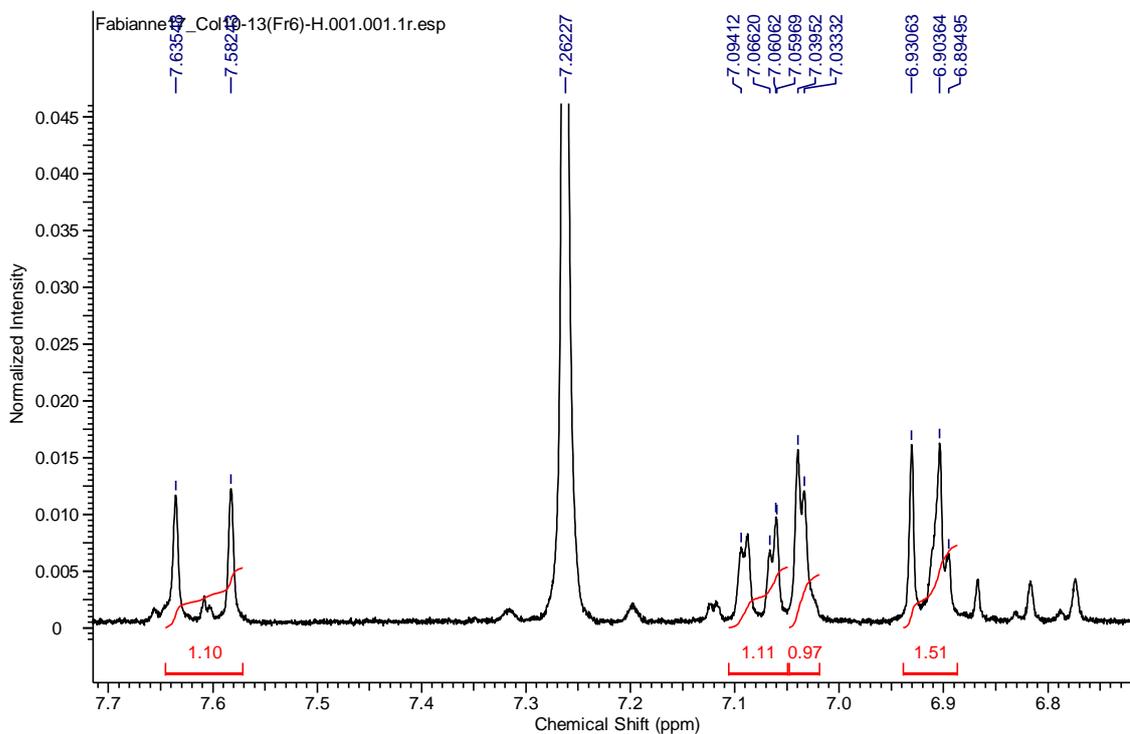


Figura 26: Expansão do espectro de RMN de ^1H do *trans*-docosil-4-hidroxi-3-metoxicinamato isolado dos calos de *M. guianensis*, em CDCl_3 (300 MHz).

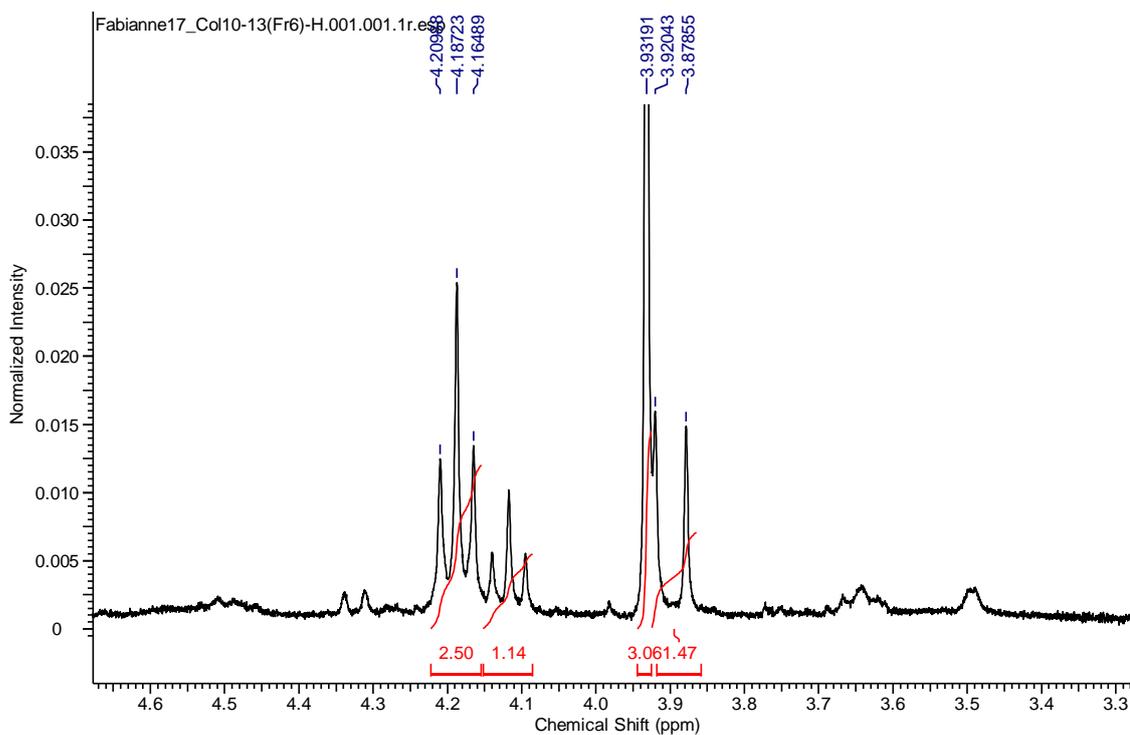


Figura 27: Expansão do espectro de RMN de ^1H do *trans*-docosil-4-hidroxi-3-metoxicinamato isolado dos calos de *M. guianensis*, em CDCl_3 (300 MHz).

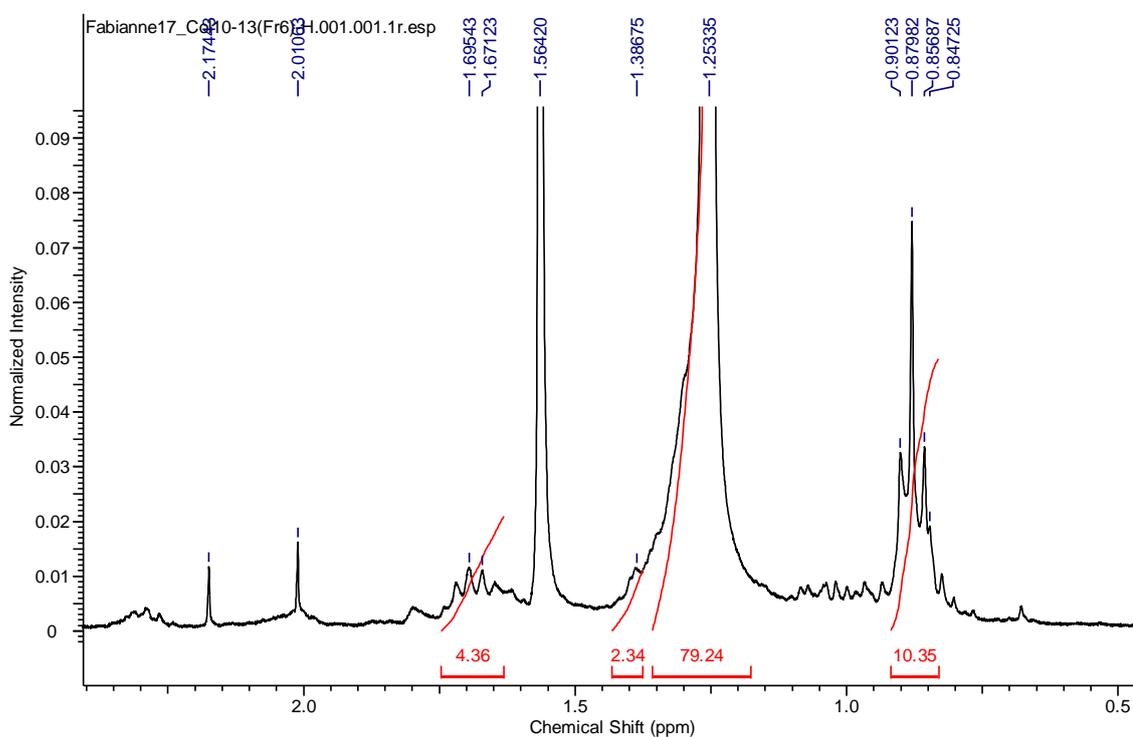


Figura 28: Mapa de contorno do espectro de HSQC do *trans*-docosil-4-hidroxi-3-metoxicinamato isolado dos calos de *M. guianensis*, em CDCl_3 (300 e 75 MHz).

