



**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA
NÚCLEO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO
REGIONAL E MEIO AMBIENTE**

**INDUÇÃO DE CALOS EM EXPLANTES FOLIARES
DE *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis**

JOSILENE FÉLIX DA ROCHA

Porto Velho (RO)
2014



**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA
NÚCLEO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO
REGIONAL E MEIO AMBIENTE**

**INDUÇÃO DE CALOS EM EXPLANTES FOLIARES
DE *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis**

JOSILENE FÉLIX DA ROCHA

Orientador: Dr. Maurício Reginaldo Alves dos Santos

Dissertação de Mestrado apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente, Área de concentração em Ambiente, Saúde e Sustentabilidade para a obtenção do Título de Mestre em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente.

Porto Velho (RO)
2014

FICHA CATALOGRÁFICA
BIBLIOTECA PROF. ROBERTO DUARTE PIRES

R518i

Rocha, Josilene Félix da

Indução de calos em Explantes Foliares de *Cissus verticillata* (L) Nicolson & C.E Jarvis / Josilene Félix da Rocha. Porto Velho, Rondônia / UNIR 2014.

41f.: il.

Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente)
Universidade Federal de Rondônia.

Orientador: Dr. Mauricio Reginaldo Alves dos Santos

1. Calogênese 2. Suspensão celular 3. Metabólitos secundários I. Santos, Mauricio Reginaldo Alves dos II. Título

CDU: 615.2

JOSILENE FÉLIX DA ROCHA

**INDUÇÃO DE CALOS EM EXPLANTES FOLIARES
DE *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis**

Comissão Examinadora

Dr. Maurício Reginaldo Alves dos Santos - Orientador
Fundação Universidade Federal de Rondônia/Embrapa Rondônia

Dra. Michelliny de Matos Bentes Gama - Titular
Fundação Universidade Federal de Rondônia/Embrapa Rondônia

Dr. Rogério Sebastião Correa da Costa - Titular
Embrapa Rondônia

Dr. Rodrigo Barros Rocha - Suplente
Embrapa Rondônia

Porto Velho, 05 de fevereiro de 2014.

Resultado: APROVADA.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as bênçãos concedidas;

À minha mãe, Glacilene Félix de Lima Rocha, pelos bons conselhos e amizade fiel;

Ao meu pai, José Gomes da Rocha, por não me deixar desistir e me ensinar a sorrir sempre;

À minha irmã Rosilene Félix da Rocha, pelo carinho e companheirismo;

Ao meu sobrinho Guilherme Félix Rocha Lopes, por me dar o amor mais puro de criança;

À minha família em geral, base da minha vida, por todo amor e incentivo;

Ao meu orientador Dr. Maurício Reginaldo Alves dos Santos, por seus ensinamentos e seu exemplo como professor e pesquisador;

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) pela oportunidade de estágio e pelo suporte físico e material no desenvolvimento desta pesquisa;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro durante o mestrado;

Ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente da Fundação Universidade Federal de Rondônia;

À minha irmã de coração Marcela dos Santos Lima Façanha, pela solidariedade, respeito, apoio e amizade verdadeira;

À minha parceira de grandes momentos Ozelma Alves Marques, pelo respeito, companheirismo, risadas e conselhos;

À minha companheira nas pesquisas, Eloísa Paz, pela amizade, companhia, conversas e risos;

Ao Técnico do Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Tiego, pela ajuda prestada.

E aqueles que contribuíram direta ou indiretamente com este trabalho, sou muito grata!

“Há três caminhos para o fracasso: não ensinar o que se sabe; não praticar o que se ensina; não perguntar o que se ignora”.

(Beda, o Venerável)

RESUMO

Cissus verticillata (L.) Nicolson & C. E. Jarvis é uma planta perene e vigorosa, nativa da região Amazônica. Esta espécie vem sendo muito empregada na medicina popular para o tratamento de diabetes, sendo por isso conhecida como “insulina” e motivo para estudos botânicos, químicos e farmacológicos no Brasil e no exterior. Em relação às plantas medicinais, a cultura de tecidos tem auxiliado na produção de metabólitos. O crescimento de calos permite em alguns casos o desenvolvimento de culturas de células que acumulam compostos em níveis mais elevados do que a planta da qual elas se originaram. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo para a indução de calos em explantes foliares de *C. verticillata*, subsidiando o estabelecimento futuro de sistema de suspensão celular para a produção *in vitro* de metabólitos secundários. As folhas, coletadas em plantas mantidas em casa de vegetação, foram lavadas em água bidestilada e detergente com o auxílio de uma esponja esterilizada e, em seguida, segmentadas em porções menores e colocadas em frascos. Em câmara de fluxo laminar, os segmentos foliares foram imersos em etanol 70% (v/v) por 1 minuto e em solução de hipoclorito de cálcio 5,0% (p/v) por 30 minutos, e enxaguados três vezes em água destilada estéril. Os explantes foram segmentados em fragmentos de 1 cm², os quais foram inoculados individualmente em tubos de ensaio contendo meio Murashige & Skoog suplementado com 3% de sacarose, 0,6% de ágar, 2,4-D (0,0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg.L⁻¹) e BAP (0,0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg.L⁻¹) em combinações fatoriais. Ao final de 42 dias foi avaliada a indução de calos, a área foliar coberta por células de calo (AFCC) e a massa fresca dos explantes. Não houve indução de calos no controle experimental, sem reguladores de crescimento. Todos os outros tratamentos resultaram em 100% de indução. Porém, o 2,4-D apresentou efeito tóxico, causando necrose em todos os explantes, a partir da região em contato com o meio. Nos meios contendo apenas BAP os calos não necrosaram e se desenvolveram. As maiores porcentagens de AFCC foram observadas nos tratamentos com 1,0 e 4,0 mg.L⁻¹ de BAP, onde todos os explantes apresentaram 100% da AFCC. A maior massa fresca de calos, 18,19 g, foi obtida com 4,0 mg.L⁻¹ de BAP. Portanto, recomenda-se a utilização de meio de cultura MS suplementado com BAP na concentração de 4,0 mg.L⁻¹ o que resulta em calogênese em todos os explantes, com 100% da área foliar coberta por células de calos, os quais tem peso médio de 18,19 g.

PALAVRAS-CHAVE: Calogênese, suspensão celular, metabólitos secundários.

ABSTRACT

Cissus verticillata (L.) Nicolson & C. E. Jarvis is a perennial and vigorous plant native to the Amazonian Rainforest. This species is locally known as “insulin” due to its use in the Brazilian folk medicine for the treatment of diabetes, which has motivated several botanical, chemical and pharmacological studies in Brazil and abroad. Regarding medicinal plants, tissue culture has helped in the production of metabolites. The callus growth allows in some cases the development of cell cultures which accumulate compounds in higher levels than the plants from which they were produced. The objective of this research was to develop a protocol for callus induction in leaf explants of *C. verticillata*, aiming to provide support for further establishment of cell suspension systems for *in vitro* production of secondary metabolites. The leaves were collected from plants kept in a greenhouse. They were washed with sterile water, a detergent agent and sterilized sponge. After that, the leaves were cut in smaller parts and put into flasks. In a flow chamber the fragments were, immersed in 70% ethanol (v/v) for 1 minute and in calcium 50% hypochlorite (w/v) for 30 minutes and rinsed three times with sterile water. The leaves were cut into 1 cm² explants, which were individually inoculated into test tubes with Murashige & Skoog culture medium supplemented with 3.0% sucrose, 0.6% agar, 2,4-D (0, 1, 2, and 4 mg.L⁻¹) and BAP (0, 1, 2, and 4 mg.L⁻¹) in factorial combinations. On the 42nd day after inoculation, callus induction, percentage of the explant area covered by callus cells (%ACCC), and fresh weight of the explants were evaluated. No callus induction was observed in the control treatment, without growth regulators. All the other treatments resulted in 100% induction. However, 2,4-D caused a toxic effect, with tissue necrosis in all the explants, which started at the portion in contact with the media. In the media supplemented with BA and in the absence of 2,4-D, explants did not necrose and the calluses grew. Highest percentages of ACCC were observed in the media supplemented with 1.0 and 4.0 mg.L⁻¹ BA, in which all the explants had 100% of the explant area covered by callus cells. The greatest fresh mass, 18.19 g, was achieved with 4.0 mg.L⁻¹ BA in the culture medium. Thus, it is recommended the use of MS medium supplemented with 4.0 mg.L⁻¹ BA, resulting in callogenesis in all explants, 100% of the leaf area covered by callus cells, with an average weight of 18.19 g.