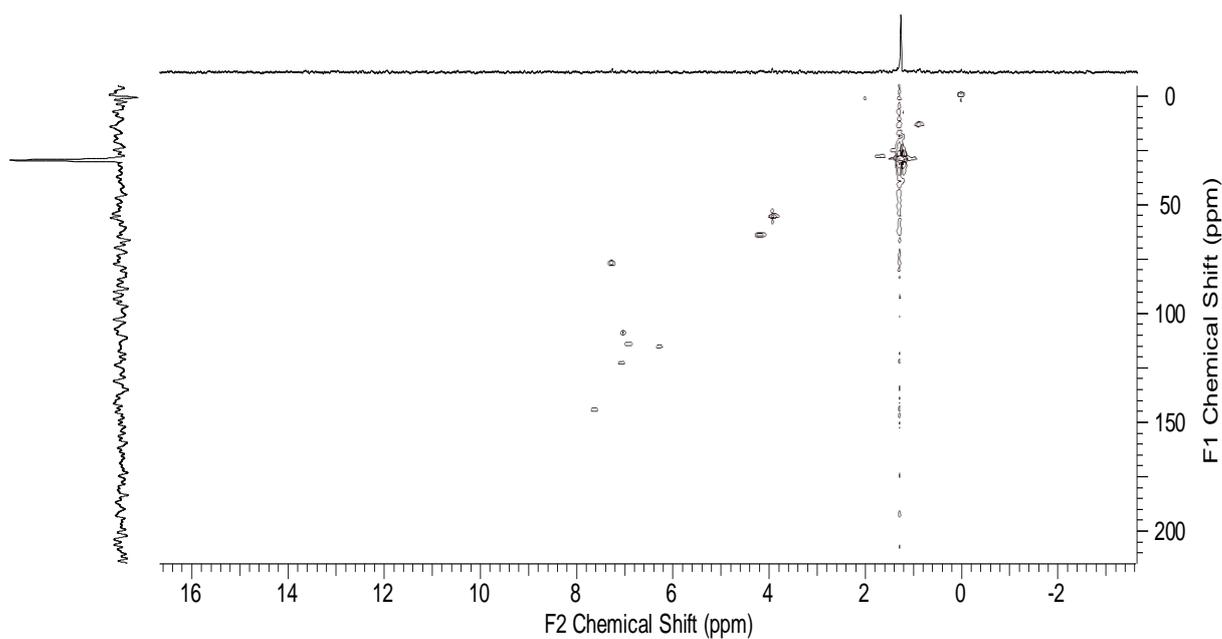


Figura 29: Expansão do mapa de contorno do espectro de HSQC do *trans*-docosil-4-hidroxi-3-metoxicinamato isolado dos calos de *M. guianensis*, em CDCl₃ (300 e 75 MHz).

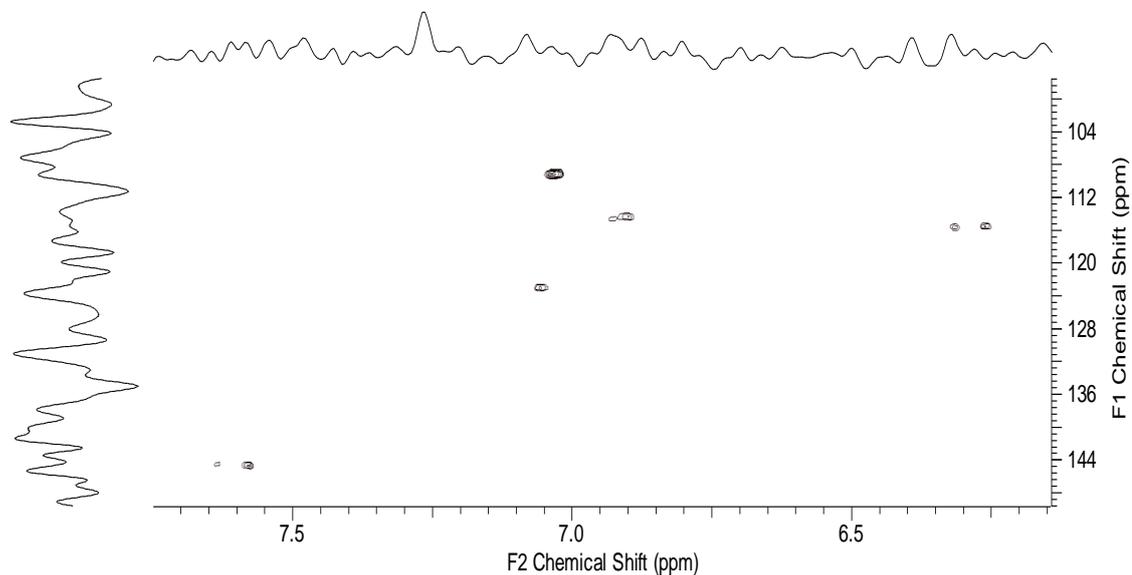


Figura 30: Expansão do mapa de contorno do espectro de HSQC do *trans*-docosil-4-hidroxi-3-metoxicinamato isolado dos calos de *M. guianensis*, em CDCl₃ (300 e 75 MHz).

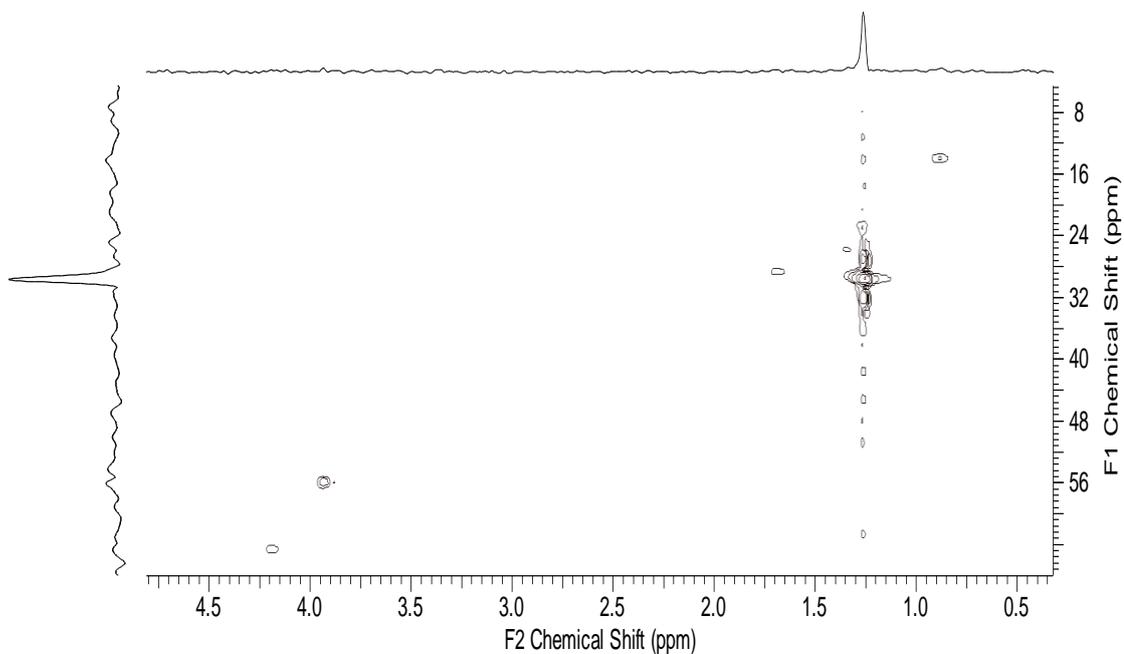


Figura 31: Mapa de contorno do espectro de HMBC do *trans*-docosil-4-hidroxi-3-metoxicinamato isolado dos calos de *M. guianensis*, em CDCl₃ (300 e 75 MHz).