KEY-WORDS: callogenesis, cell suspension, secondary metabolites.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis. Fonte: ALIPI & PICHARDO, 2007 16
- Figura 2.** *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis. (A) Procedimento de pré-limpeza. (B) Desinfestação. (C) Explante recém-inoculado. Fotos: Eloísa Santana Paz, 2013. 25
- Figura 3.** Explantes de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis inoculados em meio contendo 2,4-D. Fotos: Josilene Félix da Rocha. 27
- Figura 4.** Explantes de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis inoculados em meio contendo BAP, isoladamente. Fotos: Josilene Félix da Rocha. 31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Porcentagens de calogênese em explantes de *C. verticillata* submetidos a combinações fatoriais de 2,4-D (0,0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg.L⁻¹) e BAP (0,0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg.L⁻¹), após 42 dias de cultivo. 28

Tabela 2. Área foliar coberta por células de calo (AFCC) em explantes de *C. verticillata* submetidos a combinações fatoriais de 2,4 (0,0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg.L⁻¹) e BAP (0,0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg.L⁻¹), após 42 dias de cultivo. 30

Tabela 3. Massa fresca total dos explantes de *C. verticillata* submetidos a combinações fatoriais de 2,4-D (0,0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg.L⁻¹) e BAP (0,0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg.L⁻¹), após 42 dias de cultivo. 32

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	10
1. OBJETIVOS	12
1.1. GERAL	12
1.2. ESPECÍFICOS	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 PLANTAS MEDICINAIS	13
2.2 A ESPÉCIE <i>Cissus verticillata</i> (L.) Nicolson & C. E. Jarvis	15
2.3 CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS	18
2.3.1 Reguladores de Crescimento	19
2.3.2 Calogênese e Culturas de Células em Suspensão para Produção <i>in vitro</i> de Metabólitos Secundários	20
3 MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 COLETA E DESINFESTAÇÃO DOS EXPLANTES	23
3.2 INDUÇÃO DE CALOS	23
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	25
4.1 NECROSE DOS EXPLANTES	25
4.2 INDUÇÃO DE CALOS	25
4.3 ÁREA FOLIAR COBERTA POR CÉLULAS DE CALOS	28
4.4 MASSA FRESCA	30
CONCLUSÕES	32
REFERÊNCIAS	33

INTRODUÇÃO

As plantas medicinais desempenham importante papel na saúde mundial, tornando imprescindível a realização de estudos mais aprofundados de âmbito farmacológico, terapêutico e agrônomico, para o cultivo em larga escala e a conservação destas espécies (MORAIS et al., 2012).

Cissus verticillata (L.) Nicolson & C. E. Jarvis é uma planta perene e vigorosa, nativa da região Amazônica, com hábito herbáceo, escandente ou trepador (LORENZI & MATOS, 2008). É conhecida popularmente como insulina vegetal, cortina japonesa, cipó pucá e anil trepador (BRAGA et al., 2011), sendo utilizada na medicina popular contra o reumatismo, para a cura de abscessos, na inflamação muscular, epilepsias, derrame cerebral, hipertensão e ativadora da circulação sanguínea (VASCONCELOS et al., 2007). Em estudos relacionados à sua atividade antifúngica, as folhas de *C. verticillata* demonstraram potencial contra espécies do gênero *Candida* (BRAGA et al., 2011).

O nome “insulina” se deve à utilização de *C. verticillata* na medicina popular no tratamento de diabetes, fato que tem motivado diversos estudos botânicos, químicos e farmacológicos no Brasil e no exterior (BELTRAME et al., 2001; PEPATO et al., 2003; BARBOSA-FILHO et al., 2005). Sua ação hipoglicemiante foi confirmada em laboratório pela administração do chá das folhas em ratos normoglicêmicos (BARBOSA et al., 2002).

A espécie vegetal *C. verticillata* contém cetoesteróides, carotenóides, vitamina E e alcaloides. Foram isolados os flavonóides kaempferol e sulfato de 3`luteolina (BARBOSA et al., 2002); constatou-se também a presença dos metabólitos secundários taninos, terpenos esteróides/triterpenóides e alcalóides (DOMINICI et al., 2003); Foram isoladas e identificadas as cumarinas e sabadina, os flavonóides kaempferol e quercetina e os triterpenos esteroidais e antocianinas (BELTRAME et al., 2002; GARCIA et al., 1999); também foram encontrados o biciclogermacreno e o resveratrol (SILVA et al., 2007; QUÍLEZ et al., 2004).

A utilização da fitoterapia como alternativa aos fármacos sintéticos e o crescente investimento em pesquisas para a descoberta de novos princípios bioativos têm demandado estudos relacionados à propagação vegetativa de espécies consideradas medicinais (ABREU et al., 2003). A cultura de células e tecidos vegetais *in vitro* tem potencial para promover a multiplicação sistematizada de plantas elite por meio da micropropagação (MORAIS et al., 2012), atendendo assim à crescente demanda da indústria farmacêutica por plantas indexadas, livres de vírus, com alta qualidade fitossanitária e fisiológica. Além disso, o cultivo *in vitro* de

células em suspensão pode ser empregado na produção de metabólitos secundários relevantes do ponto de vista terapêutico (LIMA, 2008; MORAIS et al., 2012).

Dessa forma, a cultura de tecidos tem sido apontada como valioso instrumento para o estudo dos metabólitos primário e secundário, constituindo um sistema apropriado para a produção de compostos farmacológicos importantes. Pesquisas têm demonstrado sucesso na produção de metabólitos secundários em diferentes órgãos e culturas não organizadas como calos e suspensão de células (FURDEN et al., 2005; GYORGY et al., 2005).

Metabólitos secundários com efeitos bioativos podem ser produzidos em quantidades substanciais nas suspensões celulares, muitas vezes superando os níveis produzidos pela planta intacta (OLIVEIRA et al., 2009), o que justifica a utilização de biorreatores visando à produção de substâncias de interesse (CID, 1998), a qual pode ser maximizada por meio do melhoramento genético e de ajustes operacionais, como maior produção de biomassa nas condições *in vitro* (MORAIS et al., 2012).

Considerando os altos índices de biodiversidade e endemismo da floresta amazônica, vê-se a necessidade de novos estudos que permitam a utilização sustentável das espécies medicinais da região (RODRIGUES et al., 2010). Dessa forma este trabalho visa desenvolver uma tecnologia capaz de subsidiar o estabelecimento futuro de sistemas de suspensão celular para a produção *in vitro* de metabólitos secundários que poderão ser aproveitados pelas indústrias farmacêuticas locais e conseqüentemente irá impactar a economia regional.

Protocolos similares ao que foi almejado neste trabalho foram produzidos com as seguintes espécies: *Cissus sicyoides* L. (RODRIGUES E ALMEIDA, 2010); *Cissus tiliacea* Kunth (JIMÉNEZ-MARTÍNEZ et al., 2011) e *Vitis vinifera* L. (CARVALHO et al., 2011; JASKANI et al., 2008).

O avanço tecnológico gerado por essa pesquisa possibilitará a obtenção de germoplasma competitivo e adaptado a diversos métodos de cultivo, produzindo um impacto subsequente na inserção de uma espécie em sistemas agroindustriais e farmacológicos passíveis de aproveitamento pelos sistemas de saúde locais (MORAIS et al., 2012).

1 OBJETIVOS

1.1 GERAL

Desenvolver um protocolo para a indução de calos em explantes foliares de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis subsidiando o estabelecimento futuro de culturas de células em suspensão para a produção *in vitro* de metabólitos secundários.

1.2 ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito de combinações de reguladores de crescimento na calogênese em explantes foliares;

Avaliar a indução de calos, a área foliar coberta por células de calo (AFCC) e a massa fresca dos explantes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PLANTAS MEDICINAIS

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), plantas medicinais são todas aquelas, silvestres ou cultivadas, que são utilizadas como recurso para prevenir, aliviar, curar e modificar um processo fisiológico normal ou patológico, e ainda como fonte de fármacos e de seus precursores (ARIAS, 1999).

Práticas terapêuticas utilizando as plantas medicinais sempre exerceram importante papel na busca de melhores condições de saúde pelo homem (BRASIL, 2006). O uso de partes de plantas e animais no combate às doenças pode ser tão antigo quanto à própria humanidade (OLIVEIRA & AKISUE, 2000). No Brasil, as culturas indígenas, negras e europeias exercem grande influência na medicina popular (MACEDO & FERREIRA, 2004). E, apesar dos grandes avanços observados na medicina moderna, as plantas medicinais ainda desempenham importante papel na saúde mundial. (MORAIS et al., 2012).

As plantas medicinais são importantes por sua contribuição como fonte natural de fármacos e por proporcionar grandes chances de obter-se uma molécula protótipo devido à diversidade de constituintes presentes nestas (HOSTETTMANN et al., 2003), representando, então, uma valiosa fonte de metabólitos secundários, os quais são utilizados principalmente pelas indústrias farmacêutica e alimentícia (RAO & RAVISHANKAR, 2002).

O uso de fitoterápicos, medicamentos preparados exclusivamente à base de plantas medicinais (SIMÕES & SCHENKEL, 2002), com finalidade profilática, curativa, paliativa e com fins de diagnóstico, passou a ser oficialmente reconhecido pela OMS em 1978 (BRASIL, 2006). Estima-se que cerca de 30% de todas as drogas avaliadas como agentes terapêuticos são derivados de produtos naturais (CALIXTO, 2005; VEIGA JUNIOR & MELLO, 2008).

O Ministério da Saúde incentiva às pesquisas que visem ao aproveitamento do potencial terapêutico da flora e fauna nacionais, enfatizando a certificação de suas propriedades medicamentosas (BRASIL, 2006). Muitas áreas estão envolvidas na pesquisa de novas substâncias oriundas de plantas, como a fitoquímica, que trabalha no isolamento, purificação e caracterização de princípios ativos; a etnobotânica e a etnofarmacologia que buscam informações a partir do conhecimento de diferentes povos e etnias; e a farmacologia que estuda os efeitos farmacológicos de extratos e dos constituintes químicos isolados (MACIEL et al., 2002; MENDONÇA FILHO & MENEZES, 2003; VENDRUSCOLO et al., 2005).

A indicação do uso de medicamentos fitoterápicos na terapêutica não é substituir medicamentos registrados e comercializados com eficácia já comprovada, mas sim, aumentar o arsenal terapêutico, ofertando medicamentos equivalentes, registrados e com eficácia comprovada (RATES, 2001).

A rica biodiversidade do Brasil é acompanhada por uma longa aceitação do uso de plantas medicinais e conhecimento tradicional associado (RODRIGUES, 2006), sendo muito mais provável encontrar atividade biológica em plantas orientadas pelo seu uso na medicina popular do que em plantas escolhidas ao acaso (HOUGHTON & RAMAN, 1998).

No entanto, alguns fatores podem comprometer o uso das plantas medicinais para propósitos farmacêuticos, como a heterogeneidade dos indivíduos, devido a variabilidades genética e bioquímica (VIEIRA, 2000), e dificuldade de multiplicação (PEREIRA, 2003). Além disso, o declínio no teor de princípios ativos ou de óleos essenciais em plantas medicinais é comum quando estas são cultivadas por longos períodos e submetidas a vários cortes (PEREIRA et al., 1999). Neste contexto, torna-se imprescindível a realização de estudos mais aprofundados de âmbito farmacológico, terapêutico e agrônômico, para o cultivo em larga escala e a conservação destas espécies (MORAIS et al., 2012).

Atualmente, as aplicações da biotecnologia na área agrícola e de plantas medicinais têm sido bastante difundidas (MORAIS et al., 2012). Exemplos dessas aplicações são a clonagem, cultura de células, tecidos e órgãos, obtenção de plantas haplóides a partir de cultura de anteras, produção de metabólitos secundários em biorreatores, geração de variantes somaclonais, microenxertia, tecnologia dos protoplastos e criopreservação (KERBAUY, 2003).

A cultura de tecidos vegetais tem sido considerada ferramenta promissora para a preservação de fontes vegetais, bem como a propagação comercial de plantas medicinais (ABREU, et al., 2003), podendo resolver ou minimizar pontos na multiplicação sistematizada de plantas elites pelo processo de micropropagação (MORAIS et al., 2012). Além disso, pode ser empregada na produção de metabólitos secundários que tenham relevância do ponto de vista terapêutico e que, por algum tipo de impedimento, não são sintetizados (PEREIRA, 2003).

2.2 A ESPÉCIE *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis

A espécie *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis pertence à Divisão Magnoliophyta (plantas com flor), Classe Magnoliopsida (dicotiledôneas), Ordem Rhamnales e Família Vitaceae (LOMBARDI, 2000). *Cissus sicyoides* é sinônimo de *C. verticillata* deixando, portanto, de ser usado (NICOLSON & JARVIS, 1984; LOMBARDI, 1994).

A família Vitaceae compreende 12 gêneros com cerca de 800 espécies, possui distribuição tropical e subtropical. No Brasil, em estado nativo, ocorre apenas o gênero *Cissus*, com cerca de 50 espécies (SOUZA & LORENZI, 2005). Pertence a esta família a videira ou parreira, que produz a uva, utilizada in natura ou na produção de vinhos. Algumas Vitaceae são cultivadas como ornamentais, com destaque para a hera-japonesa (*Parthenocissus tricuspidata* Planchon), muito utilizada na forração de fachadas e muros, com gavinhas dotadas de discos adesivos. Entre as espécies nativas destacam-se o anil trepador, *Cissus verticillata*, comum principalmente na região sudeste e a mãe-boia (*Cissus gongylodes* (Burch. ex Baker) Planch.) que são frequentemente utilizadas como medicinais (SOUZA & LORENZI, 2008).

O gênero *Cissus* (L.) é o maior da família Vitaceae, com cerca de 350 espécies. É um gênero neotropical, ocorrendo principalmente na América do Sul. As espécies ocorrem em matas primárias, secundárias, cerrados, caatingas, campos, vegetações de altitude e litorânea (LOMBARDI, 1994). É representado por arbustos sarmentosos, nodosos, com râmulos articulados, folhas inteiras ou lobadas com duas estípulas peciolares (BERG, 1993).

Várias espécies de *Cissus* são estudadas e possuem diversas atividades, como por exemplo: atividade antimicrobiana e antiinflamatória (GARCIA et al., 2000), atividade antidiabética de *Cissus sicyoides* L. (BELTRAME, 2001), efeitos neurofarmacológicos de *Cissus quadrangularis* L. (VISWANATHA SWAMY et al., 2006). Outras atividades farmacológicas pertencentes ao gênero *Cissus*: antioxidante e antimicrobiana (MURTHY et al., 2003; SILVA et al., 2007), inibidor da enzima acetilcolinesterase (BARBOSA-FILHO et al., 2006), hipoglicemiante (BARBOSA et al., 2002), na prevenção da osteoporose (SHIRWAIKAR et al., 2003).

A espécie *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis (Figura 1) é conhecida popularmente como insulina vegetal (BRAGA et al., 2011), cortina japonesa, cipó-pucá (BARBOSA et al., 2002), anil trepador (BELTRAME et al., 2001; SOUZA & LORENZI, 2005) e uva-brava (POTT & POTT, 1994).



Fonte: ALIPI & PICHARDO, 2007.

Figura 1: *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis

A espécie desenvolve-se em altitudes de 0 a 1800 m, florindo e frutificando ao longo de todo o ano. Distribui-se do México, Caribe e América do Sul, exceto no Chile até o centro-sul da Argentina (LOMBARDI, 2000). No Brasil do Amazonas ao Rio Grande do Sul (POTT & POTT, 1994).

C. verticillata pode ser encontrada como trepadeira (com até 10 metros) ou arbusto perene (com até 3 metros). Tem caule flexível, às vezes com pelos (caules jovens). Sobre o caule, no ponto onde nasce cada folha, ocorre um par de estípulas. As folhas são alternadas, simples e de formas variáveis (ovaladas, ovaladas-elípticas ou oblongas), lobadas ou profundamente partidas, podendo atingir 15 cm de comprimento por 12,5 cm de largura, pontiagudas, de base variável (redonda, cordada, sagitada), às vezes cobertas de pêlos e margens denteadas. As inflorescências são opostas às folhas, com flores pequenas, branco-esverdeadas, brancas, amarelas ou raramente rosas (Figura 1). Os frutos são obovóides a globosos, carnosos, com até 1 cm de largura, de cor púrpura a negro (ALIPI & PICHARDO, 2007). Os frutos de *C. verticillata* podem ser comidos, apesar de insípidos (LOMBARDI, 1994).

Na medicina popular *C. verticillata* é utilizada na forma de chá das folhas no tratamento da diabetes (BARBOSA et al., 2002). É utilizada também como antiinflamatório,

antiepilético, antihipertensivo, antitérmico, antireumático (BELTRAME et al., 2001), antigripal, contra infecções respiratórias (GARCIA et al., 1999; AGRA et al., 2007), dislipidemia, problemas urinários (LANS, 2006) e indigestão (FERREIRA et al., 2008).

Cissus verticillata (L.) Nicolson & C. E. Jarvis possui algumas atividades farmacológicas comprovadas.

Atividade hipoglicemiante, associada à presença de polissacarídeos sendo os resultados coerentes com as investigações feitas em espécies do gênero *Cissus* (LIMA et al., 2001)

Em ratos com diabetes induzida, tratados por período de 7 dias, com extrato aquoso das folhas de *C. verticillata*, nas doses de 100 e 200 mg/kg, observou-se redução significativa dos níveis de glicemia em 25 e 22% respectivamente. Depois do quarto dia de tratamento, com dose de 200 mg/kg, os níveis de triglicerídeos reduziram 48%. (VIANA et al., 2004).

Ratos diabéticos induzidos que receberam o decocto das folhas de *C. verticillata* no lugar da água obtiveram redução significativa na glicemia, uréia e glicosúria quando comparados com o grupo controle. (PEPATO et al., 2003).

Na administração do extrato aquoso das folhas de *C. verticillata* em ratos normoglicêmicos detectou-se 19,5% de redução na glicemia dos animais tratados em relação ao grupo controle (BARBOSA et al, 2002).

Os compostos obtidos a partir do extrato metanólico das partes aéreas de *C. verticillata*, apresentaram atividade antibacteriana contra *Bacillus subtilis* com concentração inibitóriamínima de 50 e 100 µg/mL respectivamente (BELTRAME et al., 2002).

O extrato aquoso de *C. verticillata* apresentou atividade inibitória contra bactérias Grampositivas e Gram-negativas (GARCIA et al., 1999).

C. verticillata também obteve atividades farmacológicas no tratamento de convulsão, doenças do coração (COSTA, 1990).

A espécie vegetal *C. verticillata* contém cetoesteróides, carotenóides, vitamina E e alcalóides. Na fração acetato de etila, do extrato aquoso das folhas, foram isolados os flavonóides kaempherol (3,5,7-tri-hidroxi-2-(4-hidroxifenil)-4h-1-benzopiran-4-ona), luteolina (2-(3,4-Di-hidroxifenil)-5,7-dihidroxi-4H-1-benzopiran-4-ona) e sulfato de 3`luteolina (BARBOSA et al., 2002). Na análise por cromatografia de camada delgada de sílica gel (CCD) pode-se constatar a ocorrência de quercetina (2-(3,4-di-hidroxifenil)-3,5,7-trihidroxi-4H-1-benzopiran-4-ona) e kaempherol. O doseamento de flavonóides totais por espectroscopia no UV forneceu valores de 4,75% no vegetal seco, 3,8% no extrato aquoso,

3,6% no extrato fluido e 3,2% na tintura. Assim, pode-se propor a quercetina como marcador nas análises de controle de qualidade por CCD (SOARES & BARBOSA, 2007).

Na análise do extrato hidroalcoólico da planta inteira constatou-se a presença dos metabólitos secundários taninos, terpenos esteróides/triterpenóides e alcalóides (DOMINICI et al., 2003). Já das partes aéreas foram isoladas e identificadas as cumarinas 5,6,7,8-tetrahidroxicumarina-5-xylopyranosídeo e sabadina, os flavonóides Kaempferol 3-ramínosídeo e quercetina 3-ramínosídeo e os triterpenos esteroidais sitosterol, sitosterol-D-glicopiranosídeo e antocianinas (BELTRAME et al., 2002; GARCIA et al., 1999).