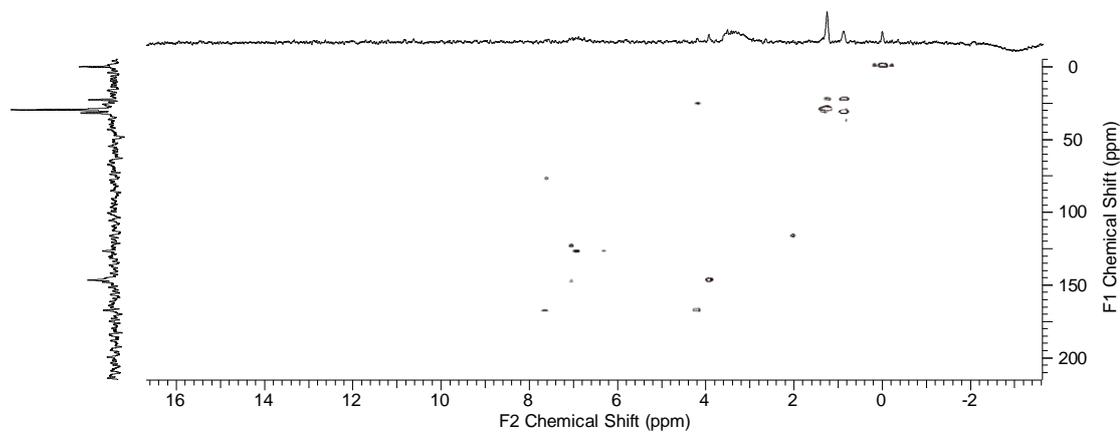


Figura 32: Expansão do mapa de contorno do espectro de HMBC do *trans*-docosil-4-hidroxi-3-metoxicinamato isolado dos calos de *M. guianensis*, em CDCl₃ (300 e 75 MHz).

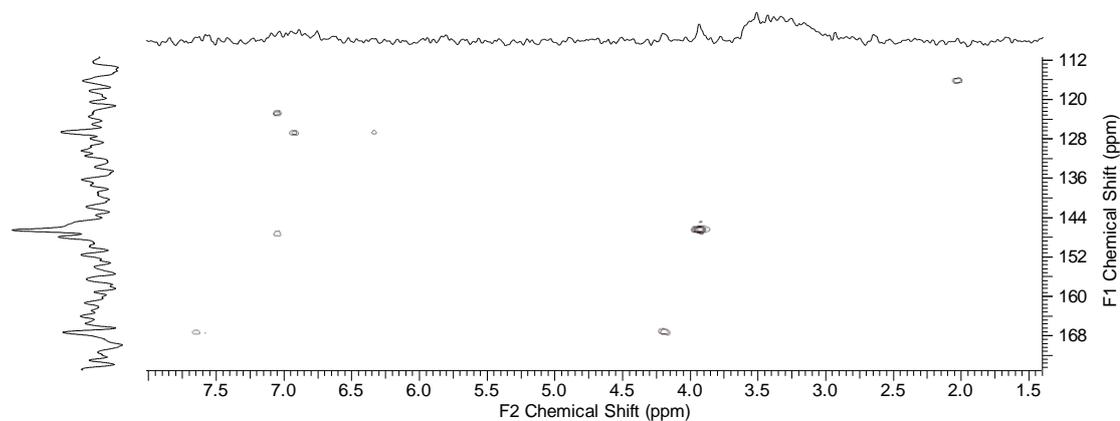


Figura 33: Expansão do mapa de contorno do espectro de HMBC do *trans*-docosil-4-hidroxi-3-metoxicinamato isolado dos calos de *M. guianensis*, em CDCl₃ (300 e 75 MHz).

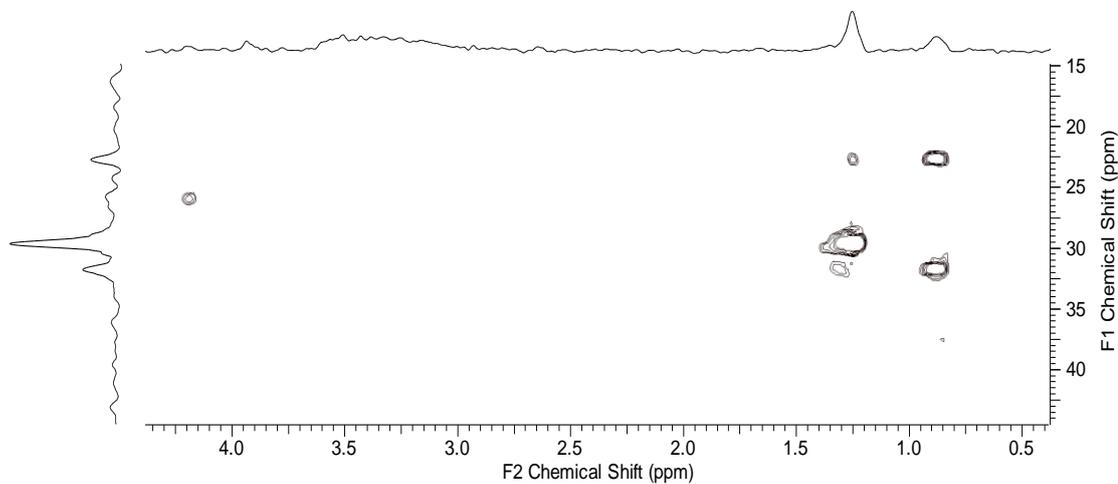


Figura 34: Mapa de contorno do espectro de COSY do *trans*-docosil-4-hidroxi-3-metoxicinamato isolado dos calos de *M. guianensis*, em CDCl₃ (300 MHz).

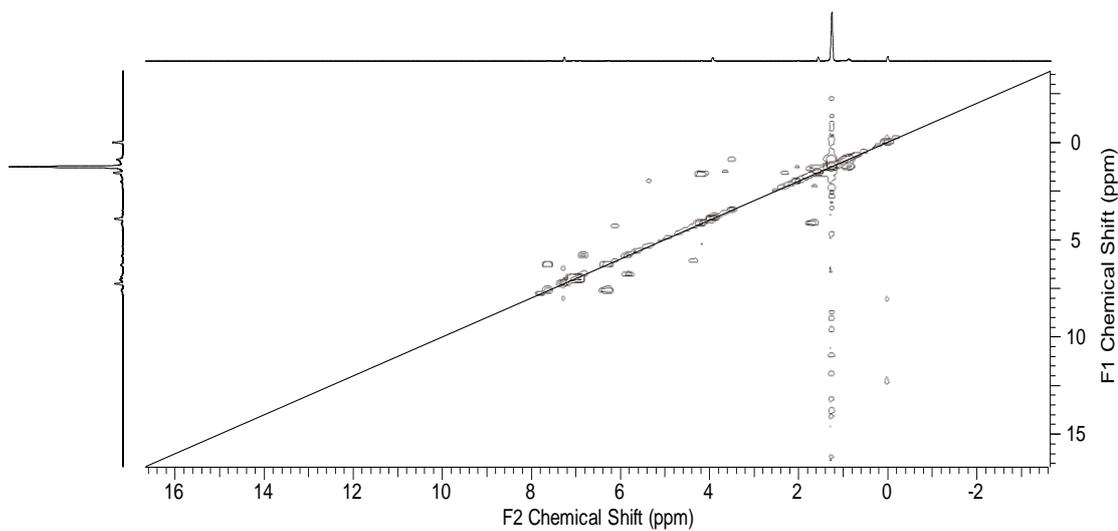


Figura 35: Expansão do mapa de contorno do espectro de COSY do *trans*-docosil-4-hidroxi-3-metoxicinamato isolado dos calos de *M. guianensis*, em CDCl₃ (300 MHz).

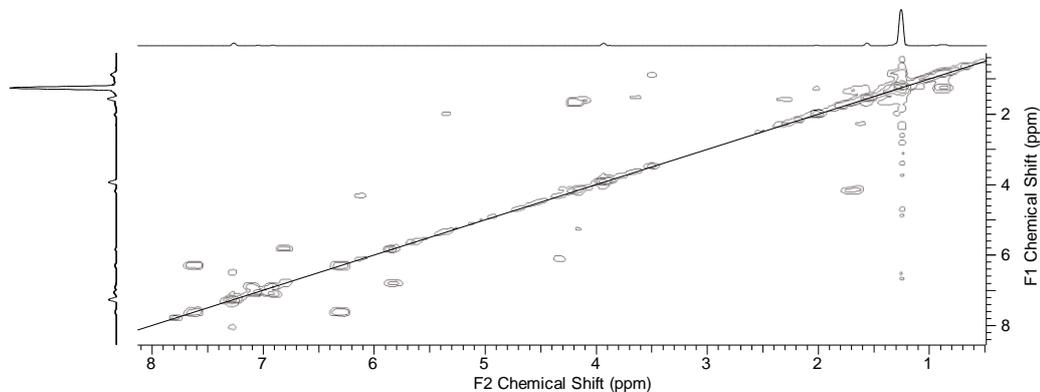


Figura 36: Expansão do mapa de contorno do espectro de COSY do *trans*-docosil-4-hidroxi-3-metoxicinamato isolado dos calos de *M. guianensis*, em CDCl₃ (300 MHz).