Do extrato metanólico das partes aéreas de *Cissus sicyoides* foram também identificados os compostos b-sitosterol e sitosterol-b-Dglicopiranosídeo (BELTRAME et al., 2002). O biciclogermacreno foi encontrado no extrato clorofórmico das folhas (SILVA et al., 2007) e o resveratrol (3',4',5-triidroxiestilbeno) no extrato acetato de etila das folhas (SILVA et al., 2007; QUÍLEZ et al., 2004).

2.3 CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS

A cultura de tecidos vegetais é uma técnica com grandes aplicações na agricultura. Nessa técnica, pequenos fragmentos de tecido vivo, chamados explantes, são isolados de um organismo vegetal, desinfestados e cultivados assepticamente, por períodos indefinidos em um meio de cultura apropriado. O objetivo é obter novas plantas idênticas à original, ou seja, realizar uma clonagem vegetal que é definida como uma propagação assexuada de células ou organismos de modo a obter novo indivíduo, mantendo-se o genótipo idêntico àquele do ancestral comum (TORRES et al., 2000).

Esta técnica consiste no cultivo de células ou tecidos vegetais sob condições químicas e físicas apropriadas, representando uma das áreas de maior êxito da biotecnologia (GIACOMETTI, 1990). A regeneração de plantas através da cultura de tecidos baseia-se no princípio da totipotência, proposto pelo fisiologista Haberlandt, que em 1902, enunciou que cada célula vegetal possuía o potencial genético para regenerar uma planta inteira (FLORES et al., 2006). Além disso, os vegetais são capazes de produzir um grande número de metabólitos *in vitro* (RAO & RAVISHANKAR, 2002). O cultivo *in vitro* permite ainda aperfeiçoar a interação entre fatores abióticos (nutricionais, luminosos, temperatura, etc.) e bióticos (hormonais e genéticos), resultando em plantas saudáveis, vigorosas e geneticamente superiores, que podem ser multiplicadas massivamente (ALVES et al., 2012).

A propagação por meio de cultura de tecidos pode ser feita por via direta ou indireta, esta última via formação de calos, que é considerada uma forma potencial de propagação em massa (LANDA et al., 2000). Estudos com calos devem ser desenvolvidos para determinar as condições de cultura que os explantes requerem para sobreviver e crescer (SIQUEIRA & INOUE, 1992).

O cultivo de calos pode ser utilizado para se estudar o desenvolvimento celular, explorar produtos provenientes do metabolismo primário e secundário, obter suspensão celular e propagação via formação de gemas ou embriões somáticos (LANDA et al., 2000).

Em plantas medicinais, a cultura de tecidos tem auxiliado na propagação clonal de diversos genótipos, permitindo a conservação do germoplasma; a obtenção de novas fontes de variabilidade através do cultivo de calos e células; na engenharia genética e na otimização da produção de metabólitos (RAO & RAVISHANKAR, 2002; ARIKAT et al., 2004).

2.3.1 Reguladores de Crescimento

O termo regulador de crescimento define substâncias químicas sintéticas que têm efeito sobre o metabolismo vegetal (LAMAS, 2001). A composição e concentração de hormônios no meio são fatores determinantes no crescimento e no padrão de desenvolvimento na maioria dos sistemas de cultura de tecidos (CALDAS et al., 1998). Reguladores vegetais são adicionados ao meio de cultura para auxiliar o crescimento e também são importantes no direcionamento da resposta do desenvolvimento dos propágulos (HARTMANN et al., 2002). A presença de reguladores de crescimento no meio de cultura propiciou amplo avanço das técnicas que constituem a biotecnologia atual (FRANÇA, 2001).

Dentre os fitorreguladores utilizados na fase de multiplicação destacam-se as citocininas, as quais participam de vários processos fisiológicos e de desenvolvimento, incluindo a divisão celular, morfogênese da parte aérea e das raízes e senescência (CALDAS, et al., 1998). As citocininas são reguladores de crescimento que desempenham um papel fundamental no crescimento e cultura de tecidos, estimulando a divisão celular, bem como a indução e a proliferação de gemas axilares, além de quebrarem a dominância apical (HU & WANG, 1983). O tipo de citocinina e sua concentração são os fatores que mais influenciam o sucesso da multiplicação *in vitro* (SCHUCH & ERIG, 2005). Dentro do grupo de citocininas encontramos BAP (benzilaminopurina), KIN (cinetina), 2-iP (2-isopentenil adenina) e ZEA (zeatina), as quais são empregadas para formação de brotos. O uso de citocininas é muito

favorável na fase de multiplicação *in vitro*, sendo o tipo e a concentração os principais fatores que influenciam no processo (SOUZA et al., 2003).

Outro grupo, o das auxinas (AIA - ácido indol acético, ANA - ácido naftaleno acético e AIB - ácido indol 3-butírico), pode ser utilizado na fase de multiplicação, porém em baixas concentrações (CALDAS, et al., 1998; HARTMANN, et al., 2002). Já o 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), que também é uma auxina, é usado para promover a formação de calos e pode também causar variação genética no cultivo de células ou de tecidos (GEORGE, et al., 2008). As auxinas são substâncias quimicamente relacionadas com o ácido indol-3-acético (AIA), que é a auxina principal de várias plantas. Essas substâncias têm em comum a capacidade de atuar na expansão e no alongamento celular, ajudando também na divisão celular em cultura de tecidos, principalmente no enraizamento (KRIKORIAN, 1991). Entre outras substâncias usadas para o enraizamento *in vitro* estão o ácido naftaleno acético (ANA), o ácido 2-4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e o ácido indolbutírico (AIB) (ROSS, 1992).

As auxinas são geralmente utilizadas quando o propósito for o alongamento celular, a expansão dos tecidos e divisão celular (formação de calo), a formação de raízes e a embriogênese dos cultivos em suspensão; já as citocininas são frequentemente utilizadas para estimular o crescimento e desenvolvimento de brotações múltiplas (PIERIK, 1990; GEORGE, et al., 2008).

A escolha das citocininas e das auxinas nos cultivos *in vitro* depende de cada pesquisador, porém mesmo com escolhas diferentes, podem-se obter resultados similares. O estabelecimento de brotos e a multiplicação do número destes podem ser promovidos por uma citocinina sem a adição de auxinas. Experimentos com algumas espécies demonstraram que as auxinas podem ser desnecessárias e podem reduzir a capacidade dos brotos de enraizar. Já a adição de mais de uma citocinina pode aumentar a produção ou melhorar a qualidade dos brotos (GEORGE, et al., 2008).

2.3.2 Calogênese e Culturas de Células em Suspensão para Produção *in vitro* de Metabólitos Secundários

O calo é um aglomerado de células e tecidos formado pela intensa divisão das células do explante. O tipo de calo formado em um determinado genótipo, seu grau de diferenciação celular e potencial morfogenético dependem, sobretudo do explante, meio de cultura e fitoreguladores. Também podem diferir em textura, consistência e coloração. Alguns calos

são compactos e crescem vagorosamente, outros são friáveis e são mais difíceis de manipular (FLORES et al., 2006).

O cultivo de calos, células e órgãos *in vitro* tem sido uma alternativa viável para o estudo e a produção de metabólitos secundários (KOLLÁVORÁ, 2004; ARIKAT., 2004; OKSMAN-CALDENTEY & INZÉ, 2004). Em geral, o método mais utilizado para o estudo da produção de metabólitos é o cultivo de células em suspensão (BOTTA et al., 2001). Para isso, faz-se necessário determinar protocolos eficientes para a indução e manutenção de calos friáveis. Adicionalmente, a constatação de que ocorrem modificações no teor de compostos de acordo com o grau de diferenciação dos tecidos, levou ao desenvolvimento de um grande número de pesquisas com o intuito de estudar a viabilidade de produção de compostos em calos com diferentes características, principalmente no que diz respeito à consistência e ao potencial morfogênico (FLORES et al., 2006).

A formação de calos em um explante, denominada calogênese, é uma etapa básica para o desenvolvimento de sistemas de propagação massiva de plantas por organogênese ou embriogênese somática. É útil também quando se deseja produzir células para manipulações genéticas, como hibridações somáticas, poliploidizações e transformações (VENTURIERI & VENTURIERI, 2004).

Para ocorrer a indução de calo, 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). Explantes oriundos de tecidos jovens, não lignificados, são mais apropriados para a cultura de calo (PIERIK, 1990).

Calos podem ser multiplicados por sucessivas subculturas, mantidos *in vitro* por longos períodos e são de grande importância para estudos morfogenéticos *in vitro* e através da suspensão de células para a obtenção de produtos secundários, incluindo fármacos, representam uma biotecnologia de grande interesse científico e comercial (REBOUÇAS & ALMEIDA, 2009).

Várias espécies de plantas medicinais têm sido submetidas a experimentos de indução de calos utilizando reguladores vegetais (LAMEIRA et al., 1994). Geralmente, concentrações semelhantes de auxina e de citocinina no meio promovem a formação de calos, mas isso varia em função do balanço hormonal de cada espécie. A produção de calos pode ser induzida apenas pela adição de auxina, mas a adição de citocinina pode aumentar a proliferação do mesmo (TISSERAT, 1985).

Em plantas medicinais, a cultura de tecidos tem auxiliado na propagação clonal de diversos genótipos, permitindo a conservação do germoplasma; a obtenção de novas fontes de variabilidade através do cultivo de calos e células; na engenharia genética e na otimização da produção de metabólitos (BOTTA et al., 2001; RAO & RAVISHANKAR, 2002; ARIKAT, 2004). Pesquisas têm demonstrado sucesso na produção de metabólitos secundários em diferentes órgãos e culturas não organizadas como calos e suspensão de células (KARAM et al., 2003; FURDEN et al., 2005; GYORGY et al., 2005). O crescimento de calos é desejável para induzir variação somaclonal e realizar estudos fisiológicos, principalmente quando se deseja relacionar a presença de produtos secundários com o crescimento celular (PIERIK, 1990). O crescimento de calos permite em alguns casos o desenvolvimento de culturas de células que acumulam compostos em níveis mais elevados do que a planta da qual elas se originaram (REBOUÇAS & ALMEIDA, 2009).

O metabolismo secundário manifesta-se em células e tecidos específicos em determinados estágios de crescimento de plantas superiores e a expressão desse metabolismo está intimamente correlacionada com o crescimento e a diferenciação morfológica de células (CERQUEIRA et al., 2002). Os metabólitos secundários são essencialmente produzidos e extraídos a partir de plantas cultivadas no campo sofrendo, portanto, a influência de variações sazonais, pragas, doenças e condições meteorológicas (VIANA et al., 2004).

Visando otimizar a produção *in vitro* de compostos de interesse farmacológico, biorreatores têm sido empregados devido aos menores custos e capacidade de produzir tecidos diferenciados contendo significativas quantidades de metabólitos secundários (WILKEN et al., 2005; GERTH et al., 2006).

A aplicação das técnicas de cultura de tecidos em plantas medicinais tem como perspectivas a obtenção de germoplasma competitivo e adaptado a diversos métodos de cultivo, escolha de novas espécies que servirão como fonte de compostos biologicamente ativos e aprimoramento da produção de fitofármacos. Nesse sentido, a cultura de tecidos dispõe alternativas para uma maior produção de biomassa e para garantir a perpetuação de espécies de interesse econômico (MORAIS et al., 2012).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 COLETA E DESINFESTAÇÃO DOS EXPLANTES

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Rondônia, em Porto Velho. As folhas, coletadas em plantas mantidas em casa de vegetação, foram lavadas em água bidestilada e detergente com o auxílio de uma esponja esterilizada e, em seguida, segmentadas em porções menores e colocadas em frascos. Em câmara de fluxo laminar, os segmentos foliares foram imersos em etanol 70% (v/v) por 1 minuto e em solução de hipoclorito de cálcio 5,0% (p/v) por 30 minutos, e enxaguados três vezes em água destilada estéril. Os segmentos foram cortados em explantes de 1 cm², os quais foram inoculados individualmente em tubos de ensaio (Figura 2).

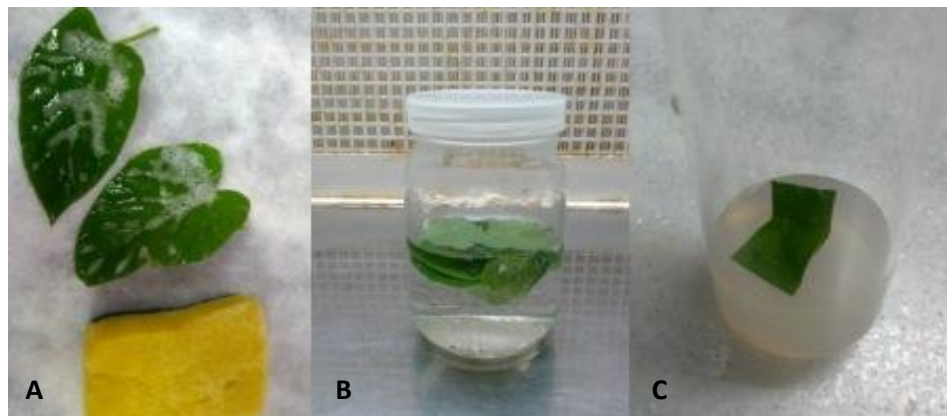


Figura 2: *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis. (A) Procedimento de pré-limpeza. (B) Desinfestação. (C) Explante recém-inoculado. Fotos: Eloísa Santana Paz, 2013.

3.2 INDUÇÃO DE CALOS

Os segmentos foram inoculados em meio MS (Murashige e Skoog, 1962) suplementado com 3% de sacarose, 0,6% de ágar, ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (0,0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg.L⁻¹) e benzilaminopurina (BAP) (0,0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg.L⁻¹) em combinações fatoriais. O pH do meio foi ajustado para 5,8±0,1 antes da autoclavagem a 120°C e 1 atm por 20 minutos. Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições, cada uma composta por quatro tubos de ensaio, com um explante cada. Os cultivos foram mantidos no escuro, em sala de crescimento, a 24±2°C. As avaliações foram realizadas em intervalos de

sete dias. Ao final de 42 dias foi avaliada a área de cada explante coberta por células de calo de acordo com a metodologia descrita por Santos et al. (2010), e a massa fresca dos explantes foi quantificada em balança analítica com precisão de 0,0001 g. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Foi utilizado o programa estatístico Biostat 5.0.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 NECROSE DOS EXPLANTES

Aos sete dias após a inoculação, todas as concentrações de 2,4-D (0,0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg.L⁻¹) e BAP (0,0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg.L⁻¹) causaram intumescimento em 100% dos explantes, o que não foi observado no controle experimental. Porém, o 2,4-D apresentou efeito tóxico, causando necrose em todos os explantes, na região em contato com o meio (Figura 3). Foi observado que nos tratamentos em que não se utilizou este regulador de crescimento não ocorreu necrose, inclusive no controle experimental.



Figura 3: Explantes de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis inoculados em meio contendo 2,4-D. Fotos: Josilene Félix da Rocha.

4.2 INDUÇÃO DE CALOS

Aos 14 dias foi observada presença de calos em todos os explantes, exceto no controle experimental. A necrose dos explantes nos meios contendo 2,4-D aumentou consideravelmente, comprometendo o subsequente desenvolvimento dos calos. Nos meios contendo apenas BAP, os calos não oxidaram e continuaram a se desenvolver visivelmente.

Aos 42 dias após a inoculação, não se observou necrose ou indução de calos no controle experimental. Os segmentos foliares permaneceram verdes, sem alterações. Os calos que vinham sendo cultivados nos meios contendo 2,4-D necrosaram completamente. A utilização de BAP isoladamente, em todas as concentrações, resultou em indução e crescimento de calos (Tabela 1).

Tabela 1: Porcentagens de calogênese em explantes de *C. verticillata* submetidos a combinações fatoriais de 2,4-D (0,0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg.L⁻¹) e BAP (0,0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg.L⁻¹), após 42 dias de cultivo.

BAP (mg.L ⁻¹)	2,4-D (mg.L ⁻¹)	Calogênese (%)*
0	0	0 b
0	1	100,0 a
0	2	100,0 a
0	4	100,0 a
1	0	100,0 a
1	1	100,0 a
1	2	100,0 a
1	4	100,0 a
2	0	100,0 a
2	1	100,0 a
2	2	100,0 a
2	4	100,0 a
4	0	100,0 a
4	1	100,0 a
4	2	100,0 a
4	4	100,0 a

*Valores seguidos por letras iguais dentro da mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%.

As concentrações de BAP não diferiram em relação à porcentagem de indução de calos, pois todas causaram indução em 100% dos explantes. Já Rodrigues e Almeida (2010) subcultivaram calos de *Cissus sicyoides* L. em meio sólido MT + 1,0 mg.L⁻¹ ANA, variando-se as concentrações de BAP em: 2,0; 4,0; 6,0 e 12,0 mg.L⁻¹. A concentração de 4,0 mg.L⁻¹ de BAP, promoveu o maior número de calos compactos e o maior número de calos friáveis foi obtido utilizando-se 12 mg.L⁻¹ de BAP.

Carvalho et al. (2011), constataram que a formação de calos em *Vitis vinifera* L. cv. Merlot foi influenciada significativamente pelo tipo de explante usado, considerando que internódios são mais responsivos à formação de calo, alcançando em média 47,4%, por outro lado, os segmentos foliares apresentam uma média geral de apenas 7,2%. O tipo de citocinina não apresentou diferenças estatísticas, resultando numa formação de calos de 21,9% com

BAP e 32,7% com TDZ. O melhor resultado para a formação de calos foi 90% obtido com 2,5 M de TDZ em internódios.

Jaskani et al. (2008) trabalhando com a cultivar Perlette de *Vitis vinifera* L, utilizou 1 μM de ANA no meio de cultivo que promoveu a formação de calos em segmentos nodais (40%), em discos foliares (80%) e em ápices caulinares (10%), além de também induzir enraizamento nesses explantes.

Com relação à capacidade de formação de calos das citocininas, Biasi et al. (1998), obtiveram bons resultados em segmentos nodais do porta-enxerto de videira Jales (*Vitis vinifera* L), em que o BAP induziu à formação de calos, variando entre 32,8 a 100% nas concentrações de 2,5 a 10 μM .

Para a micropropagação de *Cissus tiliacea* Kunth, Jiménez-Martínez et al. (2011), testaram os meios de cultura MS e WPM e determinou que o estabelecimento *in vitro* é possível em ambos. Quanto as concentrações de BAP utilizadas, ele considerou que a mais adequada para o estabelecimento e multiplicação *in vitro* estaria entre 0 e 0,5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

Lima et al. (2008) obtiveram resultados contrários trabalhando com indução de calos em segmentos foliares *Croton urucurana* Baill., onde o uso de BAP isoladamente e a combinação entre ANA e BAP não promoveram calogênese; já a combinação de 2,4-D e BAP ou TDZ apresentou indução de calos, porém a máxima produção de células de calo ocorreu com a utilização do 2,4-D, isoladamente, nas concentrações de 3,0; 4,0 e 5,0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Assim como Oliveira et al. (2006) avaliaram o efeito de BAP e 2,4-D na formação de calos em explantes de feijão caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) e observaram efeitos positivos de 2,4-D, isoladamente ou em associação com o BAP. Por outro lado, BAP isoladamente não resultou em calogênese.