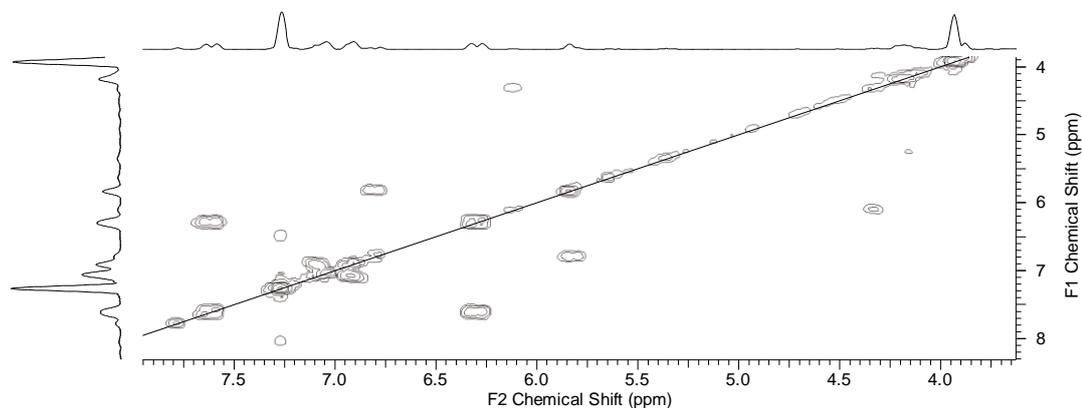
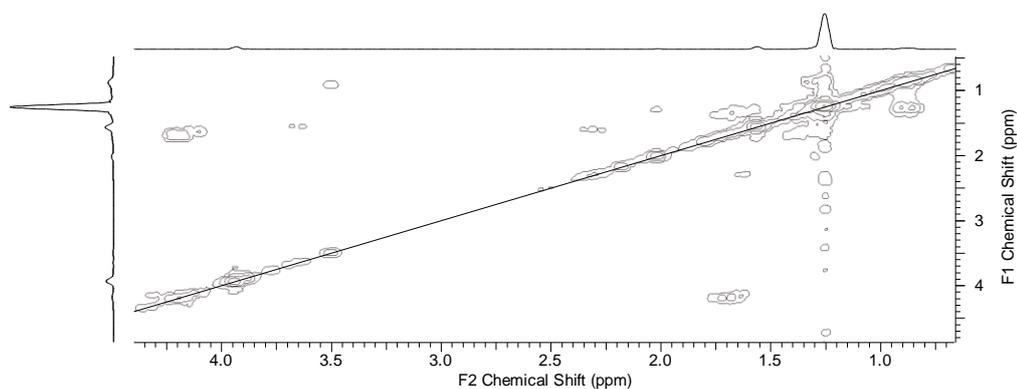


Figura 37: Expansão do mapa de contorno do espectro de COSY do *trans*-docosil-4-hidroxi-3-metoxicinamato isolado dos calos de *M. guianensis*, em CDCl₃ (300 MHz).



5.5. Desinfestação

Nos testes de desinfestação realizados, em relação à contaminação por microrganismos (fungos e bactérias), foi observada diferença significativa entre os tratamentos (tabela 7). Os tratamentos T1 e T2, onde foram utilizados etanol 70% mais as soluções de hipoclorito de sódio a 2% e hipoclorito de cálcio a 3% com variação apenas no tempo de imersão destes, foram os mais eficientes na descontaminação com 100% de sobrevivência dos explantes, sendo que para o T2 houve apenas 4% de contaminação, e para T1 não ocorreu contaminação, onde entre estes dois tratamentos não houve diferença significativa.

Tabela 7: Resultados de desinfestação de folhas de *M. guianensis*.

Explante	Pré-desinfestação		Desinfestação				Contaminação				
	Segmento foliar	Etanol 70%*	Fungicida + esteptomicina	Etanol (70%)	NaClO (2%)	CaClO (%)	Tempo CaClO	Fungo	Bactéria	Mortos	Sobreviventes
											(%)
T1		6 min	17 h	1 min	3 min	3%	5 min	0 b	0 b	0 c	100 a
T2		6 min	17 h	1 min	1 min	3%	1 min	4 b	0 b	0 c	100 a
T3		7 min	18 h	5 min	5 min	4%	10 min	0 b	0 b	100 a	0 d
T4		7 min	18 h	3 min	5 min	5%	30 min	4 b	0 b	96 a	0 d
T5		5 min	23 h	3 min	5 min	4%	5 min	17 ab	0 b	83 a	0 d
T6		6 min	23 h	3 min	5 min	6%	10 min	21 ab	0 b	100 a	0 d
T7		7 min	24 h	3 min	25 min	4%	20 min	46 a	0 b	58 b	0 d
T8		3 min	24 h	3 min	3 min	4%	5 min	25 ab	0 b	0 c	79 b
T9		3 min	24 h	3 min	3 min	4%	3 min	38 a	33 a	0 c	38 c

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). * Etanol 70% acrescido de 3 gotas do detergente Tween® 20.

O tratamento de desinfestação das sementes apresentou eficácia de 60% de assepsia.

A definição dos agentes químicos e os tempos de imersão utilizados na desinfestação de sementes e de explantes foliares de *M. guianensis* demonstraram-se importante para a obtenção de bons resultados.

Em testes de pré-desinfestação de espécies vegetais comumente utilizam-se soluções fungicidas e/ou bactericidas, como, por exemplo, o fungicida mancozebe (Manzate®) e o bactericida estreptomina, utilizados neste trabalho. O uso dessas soluções biocidas foi de suma importância para os resultados obtidos neste estudo principalmente pelo fato dos propágulos das espécies lenhosas coletadas no campo

apresentarem altos índices de contaminação por microrganismos (OLIVEIRA et al., 2013).

O mancozebe® pertence à classe de fungicidas inibidores da respiração celular, inibindo enzimas que contém grupos sulfidrílicos, e quando aplicado, forma uma camada sobre a superfície aplicada que é tóxica aos fungos. Tófoli e colaboradores (2003), utilizando Manzate em estudos sobre o combate ao fungo causador da pinta preta em tomateiros, obtiveram um índice de 50% de inibição do fungo. A estreptomicina é usada para remover ou controlar os contaminantes que podem ocorrer em culturas já estabelecidas.

Sabe-se que o etanol é um agente desinfestante comumente usado na desinfecção de explantes em cultura de tecidos, onde sua eficácia como agente germicida se dá pela ação surfactante, removendo as ceras superficiais dos tecidos (GRAZIANO et al., 2013). A imersão por alguns minutos ou mesmo um banho rápido torna a superfície dos tecidos mais permeável à penetração de outros agentes desinfestantes.

No presente estudo, os explantes foram imersos duas vezes em etanol 70%, uma vez durante a pré-desinfestação, e novamente durante a desinfestação em câmara de fluxo. Essas imersões provavelmente contribuíram para a retirada da camada de cera superficial dos explantes, permitindo que, tanto a solução fungicida, como os hipocloritos, agissem na eliminação da contaminação.

O cloro é um dos principais agentes químicos usados para o combate a bactérias. O cloro na forma de hipoclorito (de cálcio ou sódio), quando em contato com a água, libera ácido hipocloroso, e este reage novamente liberando oxigênio nascente, que é um poderoso oxidante, podendo inibir atividades metabólicas importantes para os microrganismos (RIBEIRO et al., 2008).

Os resultados obtidos demonstram a eficácia do emprego dessas combinações de agentes desinfestantes para o controle da contaminação microbiana em sementes e explantes foliares de *Minquartia guianensis*.

5.6. Germinação

O ácido giberélico (GA₃) adicionado ao meio de cultura MS100% (5 m.gL⁻¹) promoveu a germinação de quatro sementes (20%) de *Minuartia guianensis* de um total de vinte sementes inoculadas sem endocarpos, após 30 dias cultivo. Porém, oito sementes (40%) desenvolveram contaminação por fungos e oito sementes (40%) não germinaram. As sementes não germinadas foram transferidas para outro meio de cultura com uma concentração maior de GA₃ (10 m.gL⁻¹) e cultivadas por mais 30 dias, porém não apresentaram respostas ao meio e foram consideradas inviáveis e então descartadas. Foram obtidas quatro plântulas axênicas para posterior uso no cultivo *in vitro* após 120 dias do início do experimento. Os estágios de germinação e alongamento até o estabelecimento da plântula *in vitro* podem ser observados na figura 38.

Figura 38: Estágios de germinação de Sementes de *M. guianensis in vitro*: A (1° estágio de germinação: fase de “gancho” aos 30 dias). B (2° estágio: fase de haste aos 90 dias). C (plântula na fase-bi-foliar aos 120 dias).



Foto: da autoria própria.

Camargo 2004 realizou ensaios de germinação com a espécie *M. guianensis in vivo* em campo e em casa de vegetação e verificou que a taxa (60%) de germinação das sementes cujas endocarpos foram removidos durante a semeadura era mais rápida do que aquelas que os endocarpos que não foram removidos antes

do cultivo o que demonstra a vantagem da propagação da espécie em condições de cultivo controladas.