Apresentando resultados contrários, Nogueira et al. (2007) concluíram que não houve efeito positivo da utilização de BAP ou TDZ em interação com 2,4-D na calogênese em explantes foliares de murici-pequeno (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth.), uma planta utilizada como medicinal.

Demonstrando resultados positivos quanto a utilização das auxinas, Pereira et al., (2007) testaram o efeito de diferentes concentrações e tipos desses reguladores (2,4-D, Picloram, ANA e AIB) nas seguintes concentrações, 0,0; 0,5; 1,0 e 2,0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, para a indução de calos em explantes foliares de *Uncaria guianensis* J. F. GMEL., e, houve a formação de calos sob todas as auxinas testadas, e, as melhores respostas na porcentagem de indução foi obtida com a utilização de 2,4-D e picloram no meio de cultura.

4.3 ÁREA FOLIAR COBERTA POR CÉLULAS DE CALOS

Em relação à área foliar coberta por células de calo (%AFCC), as maiores porcentagens foram observadas nos tratamentos suplementados 1,0 ou 4,0 mg.L⁻¹ de BAP, onde todos os explantes apresentaram entre 75 e 100% da AFCC (Tabela 2).

Tabela 2: Área foliar coberta por células de calo (AFCC) em explantes de *C. verticillata* submetidos a combinações fatoriais de 2,4-D (0,0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg.L⁻¹) e BAP (0,0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg.L⁻¹), após 42 dias de cultivo.

BAP (mg.L ⁻¹)	2,4-D (mg.L ⁻¹)	%AFCC			
		0-25%	25-50%	50-75%	75-100%
0	0	0 e	0 h	0 g	0 d
0	1	0 e	58,8 bc	41,2 c	0 d
0	2	0 e	94,4 a	5,5 gh	0 d
0	4	0 e	100,0 a	0 f	0 d
1	0	0 e	0 h	0 f	100,0 a
1	1	0 e	11,8 f	70,6 a	17,6 c
1	2	5,9 de	58,8 bc	29,4 d	5,9 d
1	4	37,5 b	43,8 d	12,5 fg	6,3 d
2	0	0 e	0 h	18,8 ef	81,2 b
2	1	16,7 c	66,7 b	11,1 fg	5,6 d
2	2	33,3 b	40,0 d	26,7 de	0 d
2	4	50,0 a	50,0 cd	0 f	0 d
4	0	0 e	0 h	0 f	100,0 a
4	1	0 e	0 h	23,5 de	76,5 b
4	2	6,2 de	6,2 fg	62,6 ab	25,0 c
4	4	14,3 cd	28,6 e	57,1 b	0 d

*Valores seguidos por letras iguais dentro da mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%.

Entretanto, para Rodrigues e Almeida (2010), trabalhando com calos de *Cissus sicyoides* L., a concentração de 6,0 mg.L⁻¹ BAP, foi aquela com maior número de explantes com 100% de área coberta com calos.

Cerqueira et al. (2002), trabalhando na indução de calos em segmentos foliares de erva-de-touro (*Tridax procumbens* Linn) obteve o melhor resultado quando se adicionou ao

meio MS 2,0 mg.L⁻¹ de ANA + 2,0 mg.L⁻¹ de BAP, resultando em 100% de área coberta com calos.

A utilização de BAP isoladamente, em todas as concentrações, resultou em calos brancos e friáveis (Figura 4). Segundo George et al. (2008), a textura e morfologia do calo, manipulada pelas variações nos constituintes do meio nutritivo, produz calos macios, friáveis e úmidos, em meio de alta concentração de auxina e baixa de citocinina e se a relação é inversa, produz calos de tecido compacto seco e com células pequenas.



Figura 4: Explantes de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis inoculados em meio contendo BAP, isoladamente. Fotos: Josilene Félix da Rocha.

Vieira et al. (1995) trabalhando com a indução e caracterização de calos em *Gomphrena macrocephala* St.-Hil., obtiveram calos compactos em segmentos nodais cultivados em meio MS suplementado com 2,7 µM de ANA e 4,4 µM de BAP. Maior proliferação de calos friáveis foi obtida cultivando-se segmentos nodais de *Paffia tuberosa* (Spreng.) Hicken., com 1 mM de BAP e 10 mM de 2,4-D em meio MS (FLORES et al., 2006).

Pereira et al., (2007) também observaram efeito positivo das auxinas, o meio com picloram (0,0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹) proporcionou a formação de calos com aspecto friável, enquanto nos meios com 2,4-D, ANA e AIB, nas mesmas concentrações, ocorreu a formação de calos com aspecto compacto. Quanto à coloração, os calos oriundos de meios com picloram tiveram a cor verde-clara. No meio com 2,4-D os calos foram de cor verde-escuro; no meio com ANA, os calos foram de cor creme e no meio com AIB os calos foram de cor marrom.

4.4 MASSA FRESCA

Quanto à massa fresca dos explantes, os maiores valores também foram observados nos tratamentos contendo apenas BAP (Tabela 3). A suplementação com 4,0; 1,0 e 2,0 mg.L⁻¹ de BAP resultou em 18,19; 14,03 e 12,33 g de massa fresca, respectivamente.

Tabela 3: Massa fresca total dos explantes de *C. verticillata* submetidos a combinações fatoriais de 2,4-D (0,0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg.L⁻¹) e BAP (0,0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg.L⁻¹), após 42 dias de cultivo.

BAP (mg.L ⁻¹)	2,4-D (mg.L ⁻¹)	MASSA FRESCA TOTAL (g)*
0	0	0,91 g
0	1	5,42 cdef
0	2	3,95 ef
0	4	2,78 fg
1	0	14,03 b
1	1	7,81 c
1	2	6,09 cde
1	4	5,51 cdef
2	0	12,33 b
2	1	5,22 cdef
2	2	4,63 def
2	4	3,39 efg
4	0	18,19 a
4	1	11,82 b
4	2	7,62 cd
4	4	5,73 cdef

*Valores seguidos por letras iguais dentro da mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%.

Lima et al. (2008) obtiveram resultados contrários, trabalhando com indução de calos em segmentos foliares *Croton urucurana* Baill., onde o uso isolado de 2,4-D proporcionou o maior peso fresco dos calos obtidos. Já para Cerqueira et al., (2002) o melhor resultado para o peso da matéria fresca dos calos formados em segmentos foliares de *Tridax procumbens* Linn, foi obtido com ANA na concentração de 2,0 mg.L⁻¹ + 2,0 mg.L⁻¹ de BAP e os maiores pesos de matéria seca foram obtidos com 1,0 mg.L⁻¹ de AIB e também por 2,0 mg.L⁻¹ de ANA e de AIB.

Pereira et al., (2007) testaram o efeito de diferentes concentrações e tipos de auxina (2,4-D, Picloram, ANA e AIB), nas concentrações 0,0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹, em explantes foliares de *Uncaria guianensis* J. F. GMEL., e constataram o efeito positivo dessas auxinas. Embora, a matéria fresca de calos cultivados em meio com picloram tenha sido superior em relação aos calos obtidos em meio com 2,4-D, AIB e ANA, evidenciando que os calos obtidos em meio com picloram foram mais friáveis que calos cultivados com as demais auxinas.

CONCLUSÕES

Para a indução de calos em explantes foliares de *Cissus verticillata* recomenda-se a utilização de meio de cultura MS suplementado com BAP na concentração de $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$ o que resulta em calogênese em todos os explantes, com 100% da área foliar coberta por células de calos, os quais tem peso médio de 18,19 g.

REFERÊNCIAS

- ABREU, I. N.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; MORAES, A. R.; GEROMEL, C.; LADEIRA, Â.; LAMEIRA, O. A. Propagação *in vivo* e *in vitro* de *Cissus sicyoides*, uma planta medicinal. **Acta Amazônica**, v. 33, n. 1, p. 1-7, 2003.
- AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17(1), p. 114-140, 2007.
- ALIPI, M. H.; PICHARDO, J. M. **Vitaceae - *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis, Tripa de vaca**. 2007.
- ALVES, C.; OLIVEIRA, J. R.; REIS, E. S.; CORREA, R. M.; SOUZA, J.; SILVA, J. C. O.; PAULA, J. C. R.; RODRIGUES, L. H. F.; SOUZA, M. A.; MENDONÇA, M. R. A Cultura de Tecidos na Agricultura. In: Jornada Científica 1., 2012, Bambuí-MG. **Anais... Bambuí-MG: CEFET**, 2012. 3 p
- ARIAS, T. D. **Glosario de medicamentos: desarrollo, evaluación y uso**. Washington: Organización Panamericana de La Salud/Organización Mundial de La Salud, 1999.
- ARIKAT, N. A. Micropropagation and accumulation of essential oils in wild sage (*Salvia fruticulosa* Mill.). **Scientia Horticulturae**, v. 100, p. 193-202, 2004.
- BARBOSA-FILHO, J. M.; VASCONCELOS, T. H. C.; ALENCAR, A. A.; BATISTA, L. M.; OLIVEIRA, R. A. G.; GUEDES, D. N.; FALCÃO, H. S.; MOURA, M. D.; DINIZ, M. F. F. M.; MODESTO-FILHO, J. Plants and their active constituents from South, Central, and North America with hypoglycemic activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 15: 392-413. 2005.
- BARBOSA-FILHO, J. M.; MEDEIROS, K. C. P.; DINIZ, M. F. F. M.; BATISTA, L. M.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; SILVA, M. S.; CUNHA, E. V. L.; ALMEIDA, J. R. G. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 16: 258-285. 2006.
- BARBOSA, W. L. R.; SANTOS, W. R. D.; PINTO, L. N.; TAVARES, I. C. C. Flavonóides de *Cissus verticillata* e a atividade hipoglicemiante do chá de suas folhas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 13-15, 2002.
- BELTRAME, F. L.; SARTORETTO, J. L.; BAZOTTE, R. B.; CUMAN, R. N.; CORTEZ, D. A. G.; FERNANDES, L. C.; TCHAIKOVSKI, O. Estudo fitoquímico e avaliação do potencial antidiabético do *Cissus sicyoides* L.(Vitaceae). **Química nova**, v. 24, n. 6, p. 783-785, 2001.
- BELTRAME, F. L.; PESSINI, G. L.; DORO, D. L.; DIAS FILHO, B. P.; BAZOTTE, R. B.; CORTEZ, D. A. G. Evaluation of the antidiabetic and antibacterial activity of *Cissus sicyoides*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 45(1), 2002.
- BELTRAME, F.; FERREIRA, A.; CORTEZ, D. Coumarin Glycoside from *Cissus sicyoides*. **Natural Product Research**, v. 16(4), p. 213-216, 2002.

- BERG, M. E. V. D. **Plantas medicinais da Amazônia: contribuição ao seu conhecimento sistemático**. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi. 2 ed. 1993. 207 p.
- BIASI, L. A.; PASSOS, I. R. S.; POMMER, C. V. Estabelecimento *in vitro* de porta-enxertos de videira através de ápices meristemáticos e segmentos nodais. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.55, n.2, p.196-202, 1998.
- BOTTA, B.; SILVESTRINI, A.; MONACHE, G. D. Cultura de células vegetais: doze anos de experiência. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química moderna**. Chapecó: Argos, 2001. p. 354- 379.
- BRAGA, T. V.; PINTO, J. T.; BARROS, M. E. S; OLIVEIRA, T. T.; DORES, R. G. R.; NAGEM, T. J. Atividade antifúngica das folhas de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & CE Jarvis subsp. verticillata frente a *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 43, n. 3, p. 222-5, 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **A Fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.148 p.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E.; TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. Meios Nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformações genética de plantas**. Brasília: Embrapa-CNPq, v.1. 1998.
- CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal review. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, n.1-2, p.131-4, 2005.
- CARVALHO, D. C. D.; SILVA, A. L. L. D.; TANNO, G. N.; PURCINO, M.; BIASI, L. A. Organogenesis from leaf segments and internodes of grapevine cv. Merlot. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 1, p. 108-114, 2011.
- CERQUEIRA, E. S.; PINTO, J. E. B. P.; DE MORAIS, A. R.; DE CASTRO, N. E. A.; CARDOSO, M. D. G.; LAMEIRA, O. A. Indução de calos em erva-de-touro (*Tridax procumbens* L.) utilizando diferentes reguladores de crescimento e tipos de explantes. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.26, n.2, p.301-308, 2002.
- CID, L. P. B.; TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Vol. 1, pág. 331. Embrapa-SPI. Brasília. 1998.
- COSTA, C. M. M. **Cipó – puçá (Cissus sicyoides)**. Texto do Curso de especialização em medicamentos da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: UFRJ. 1990. 109p.
- DOMINICI, A. J. C.; REGO, T. J. A.; SILVA, A. Z.; ROCHA, C. C.; LIMA, E. B. Abordagem Fitoquímica de *Cissus sicyoides* L. (vitaceae). In: **54º Congresso Nacional de Botânica**, Belém, PA, 2003.
- FERREIRA, M. P.; NISHIJIMA, C. M.; SEITO, L. N.; DOKKEDAL, A. L.; LOPESFERREIRA, M.; DI STASI, L. C.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C. A.

Gastroprotective effect of *Cissus sicyoides* (Vitaceae): Involvement of microcirculation, endogenous sulfhydryls and nitric oxide. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 117, p. 170–174, 2008.

FLORES, R.; NICOLOSO, F. T.; VASCONCELLOS, N. J. S. Indução de calos e aspectos morfogênicos de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 3, p. 89-95, 2006.

FRANÇA, S. C. Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas. In: SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre; Florianópolis: UFRGS; UFSC, 2001. p. 105-124.

FÜRDEN, B. V.; HUMBURG, A.; FUSS, E. Influence of methyl jasmonate on podophyllotoxin and 6-methoxypodophyllotoxin accumulation in *Linum album* cell suspension cultures. **Plant Cell Reports**, v.24, p.312-7, 2005.

GARCIA, M. D.; SAENZ, M. T.; PUERTA, R.; QUÍLEZ, A.; FERNADEZ, M. A. Antibacterial activity of *Agave intermixta* and *Cissus sicyoides*. **Fitoterapia**, v. 70, p. 71-73, 1999.

GARCIA, A. M.; QUÍLEZ, M. T.; SAENZ, M. E.; MARTINEZ-DOMINGUEZ, R. P. Anti-inflammatory active of *Agave intermixta* Trel. *Cissus sicyoides* L., species used in Caribbean traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**. V.71. p. 395-400. 2000.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. Plant tissue culture procedure-Background. In: **Plant propagation by tissue culture**. Springer Netherlands, 2008. p. 1-28.

GERTH, A.; SCHMIDT, D.; WILKEN, D. The production of plant secondary metabolites using bioreactors. In: **XXVII International Horticultural Congress-IHC2006: International Symposium on Plant Biotechnology: From Bench to 764**. 2006. p. 95-104.

GIACOMETTI, D. C. Impacto atual da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPH, p.19-28, 1990.

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

GYORGY, Z.; TOLONEN, A.; NEUBAUER, P.; HOHTOLA, A. Enhanced biotransformation capacity of *Rhodiola rosea* callus cultures for glycosid production. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.83, p.129-35, 2005.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant Propagation: Principles and Practices**. 7 ed. New Jersey: Prentice Hall, 2002.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. **Princípios ativos de plantas superiores**. São Carlos: EdUFSCar, 2003. p. 09, 60 - 61.

HOUGHTON, P. J.; RAMAN, A. **Laboratory handbook for the fractionation of natural extracts**, Chapman & Hall, London, 1998.

HU, C. Y.; WANG, P. J. Meristem, shoot tip, and bud cultures. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. **Handbook of plant cell culture**. New York: Macmillan, 1983. p. 177-227.

JASKANI, M. J.; ABBAS, H. A. I. D. E. R.; KHAN, M. M.; QASIM, M.; KHAN, I. A. Effect of growth hormones on micropropagation of *Vitis vinifera* L. cv. Perlette. **Pakistan Journal of Botany**, v. 40, n. 1, p. 105, 2008.

JIMÉNEZ-MARTÍNEZ, J. H.; FRANCO-MORA, O.; GONZÁLEZ-HUERTA, A.; CASTAÑEDA-VILDÓZOLA, Á.; GUTIÉRREZ-MARTÍNEZ, M. D. G. Micropropagación de *Cissus tiliacea*, planta del sur del estado de México. **Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo**, v. 43, n. 2, p. 71-81, 2011.

KARAM, N. S.; JAWAD, F. M.; ARIKAT, N. A.; SHIBL, R. A. Growth and rosmarinic acid accumulation in callus, cell suspension, and root cultures of wild *Salvia fruticosa*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.73, p.117-21, 2003.

KERBAUY, G. B. Clonagem de plantas *in vitro*. **Revista de Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.28, p.1-3, 2003.

KOLLÁVORÁ, K. Effect of auxins on *Karrwinskia humboldtiana* root cultures. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.79, p. 213-221, 2004.

KRIKORIAN, A. D. Propagación clonal *in vitro*. In: ROCA, W. M.; MRROGINSKI, L. A. **Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos e aplicaciones**. Cali: CIAT, 1991. 970 p.

LAMAS, F. M. **Reguladores de Crescimento**. In: Embrapa Agropecuária Oeste. Algodão: tecnologia de produção. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Embrapa Algodão, 2001. 296p.

LAMEIRA, O. A.; COSTA, M. P.; PINTO, J. E. B. P. The efficiency of shoot and plantlet formation of *Cephaelis ipecacuanha* after three subcultures *in vitro*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.24, n.3, p.523-526, set./dez. 1994.

LANDA, F. S. L.; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O.; BUENO, J. S. S. Indução *in vitro* de calos em explantes foliares de pequiyeiros (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, p. 56-63, 2000.

LANS, C. A. Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for urinary problems and diabetes mellitus. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 2(45), 2006.

LIMA, J. C. F.; LIMA, L. S.; TEIXEIRA, J. B. P.; VECCHI, C.; SOARES, G. L. G. Caracterização Histoquímica da "Insulina Vegetal" *Cissus verticillata* (L.) Nicholson & C. E. Jarvis (Vitaceae). **V Jornada Paulista de Plantas Mediciniais, Natureza, Ciência e Comunidade**. São Paulo. 2001. 219p.

LIMA, S. M. Influência de fitorreguladores no crescimento *in vitro* de partes aéreas de *Mentha viridis*. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. S2, p. 669-671, 2008.

LIMA, E. C.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R. C.; SOARES, F. P.; EMRICH, E. B.; SILVA, Á. A. N. S. Indução de calos em segmentos foliares de sangra d'água (*Croton urucurana* Baill.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 1, p. 17-22, 2008.

LOMBARDI, J. A. **O gênero *Cissus* L. emend descoings (Vitaceae) na América do Sul**. Campinas, SP: USP, 1994, 355p. (tese).

LOMBARDI, J. A. Vitaceae-Generos Ampelocissus, Ampelopsis e Cissus. **Flora Neotropica**, Monograph 80, The New York Botanical Garden, 2000.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil Nativas e Exóticas**. 2ª edição. Nova Odessa, SP; Instituto Plantarum, pág. 536, 2008.