Camargo & Ferraz (2004), afirmam que a propagação de sementes de *M. guianensis* é dificultada devido à recalcitrância da espécie. Além disso, as sementes da espécie apresentam um estado de dormência duplo, primeiro pela resistência do endocarpo durante a protrusão da raiz (dormência mecânica) e segundo, devido à imaturidade do embrião no momento da dispersão (dormência morfológica).

Em germinação de espécies lenhosas *in vitro*, a presença de reguladores de crescimento é de fundamental importância na regulação da germinação. As giberelinas desenvolvem um papel-chave no processo de germinação, estando diretamente envolvidas tanto na quebra de dormência como no controle da hidrólise de reservas que nutrem o embrião em crescimento (SOARES et al., 2009).

O ácido giberélico, também conhecido como GA₃, é um regulador de crescimento do grupo das giberelinas, e é muito utilizado na cultura de tecidos para a quebra de dormência, acelerando o processo e aumentando o percentual de germinação *in vitro* (LAVAGNINI, 2014).

Não há relatos na literatura de estudos sobre germinação *in vitro* da espécie para comparativos, porém, Ferreira e colaboradores (2016) aumentaram a taxa de germinação de *Morinda citrifolia* (Rubiaceae) *in vitro* de 40% para 90% adicionando 0,5 mg/L de GA₃ em meio MS 50% no período de 30 dias de cultivo.

Devido ao baixo número de sementes (20) utilizadas para o ensaio de germinação *in vitro* de *M. guianensis* neste trabalho, e o indivíduo objeto da pesquisa não ter apresentado frutificação até a data limite para fase de experimentação do estudo, não foi possível analisar estatisticamente os resultados obtidos quanto à percentagem de germinação, contaminação e viabilidade das sementes e comparar com os resultados obtidos por Camargo (2004). Contudo, pretende-se realizar futuramente nova coleta para experimentos de germinação com um número amostral maior, para determinar a viabilidade da germinação da espécie *in vitro*.

5.7. Indução de Calo

No ensaio de indução de calos, a partir de explantes foliares obtidos da planta matriz e da plântula germinada *in vitro* de *M. guianensis*, somente os explantes foliares oriundos da planta *in vivo* desenvolveram calos, enquanto os explantes foliares obtidos da plântula *in vitro* oxidaram e morreram (figura 39).

Figura 39: A) explante foliar com formação parcial de calos; B) explantes oxidados e morte do tecido na porção central do explante foliar de *M. guianensis*.

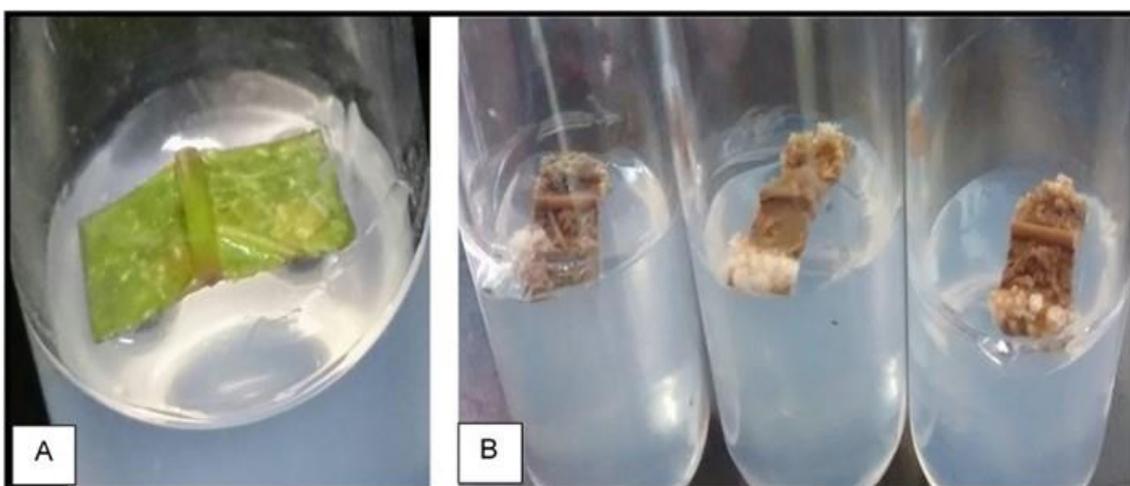


Foto: da autoria própria.

Todos os tratamentos apresentaram formação parcial de calos nas extremidades dos explantes foliares após quinze dias de cultivo, porém, após 30 dias, houve oxidação na parte central dos explantes e morte dos mesmos, contrapondo-se com os resultados obtidos no estudo preliminar com a espécie. Este resultado pode estar relacionado com as condições da planta matriz de onde foram retirados os explantes, sendo que a matriz do estudo preliminar era oriunda da reserva Adolpho Ducke, enquanto a matriz do presente estudo se encontra no bosque do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA.

As matrizes, por estarem em condições ambientais diferentes, podem estar sobrevivendo em estados fisiológicos e fitossanitários diferentes, e isto pode ter influenciado nos resultados obtidos (OLIVEIRA et al., 2013). Isso pode ser observado pelos diferentes meios de cultura utilizados (MS e WPM) e a utilização de compostos para evitar a oxidação (ácido ascórbico, e carvão ativo) (tabela 8). Com

relação aos reguladores de crescimento, a combinação e a concentração utilizadas, foram iguais as do estudo preliminar, que obtiveram resultados positivos.

Tabela 8: Tratamentos para a indução de calos de *M. guianensis*.

Tratamento	Meio de cultura	Indução de calo	Contaminação	Oxidação	Morte
Folhas <i>in vivo</i>	4 mg.L ⁻¹ 2,4-D + 2 mg.L ⁻¹ CIN	(%)			
T1	MS 100%	100	0	100	100
T2	MS 100% + carvão ativo	100	0	100	100
T3	MS 100% + Ácido ascórbico	100	20	80	80
T4	WPM + carvão ativo	100	0	100	100
T5	WPM + Ácido ascórbico	100	15	85	85
T6	MS 50%	100	30	70	70
Folhas <i>in vitro</i>					
T7	MS 100%	0	0	0	100

Tratamento: Folhas *in vivo* (folhas do espécime coletada no INPA); Folhas *in vitro* (folhas da plântula de *M. guianensis* obtidas da germinação *in vitro* de sementes coletadas do espécime da Reserva Adolpho Ducke).

Faz-se necessária a coleta de novos explantes do indivíduo da reserva Adolpho Ducke para um novo teste de indução de calos, assim como também novos testes com o indivíduo do bosque do INPA para estabelecer o protocolo de indução de calos.

6. CONCLUSÃO

- A partir dos agentes desinfestantes e tempos testados foi possível estabelecer um protocolo de desinfestação de *Minquartia guianensis*.
- O estabelecimento do meio de cultura para a indução de calos de *M. guianensis* foi realizada, porém a multiplicação dos mesmos não foi possível devido à oxidação dos calos obtidos em todos os tratamentos testados.
- Do estudo preliminar com a espécie *M. guianensis in vitro*, foi obtido um total de 503 g de massa de calos por meio da multiplicação em meio MS 100% adicionados com 4 mg.L⁻¹ da auxina 2,4-D e 2 mg.L⁻¹ de cinetina CIN que depois de seco, teve o rendimento de 58,0403 g.
- O método mais eficiente para a extração dos metabólitos secundários a partir dos calos foi o método em que os calos foram secos em liofilizador antes da extração.
- O perfil químico dos extratos brutos dos calos apresentaram indícios de classes de metabólitos característicos de terpenos, esteroides, ácidos graxos.
- Foi isolado do extrato DCM dos calos um ácido ferúlico esterificado, o *trans*-docosil-4-hidroxi-3-metoxicinamato, que está sendo descrito pela primeira vez em cultura de calos da espécie *M. guianensis*.
- Este é o primeiro relato de cultura de tecidos da espécie de *M. guianensis*.