MACEDO M.; FERREIRA A. R. Plantas hipoglicemiantes utilizadas por comunidades tradicionais na Bacia do Alto Paraguai e Vale do Guaporé, Mato Grosso-Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, p. 45-47, 2004.

MENDONÇA FILHO, R. F. W.; MENEZES, F. S. Estudo da utilização de plantas medicinais pela população de Ilha Grande-RJ. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 2003, 13 (Supl): 55-58

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 Medicinai.**, Botucatu, v.14, n.1, p.110-121, 2012.

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

MURTHY, K. N. C.; VANITHA, A.; SWAMY, M. M.; RAVISHANKAR, G. A. Antioxidant and antimicrobial activity of *Cissus quadrangularis* L. **J Med Food** 6: 99-105. 2003.

NICOLSON, D. H.; JARVIS, C. *Cissus verticillata*, a new combination for *C. sicyoides* (Vitaceae). **Taxon**, v. 33, n. 4, p. 726-727, 1984.

NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; OLIVEIRA, L. D.; SOARES, G. D. A.; SOARES, F. P.; CASTRO, A. H. F.; PAIVA, P. D. O. Indução de calos em explantes foliares de muricipequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 366-370, 2007.

OKSMAN-CALDENTEY, K.; INZÉ, D. Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. **Trends in Plant Science**, v. 9, n. 9, p. 433-440, 2004.

OLIVEIRA, A. L.; KIDO, L. M. H.; KIDO, E. A.; ISEPPO, A. M. B. (2006). Efeito de BAP e 2,4D na formação de Calos em Diferentes Explantes de Feijão-caupi. **Embrapa**, 12.

OLIVEIRA, M. C.; SIMOES, K.; BRAGA, M. R. Substâncias antifúngicas constitutivas e induzidas em folhas e suspensões celulares de *Rudgea jasminoides* (Cham.) Müll. Arg. (Rubiaceae). **Revista Brasileira de Botânica.**, vol. 32, n. 3. Pág. 509-519. 2009.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. - **Fundamentos de farmacobotânica.** 2. ed. São Paulo : Atheneu, 2000.

PEPATO, M. T.; BAVIERA, A. M.; VENDRAMINI, R. C.; PEREZ, M. P. M. S.; KETTELHUTT, I. C.; BRUNETTI, I. L. *Cissus sicyoides* (princess vine) in the long-term treatment of streptozotocin-diabetic rats. **Biotechnol Appl Biochem** 37: 15-20. 2003.

PEREIRA, A. M. S. Cultura de tecidos de plantas medicinais. In: COELHO, M.F.B.; COSTA JUNIOR, P.; DOMBROSKI, J. L. D. **Diversos olhares em etnobiologia, etnoecologia e plantas medicinais.** Cuiabá: UNICEN, 2003. p.183-94.

PEREIRA, M. A. S.; CÂMARA, F. L. A.; FRANÇA, S. C. Vegetative propagation in *Mikania glomerata*: Micropropagation and Cuttings. **Acta Horticulturae**, v.3, n. 502, p.357-362, 1999.

PEREIRA, R. C. A.; PINTO, J. E. B. P.; REIS, E. S.; CORRÊA, R. M.; BERTOLLUCI, S. K. V. Influência de diferentes auxinas na indução e cinética de crescimento de calos de *Uncaria guianensis* J. F. GMEL. (unha de gato), **Plant Cell Culture & Micropropagation.**, Lavras, v.3, n.2, p. 69-77, 2007

PIERIK, R.L.M. **Cultivo in vitro de las plantas superiores.** Madrid: Mundi-Prensa, 1990. 326p.

POTT, A.; POTT, V.J. **Plantas do Pantanal.** Corumbá: EMBRAPA, 1994, 320p.

QUILEZ, A. M.; SAENZ, M. T.; GARCIA, M. D.; PUERTA, R. Phytochemical analysis and anti-allergic study of *Agave intermixta* Trel. and *Cissus sicyoides* L. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56(9), p. 1185-1189, 2004.

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

RATES S. M. K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11(2), p. 57-69, 2001.

REBOUÇAS, F. S.; ALMEIDA, W. A. B. Calogênese em *Cissus sicyoides* L. a partir de segmento foliar. **Cultivo in vitro de Plantas Medicinais**, p. 35, 2009.

RODRIGUES, A. G. Fitoterapia no Sistema Único de Saúde. JORNADA CATARINENSE; I JORNADA INTERNACIONAL DE PLANTAS MEDICINAIS, 5., 2006, Joinville. **Anais...** Joinville: UNIVILLE, p. 68-69, 2006.

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 Medicinais**, v. 12, n. 3, p. 333-340, 2010.

- RODRIGUES, E.; DUARTE-ALMEIDA, J. M.; PIRES, J. M. Perfil farmacológico e fitoquímico de plantas indicadas pelos caboclos do Parque Nacional do Jaú (AM) como potenciais analgésicas. Parte I. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 981-991, 2010.
- ROSS, C. W. Hormones and growth regulators: auxins and gibberellins. In: SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. **Plant physiology**, Wadsworth, p. 357- 377, 1992.
- SANTOS, M. R. A.; FERREIRA, M. G. R.; CORREIA, A. O.; ROCHA, J. F.; CORREA, K. C. S. Indução de calos em nervura mediana de folhas não expandidas de pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth.). *Plant Cell Culture and Micropropagation*, Lavras, v.6, n.1, p. 33-39, 2010.
- SCHUCH, M. W.; ERIG, A. C. Micropropagação de Plantas Frutíferas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 2005. p. 155-173.
- SHIRWAIKAR, A.; KHAN, S. S.; MALINI, S. Antiosteoporotic effect of ethanol extract of *Cissus quadrangularis* Linn. on ovariectomized rat. **J Ethnopharmacol** 89: 245-250. 2003.
- SILVA, L.; ONIKI, G. H.; AGRIPINO, D. G.; MORENO, P. R. H.; YOUNG, M. C. M.; MAYWORM, M. A. S.; LADEIRA, A. M. Bicyclodermacreno, resveratrol e atividade antifúngica em extratos de folhas de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & Jarvis (Vitaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 17: 361-367. 2007.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL E. P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais e a necessária interação da indústria com a academia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12(1), p. 35-40, 2002.
- SIQUEIRA, E. R.; INOUE, M. T. Propagação vegetativa do coqueiro através da cultura de tecidos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 4, p. 639-646, 1992.
- SOARES, D. C.; BARBOSA, W. L. R. Obtenção do Perfil Cromatográfico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para a Detecção de Flavonóides como Marcadores nas Soluções Extrativas de *Cissus Verticillata* L. **Revista Científica da UFPA**, v. 5, 2007.
- SOUZA, A. V. **Propagação in vitro e aspectos anatômicos de arnica (*Lychnophora pinaster*) Mart.** 2003. 126 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.
- SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005. 640p.
- SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**. Nova Odessa, Instituto Plantarum. 2008.
- 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.

TORRES, A. C.; FERREIRA, A. T.; SÁ, F. G.; BUSO, J. A.; CALDAS, L. S.; NASCIMENTO, A. S.; BRÍGIDO, M. M.; ROMANO, E. **Glossário de biotecnologia vegetal**, Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000. 128 p.

VASCONCELOS, T. H. C.; MODESTO-FILHO, J.; DINIZ, M. F. F. M.; SANTOS, H. B.; AGUIAR, F. B. D.; MOREIRA, P. V. L. Estudo toxicológico pré-clínico agudo com o extrato hidroalcoólico das folhas de *Cissus sicyoides* L.(Vitaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 583-591, 2007.

VEIGA JUNIOR, V. F.; MELLO, J. C. P. As monografias sobre plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.3, p.464-71, 2008.

VENDRUSCOLO, G. S.; RATES, S. M. K.; MENTZ, L. A. Dados químicos e farmacológicos sobre as plantas medicinais utilizadas como medicinais pela comunidade do Bairro de Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 2005, 15:361-372.

VENTURIERI, G. A.; VENTURIERI, G. C. Calogenesis of *Theobroma grandiflorum* x. *T. obovatum* hibrid (Sterculiaceae). **Acta amazônica**, v. 34, n. 4, p. 507-511, 2004.

VIANA, G. S. B.; MEDEIROS, A. C.; LACERDA, A. M. R.; LEAL, L. K. A. M.; VALE, T. G.; MATOS, F. J. A. Hypoglycemic and anti-lipemic effects of the aqueous extract from *Cissus sicyoides*. **BMC Pharmacology**, v.4, p.9-15, 2004.

VIEIRA, M. L. C. Conservação de Germoplasma in vitro. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 3, n. 14, 2000.

VIEIRA, C. C. J.; BRAGA, M. R.; FIGUEREDO-RIBEIRO, R. C. L. Fructans in callus of *Gomphrena macrocephala* St.-Hil. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.42, p.233-8, 1995.

VISWANATHA SWAMY, A. H. M.; THIPPESWAMY, A. H. M.; MANJULA, D. V.; MAHENDRA KUMAR, C. B. Some Neuropharmacological Effects of the Methanolic Root Extract of *Cissus quadrangularis* in Mice. **African Journal of Biomedical Research**, Vol. 9; 69 – 75. 2006.

WILKEN, D.; GONZÁLEZ, E. J.; HOHE, A.; JORDAN, M.; KOSKY, R. G.; HIRSCHMANN, G. S.; GERTH, A. Comparison of secondary metabolite production in cell suspension, callus culture and temporary immersion system. In: HVOS-ELF, T.; PREIL, W. (Eds.). **Liquid culture systems for in vitro plants propagation**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2005. p.525-38.