7. REFERÊNCIAS

- ACHENBACH, H.; STÖCKER, M.; CONSTENLA, M. A. **Chemical Investigations of Tropical Medicinal Plants, XXI [1] Long Chain Alkyl Esters of Ferulic and 7-Coumaric Acid from *Bauhinia manca***. Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Lehrstuhl für Pharmazeutische Chemie, Universität Erlangen. D-8520 Erlangen Escuela de Química, Universidad de Costa Rica, Costa Rica Z. Naturforsch. 41c, 164—168 (1986); received July 25/October 1, 1985.
- AMARAL, C. L. F.; SILVA, A. B. Melhoramento biotecnológico de plantas medicinais: produção de alcalóide e óleos essenciais. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Rio de Janeiro, n.30, p.55. -59, 2003.
- BALDÊ, A.M.; CLAEYS, L.A.; PIETERS, V.WRAT.; VLIETINCK. Ferulic Acid Esters From Stem Bark Of *Pavetta owariensis*. **Phytochemistry**, Vol. 30, No. 3, pp. 102&1026, 1991.
- BHATIA, S.; SHARMA, K.; DAHIYA, D.; BERA, T. **Chapter 11- Micropropagation:** In: Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences, p.361-368. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802221-4.00011-X> Elsevier Science, 2015.
- BORGES, M. H. & BRANDENBURGO, M. I. H.. Ação anti-peçonhenta do extrato vegetal de *Casearia sylvestris*. **Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**. 2003. Disponível em <<http://www.biotecnologia.com.br>>, acesso em 20/08 2015.
- BREITBACH, U.B; NIEHUES, M; LOPES, N.P; FARIA, J.E.Q; BRANDÃO, M.G.L. Amazonian Brazilian medicinal plants described by C.F.P. von Martius in the 19th century. **Journal of Ethnopharmacology**. N.147, p. 180-189, 2013.
- CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-CNPq, p. 261 – 296, 1998.
- CAMARGO, J.L.C. **Alterações na dinâmica e demografia de árvores tropicais após fragmentação florestal na Amazônia Central**- Tese de doutorado Biologia Tropical e Recursos Naturais INPA/UFAM. 2004.
- CAMARGO, J.L.C.; FERRAZ, I.D.K. Acariquara-roxa, *Minquartia guianensis* Aubl. **Informativo Técnico Rede de Sementes da Amazônia**, p.10, 2005.
- CAMARGO, J.L.C; FERRAZ, I.D.K. Acariquara-roxa, *Minquartia guianensis* Aubl. Olacaceae. **Manual de Sementes da Amazônia**. Fascículo 4, 8 p. INPA, Manaus, Amazonas, Brasil, 2004.
- CAMARGO, M.R.M. **Avaliação da atividade antimalárica e antimicrobiana de *Geissospermum argenteum* Woodson e *Minquartia guianensis* Aubl. Coletadas em Roraima**. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais) – Universidade Federal de Roraima 96P, 2011.

- CAMPOS de, J.M.S.; CALDERANO, C. de A.; PEREIRA, A. V.; DEVIDE, L.C.; VICCINI, L.F; SANTOS, M de O. Embriogênese somática em híbridos de *Pennisetum* sp. e avaliação de estabilidade genômica por citometria. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.44, n.1, p.38-44, jan. 2009.
- CID, L.P.B & TEIXEIRA, J.B. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. In: BRASILEIRO, A.C.M; DURZAN, D.J; LEMOS, E.E.P; ARAGÃO, F.J.L; COSTA, F.H.S; SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E; SORIANO, L; CORDEIRO, M.C.R; ZIMMERMANN, M.J. **Cultivo *in vitro* de plantas**. 3ª ed., Brasília, DF: Embrapa, 325p, 2014.
- COSTA da, A. S.; ARRIGONI-BLANK, M. de F.; SILVA, J.H.S.; TORRES, M.F.; SANTOS, A. F. BLANK. Multiplicação *in vitro* e indução de calos embriogênicos em híbrido de manjerição. **Scientia Pelna** vol.11, num, 01, 2015.
- COSTA, A.S. **Micropropagação de plantas medicinais, aromáticas e condimentares**. Anais: III Ciclo de Palestras sobre Cultivo *in vitro* de Plantas, Aracaju: Embrapa, 2012.
- COSTA, P.; GONÇALVES, S.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P. B.; COELHO, N.; ROMANO, A. *Thymus lotocephalus* wild plants and *in vitro* cultures produce different profiles of phenolic compounds with antioxidant activity. **Food Chemistry**. v. 135, p.1253-1260, 2012.
- CURSINO, L. M. C; MELO L. A. S; OLIVEIRA, J. A. A; NUNEZ, C. V. Atividade antifúngica dos extratos diclometânico e metanólico dos galhos de *Minquartia guianensis* Aubl. (Olcaceae), **SBQ**, 2008.
- CURSINO, L. M.; SANTOS, I; MARIÚBA, L. A. M; JEFFREYS, M. F; LIMA, N. M; OLIVEIRA, J. L; ORLANDINI, P. P; NUNEZ, C.V. Antibacterial activity of *Minquartia guianensis* extracts and phytochemical evaluation. Emir. **J. Food Agric.** n. 23 (6): 505-510, 2011.
- CURSINO, L.M. Estudo fitoquímico e bioatividade dos extratos e frações de *Minquartia guianensis* (Olcaceae). **Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia- Universidade Estadual do Amazonas**. Manaus, 2011.
- CURSINO, L.M.; MESQUITA, A. S. S; MESQUITA, D. W. O; FERNANDES, C.C; PEREIRA JUNIOR, O. L; AMARAL, I. L; NUNEZ, C.V. Triterpenos de *Minquartia guianensis* Aubl. (Olcaceae), **Acta Amazônica**, Vol. 39(1), p. 181-186, 2009.
- CURSINO, L.M.; NUNEZ, C.V.; de PAULA, C.R.; NASCIMENTO, M.F.A.; SANTOS, A.P. Triterpenes from *Minquartia guianensis* (Olcaceae) And *in vitro* antimalarial activity. **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2165-2168, 2012.
- DAVID, J.P.; MEIRA, M.; DAVID, J.M.; GUEDES, M.L. da S. TRITERPENOS E FERULATOS DE ALQUILA DE *Maprounea guianensis*. **Química Nova**, Vol. 27, No. 1, 62-65, 2004.

- EL-SEEDI, H. R.; HAZELL, A. C.; TORSSEL, K. B. G. Triterpenes, lichexanthone and an acetylenic acid from *Minquartia guianensis*, **Phytochemistry**, v.35 p.1297-1299, 1994.
- FERNANDO, H.S. D & KARUNARATNE, M.M.S.C. Mella (*Olax zeylanica*) Leaves as an Eco-friendly Repellent for Storage Insect Pest Management. **Journal of Tropical Forestry and Environment** Vol. 3, n. 01 p. 64-69, 2013.
- FERREIRA, R.; VARELLA, T.L.; HUNHOFF, V.L.; SILVA, M.L. **Germinação *in vitro* de sementes de noni (*Morinda citrifolia* L.)** Biodiversidade - V.15, N1, pág. 46, 2016.
- FLORA DO BRASIL 2020 EM CONSTRUÇÃO.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <www.floradobrasil.jbrj.gov.br>. Acesso em: 19 de março de 2017.
- FLORES, E.M. *Minquartia guianensis* Aubl. Part II - **Species Descriptions**. p.575-578, 2002.
- FOGLIO, M. A., QUEIROGA, C. L., SOUSA, I. M. O, RODRIGUES, R. A. F., 2006. **Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar.** Construindo a História dos Produtos Naturais. http://www.multiciencia.unicamp.br/art04_7.htm, acesso em abril de 2016.
- FORZZA, R.C, org., et al. INSTITUTO DE PESQUISAS JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil [online]**. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Introdução: as angiospermas do Brasil, p. 78-89. Vol. 1. 2010.
- FREITAS, H.B. **Desenvolvimento e Hormônios Vegetais**. EDUFBA, p.72, Salvador, 2009.
- FREITAS, J.V; MARULL. Y. **Descobrimo a Amazônia** Guia do professor, ed. Artes Gráficas e Editora Pontual LTDA. Brasil, 2015. Disponível em: <<http://descobrimoamazonia.org.br/downloads/guia-professor-web.pdf>> acesso em 26/08/2015.
- GARCIA, M.G. Potencial de Crescimento e Parâmetros Bioquímicos em Agregados Celulares de *Ocotea catharinensis* (Mez.) Lauraceae. **Dissertação de mestrado em Biotecnologia**. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). 116 p. 2005.
- GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. Plant tissue culture procedure-Background. In: **Plant propagation by tissue culture**. Springer Netherlands, p. 1-28. 2008.
- GONÇALVES, S.; & ROMANO, A. In vitro culture of lavenders (*Lavandula* spp.) and the production of secondary metabolites. **Biotechnol. Adv.** v.31,n.2, p.166-74, 2013.

- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (ed.). *Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas*. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 99-169, 1990.
- GRATTAPAGLIA, D; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI/Embrapa- CNPH, v. 1, p.183-260, 1998.
- GRAZIANO, M.U.; GRAZIANO, K. U; PINTO, F.M.G.; BRUNA, C.Q.M.; SOUZA, R.Q.; LASCALA, C.A. **Eficácia da desinfecção com álcool 70% (p/v) de superfícies contaminadas sem limpeza prévia**. Rev. Latino-Am. Enfermagem mar.-abr. 2013.
- GUEYE, B.; et al. Callogenesis and rhizogenesis in date palm leaf segments: are there similarities between the two auxin-induced pathways? **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 98, 2009.
- GUNSTONE, F. D. & SEALY, A. J. The acetylenic acids of isano (Boleko) Oil. Fatty acids, Part XII. **Journal of the Chemical Society (Resumed)**, p.5772-5778,1963.
- HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JR. F. T. D.; GENEVE, R. L. Plant propagation: principles and practices. Prentice-Hall/Englewood Cliffs, New Jersey. 7th ed. Upper saddle River: Prentice Hall. 2002.
- HOSAMANI, K. M. & PATTANASHETTAR, R. S. *Mappia foetida* seed oil: A rich source of oil and moderate source of novel 3-keto-octadec-cis-15-enoic acid and its possible industrial utilization. **Industrial Crops and Products**, n.22, p.135-139, 2005.
- JARDIM, L.S.; SAMPAIO, P.T.B.; COSTA, S.de S.; GONÇALVES, C.de Q. B.; BRANDÃO, H.L.M. Efeito de diferentes reguladores de crescimento na regeneração *in vitro* de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). **Acta Amazônica**, Vol. 40 (2). P. 275-280, 2010.
- KOKOTKIEWICZ, A.; et al. Isolation and structure elucidation of phenolic compounds from *Cyclopia subternata* Vogel (honeybush) intact plant and in vitro cultures. **Food Chemistry**, v. 133, 2012.
- LAVAGNINI, C.G.; DI CARNE, C.A.V.; CORREA, F.; TOKUMO, F.H.L.E.; SILVA, M.H.; SANTOS, P.C.S. Fisiologia vegetal – hormônio giberilina. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia – FAEF - Garça/SP - v.25 - n.1 - p.48-52 - jun. 2014.**
- LORENZI, H. Árvores brasileiras: **manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. Vol. 2, 4ª Edição, Nova Odessa, SP. p.384, 2014.
- LOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, v. 30, p.421-427, 1981.

- LULSDORF, M.M.; TAUTORUS, T.E., KIKCIO, S.I.; DUNSTAN, D.I. Growth parameters of embryogenic suspension cultures of Interior spruce (*Picea glauca-engelmannii* complex) and black spruce (*Picea mariana* Mill). **Plant Sci.**82: 227-234, 1992.
- MACIEL, A. L. de R.; PASQUAL, M.; PEREIRA, A. R.; REZENDE, J. C. de; SILVA, A. B.; DUTRA, L. F. Embriogênese somática indireta em explantes foliares de *Coffea arábica* L. Cv. Obatã. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 1, p. 107-116, 2003.
- MARLES, R. J.; FARNSWORTH, N. R.; NEILL, D. A.; Isolation of a novel cytotoxic polyacetylene from a traditional anthelmintic medicinal plant, *Minquartia guianensis*. **Journal of Natural Products**, 52: 261-266. 1989.
- MONTRUCCHIO, D. P.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D.; MONACHE, F. D.; CARVALHO, J. L. S. **Chemical compounds and antimicrobial activity of *Ptychopetalum olacoides* Benth.** Visao Academica. n.6 p.48-52, 2005.
- MORAIS, T.P.; ASMAR, S.A.; LUZ, J.M.Q. Reguladores de crescimento no cultivo in vitro de *Mentha X Piperita* L. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.16, n.2, supl. I, p.350-355, 2014.
- MORAIS, T.P; LUZ, J.M.Q; SILVA, S.M; RESENDE, R.F; SILVA, A.S. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Revista Brasileira de plantas medicinais**. Botucatu, v.14, n.1, p.110-121, 2012.
- MORRIS, L. J. The oxygenated acids of isano (Boleko) oil. **Journal of the Chemical Society** (Resumed), p.5779-5781, 1963.
- MOSHI, M. J.; INNOCENT, E.; MASIMBA, P. J.; OTIENO, D. F.; WEISHEIT, A.; MBABAZI, P.; LYNES, M.; MEACHEM, K.; HAMILTON, A.; URASSA, I. Antimicrobial and brine shrimp toxicity of some plants used in traditional medicine in Bukoba District, north-western Tanzania. Tanzania **Journal of Health Research**. n.11, p. 23-28, 2009.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**, v.15, n.3, p.473-97, 1962.
- MURTHY. H.N; GEORGIEV. M. I; PARK. S. Y; DANDIN. V. S; PAEK. K.E The safety assessment of food ingredients derived from plant cell, tissue and organ cultures: A review, **Food Chemistry** n.176, p.426-432, 2015.
- NAIR, J.J; MALAUDZI, R.B; CHUKWUJEKWU, J,C; HEERDEN, F.R.V; STADEN, J.V. Antigonococcal activity of *Ximenia caffra* Sond. (Olacaceae) and identification of the active principle. **South African Journal of Botany**. n.86, p. 111-115, 2013.
- NDHLALA, A.R., AMOO, S.O.; NCUBE, B.; MOYO, M.; NAIR, J.J.; VAN. J. 16 – Antibacterial, Antifungal, and Antiviral Activities of African Medicinal Plants. **Pharmacology and Chemistry**, p. 621-659, 2013.

- NOGUEIRA, R.C.; PAIVA,R.; OLIVEIRA, L.M.; SOARES, G.A.; SOARES,F.P.; CASTRO, A.H.F.; PAIVA, P.D. de O. Indução de calos em explantes foliares de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 366-370, mar./abr., 2007.
- OLIVEIRA, A. N; AMARAL, I. L. Florística de uma floresta de vertente na Amazônia Central Amazonas, Brasil. **Revista Acta Amazônica**. v.34, n.1, p.21-34, 2004.
- OLIVEIRA, L.S de; DIAS,P.C; BRONDANI,G.E. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa florestal brasileira**, Colombo, v.33, n. 76, p.439-453, out/dez. 2013.
- OLMEDO, A.S. Caracterização do Crescimento e Parâmetros Bioquímicos em Culturas Embriogênicas de *Ocotea catharinensis* (Mez.)Lauraceae, **Dissertação de Mestrado em Biotecnologia**, UFSC, 2005.
- ONG, C. Y.; LING, S. K.; ALI, R. M.; CHEE, C. F.; SAMAH, Z. A.; HOCK HO, A. S.; TEO, S. H.; LEE, H. B. Systematic analysis of in vitro photo-cytotoxic activity in extracts from terrestrial plants in Peninsula Malaysia for photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 96: 216–222. 2009.
- PASTORE JR. F. A Amazônia e o extrativismo florestal não madeireiro p.12. In: RIOS, M.N. DA.S.; VIANA, C.A, DOS. S.; PAIVA, A. O.; JARDIM,C.DA.V.; ROCHA,N.M.S.; PINAGÉ,G.R.; ARIMORO,O.A.S.; SAGANUMA,E.; GUERRA,C.D.; ALVEZ,M.M. **Plantas da Amazônia: 450 espécies de uso geral**. 3378p. Universidade de Brasília, DF, 2011.
- PEREIRA, A. L.; SOBRINHO, F. A. P.; SALUSTIANO, V. da. C. N. **Florística e estrutura de uma mata de terra firme na reserva de desenvolvimento sustentável rio Iratapuru, Amapá, Amazônia Oriental, Brasil**. Curitiba, PR, v.41, n.1, p. 113-122, 2011.
- PIATO, A. L.; RIZON, L. P.; MARTINS, B. S.; NUNES, D. S.; ELISABETSKY, E. Antidepressant profile of *Ptychopetalum olacoides* Bentham (Marapuama) in Mice. **Phytotherapy Research**, n.23, 519-524, 2009.
- PICERNO, P.; MENCHERINI, T.; RASTRELLI, L.; PICCINELLI, A.; AQUINO, R. Isoprenoid glycosides from *Liriosma ovate*. **Journal of Natural Products**, 71: 265-8. 2008.
- PIERIK, R. L. M. **Cultivo in vitro de las plantas superiores**. Martins: Nijoff, p.326p, 1990.
- QUIGNARD, E. L. J.; POHLIT, A. M.; NUNOMURA, S. M.; PINTO, A. C. S.; SANTOS, E. V. M.; MORAIS, S. K. R.; ALECRIM, A. M.; PEDROSO, A. C. S.; CYRINO, B. R. B.; MELO, C. S.; FINNEY, E. K.; GOMES, E. O.; SOUZA, K. S.; OLIVEIRA, L. C. P.; DON, L. C.; SILVA, L. F. R.; QUEIROZ, M. M. A.; HENRIQUE, M. C.; SANTOS, M.; PINTO, P. S. Screening of plants found in Amazonas state for lethality towards brine shrimp *Artemia franciscana*. **Acta Amazônica**, 33: 93-104. 2003.

- RABMAN, W. C. M.; MANAF, A. A.; SUKARI, A. *Scorodocarpus borneensis* essential oils, a possible natural antifungal therapy. **Science International** (Lahore), 14: p.41-43, 2002.
- RASHID, M. A.; GUSTAFSON K. R.; CARDELLINA, J. H.; BOYD, M. R. HIV-inhibitory natural products part 61 - Absolute stereochemistry and anti-HIV activity of minquartynoic acid, a polyacetylene from *Ochanostachys amentacea*. **Natural Product Letters**, 15: p.21-26, 2001.
- RASMUSSEN, H. B.; CHRISTESEN, S. B.; KVIST, L. P.; KHARAZMI, A; HUANSI, A. G. Absolute Configuration and Antiprotozoal Activity of Minquartynoic Acid. **Journal of Natural Products**, 63: p.1295-1296, 2000.
- RESCAROLLI, C.L. DE S. **Embriogenese secundária, caracterização bioquímica e histoquímica de culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* (MEZ) (LAURACEAE)**. Dissertação de Mestrado em Biologia Vegetal. UFSC, 2011.
- RIBEIRO, J.M.; CANUTO, K.M. VESCHI, J.L.A. **Compostos clorados: aspectos gerais e sua utilização como agente sanitizante na agricultura, micropropagação e pecuária**. Petrolina : Embrapa Semi-Árido , 2008. 26 p. ---- (Embrapa Semi-Árido . Documentos, 207)
- RODRIGUES, F.R.; & ALMEIDA, W.A.B. Calogênese em *Cissus sicyoides* L. a partir de segmentos foliares visando à produção de metabólitos in vitro. **Revista Brasileira de Plantas Medicináveis**, Botucatu, v.12, n.3, p.333-340, 2010.
- RUIZ, L.; RUIZ, L.; MACO, M.; COBOS, M.; GUTIERREZ-CHOQUEVILCA, A.; ROUMY, V. Plants used by native Amazonian groups from the Nanay River (Peru) for the treatment of malaria. **Journal of Ethnopharmacology**, 133: 917-921. 2011.
- SANTOS, C.G.; PAIVA, R.; PAIVA, P.D.O.; PAIVA, E. Induction and biochemical analysis of callus obtained from leaf segments of *Coffea arabica* L., Cultivar Rubi. **Ver. Ciência Agrotécnica**. 27(3): 571 – 577, 2003.
- SILVA, A. L.; MARTINS, B. S.; LINCK, V. M.; HERRMANN, A. P.; MAI, N.; NUNES, D. S.; ELISABETSKY, E. MK801-and scopolamine-induce amnésias are reversed by na Amazonian herbal locally used as a “brain tonic”. **Psychopharmacology**, 202: p.165-172, 2009.
- SILVA, L.C. **Germinação, estabelecimento e multiplicação in vitro de *Dipteryx alata* VOGEL e *Eugenia dysenterica* DC. Espécies frutíferas do cerrado**. Dissertação de Mestrado-Universidade Federal de Goiás, p.93, 2012.
- SILVA, M.LC; COSTA, R.S; SANATANA, A. dos S; KOBBLITZ, M.G.B. Compostos **fenólicos, carotenoides e atividade antioxidante em produtos vegetais**. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v.31, n.3, p. 669-682, jul./set.2010.
- SIQUEIRA, I. R.; CIMAROSTI, H.; FOCHESTATTO, C.; NUNES, D. S.; SALBEGO, C.; ELISABETSKY, E.; NETTO, C. A. Neuroprotective effects of Ptychopetalum

olacoides Bentham (Olacaceae) on oxygen and glucose deprivation induced damage in rat hippocampal slices. **Life Science**, 75: p.1897-906, 2004.

- SIQUEIRA, I. R.; FOCHESSATTO, C.; TORRES, I. L. S.; SILVA, A. L.; NUNES, D. S.; ELISABETSKY, E.; NETTO, C. A. Antioxidant activities of *Ptychopetalum olacoides* ("muirapuama") in mice brain. **Phytomedicine**, 14: p.763-769, 2007.
- SOARES, F.P.; PAIVA, R.; STEIN, V.C.; NERY, F.C.; NOGUEIRA, R.C.; OLIVEIRA, L.M. **Efeito de meios de cultura, concentrações de GA3 e Ph sobre a germinação in vitro de Mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes)**. Ciênc. agrotec., Lavras, v. 33, Edição Especial, p. 1847 -1852, 2009.
- SOUZA, A. S.; JUNGHANS, T. G. **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, p. 152, 2006.
- SOUZA, C. M.; PINTO J. E. B. P.; RODRIGUES, B. M.; MORAIS, A. R.; ARRIGONI-BLANK, M. F. Influência dos fatores físicos na regeneração de brotos em repolho. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 23, p. 830-835, 1999.
- SOUZA, R. S.; SOUZA, A. L.; LEITE, H. G.; YARED, J. A. G. Análise estrutural em Floresa Ombrófila Densa de terra firme não explorada, Amazônia Oriental. **Revista Árvore**. 30:75-87, 2006.
- SPITZER, V.; MARX, F.; MAIA, J. G. S.; PFEILSTICKER, K. *Curupira tefeensis* (Olacaceae) – A rich source of a very long chain fatty acids. **Fett Wissenschaft Technologie**, 92: p.165-168, 1990.
- SPITZER, V.; MARX, F.; MAIA, J. G. S.; PFEILSTICKER, K. *Curupira tefeensis* II: Occurrence of acetylenic fatty acids. **Fett Wissenschaft Technologie**, 93: p.169-174, 1991.
- SPITZER, V.; TOMBERG, W.; HARTMANN, R.; AICHHOLZ, R. **Analysis of the seed oil of *Heisteria silvanii* (Olacaceae)-a rich source of a novel C18 acetylenic fatty acid**. **Lipids**, 32: p.1189-1200, 1997.
- TAYLOR, L. **Huacapu (*Minquartia guianensis*)**. Technical data report, 2006.
- TERMIGNONI, R. R. **Cultura de Tecidos Vegetais**. Editora da UFRGS, Porto Alegre. P.182, 2005.
- THONGTHOOM, T.; SONGSIANG, U.; PHAOSIRI, C.; YENJAI, C. Biological Activity of Chemical Constituents from *Clausena harmandiana*. **Arch Pharmacol Research** Vol 33, No 5, 675-680, 2010.
- TISSERAT, B. Embryogenesis, organogenesis na plant regeneration. In: DIXON, R. A. (Ed.) **Plant cell culture, a practical approach**. Oxford: IRL Press, p.79-105, 1985.
- TÖFOLI, J.G.; DOMINGUES, R.J.; KUROSZAWA, C. Ação *In Vitro* de Fungicidas no Crescimento Micelial e Germinação de Conídios de *Alternaria solani*, Agente

Causal da Pinta Preta do Tomateiro. Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.70, n.3, p.337-345, jul./set., 2003.

TOPICOS:<<http://www.tropicos.org/Name/42000210?tab=maps>>, acessado em 02/2017.

TORRES, C. T.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CNPH, v. 1, 1998.

TROPICOS:<<http://www.tropicos.org/Name/22900119?tab=distribution>>, acessado em 02/2017.

TROPICOS:<<http://www.tropicos.org/Name/40020129?tab=synonyms/>>, acessado em 02/2017.

ULISSES, C.; WILLADINO, L.; DE ALBUQUERQUE, C.C.; CÂMARA, T.R. **Clonagem vegetal**- Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica, Recife, vol. 7, p.86-91, 2010.

VICENTINI, A.; ROSSI, L. Olacaceae p.463-5. In: RIBEIRO, E.J E.L. S; HOPIKINS, M.J.G; VICENTINI, A; SOTHERS, C.A; COSTA, M.A.S; BRITO, J.M; SOUZA, M.A.D; MARTINS, L.H.P; LOHMANN, L.G; ASSUNÇÃO, P.A.C.L; PEREIRA, E.C ; SILVA, C.F; MESQUITA, M.R; PROCÓPIO, L.C. **Flora da Reserva Ducke. Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central. Manaus- INPA**. 816p. 2009.

ZIMMERMANN, M.J. Embriogênese somática. In: BRASILEIRO, A.C.M; DURZAN, D.J; LEMOS, E.E.P; ARAGÃO, F.J.L; COSTA, F.H.S; SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E; SORIANO, L; CORDEIRO, M.C.R; CID, L.P.B; TEIXEIRA, J.B **Cultivo *in vitro* de plantas**. 3ª ed., Brasília, DF: Embrapa, 325p, 2014.

