



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

**ESTUDO DA CALOGÊNESE, DINÂMICA DE CRESCIMENTO DE
CALOS E ESTABELECIMENTO DE SUSPENSÕES CELULARES DE
*Piper permucronatum***

MILENE DE CASTRO MELO GUIMARÃES

Porto Velho-RO
2015



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

**ESTUDO DA CALOGÊNESE, DINÂMICA DE CRESCIMENTO DE
CALOS E ESTABELECIMENTO DE SUSPENSÕES CELULARES DE
*Piper permucronatum***

MILENE DE CASTRO MELO GUIMARÃES

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 de Título de Mestre em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente.

Porto Velho-RO
2015

FICHA CATALOGRÁFICA

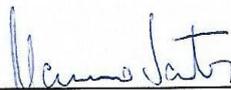
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação - CIP

G963e	Guimarães, Milene de Castro Melo. Estudo da calogênese, dinâmica de crescimento de calos e estabelecimento de suspensões celulares de <i>Piper permucronatum</i> / Milene de Castro Melo Guimarães. – Porto Velho, 2015. 43p. Dissertação (Mestrado). –Universidade Federal de Rondônia, 2015. Orientação Prof. Mauricio Reginaldo Alves dos Santos, Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente. 1. Biologia 2. Piperaceae 3. Calogênese I. Título II. Santos, Mauricio Reginaldo Alves dos. CDU: 582.622
-------	--

MILENE DE CASTRO MELO GUIMARÃES

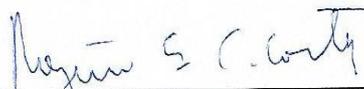
“ESTUDO DA CALOGÊNESE, DINÂMICA DE CRESCIMENTO DE CALOS E ESTABELECIMENTO DE SUSPENSÕES CELULARES DE *Piper permucronatum*”.

Comissão Examinadora



Dr. Maurício Reginaldo Alves dos Santos
Orientador

Fundação Universidade Federal de Rondônia/Embrapa Rondônia



Dr. Rogério Sebastião Correa da Costa
Membro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária



Dr. Vanderlei Maniesi
Membro

Fundação Universidade Federal de Rondônia

Dr. Artur de Souza Moret
Suplente

Fundação Universidade Federal de Rondônia

Porto Velho, 29 de Outubro de 2015.

Resultado: APROVADA

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as bênçãos concedidas, por colocar pessoas tão especiais a meu lado, sem as quais certamente não teria dado conta!

À minha mãe, Maria José de Castro Lima, por desde muito cedo me ensinar o valor dos estudos;

Ao meu pai, Vicente Ferreira de Melo, pelo carinho, admiração e simplicidade;

À minha irmã, Miqueles Castro de Melo, por sempre acreditar em mim, pelo apoio e companheirismo;

Ao meu filho Carlos Gabriel Melo Guimarães, por me dar o amor mais puro de criança;

Ao meu querido esposo, Haroldo Ludson, por ser tão importante na minha vida, principalmente por compreender minha ausência e me apoiar no decorrer deste trajeto;

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

Ao meu orientador Dr. Maurício Reginaldo Alves dos Santos, pela confiança, pela oportunidade de trabalhar ao seu lado e por ser meu maior incentivador.

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;

Às minhas companheiras de pesquisa, Wanessa, Caroline, Eloísa, Carolina e Glaura que se tornaram verdadeiras amigas e tornaram mais leve meu trabalho. Obrigada por dividir comigo as angústias e alegrias e ouvirem minhas bobagens. Foi bom poder contar com vocês!

À meus amigos do mestrado, pelos momentos divididos juntos, especialmente à Tatiane e à Poliana pela amizade, companhia, conversas e risos;

Aos funcionários da EMBRAPA, especialmente ao Hosana, à Neidemar e ao Tiego, pela disponibilidade, simpatia e gentileza. Obrigada pela ajuda!

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

Dedico,

A minha irmã Miquele Castro de Melo pelo incentivo, amizade e companheirismo que foram fundamentais e me fizeram concluir mais esta etapa.

Obrigada.

RESUMO

A família Piperaceae possui distribuição tropical e subtropical, ocorrendo em ambos os hemisférios. O Brasil possui uma alta diversidade desta família, com mais de 500 espécies concentradas principalmente nas florestas amazônica e atlântica. O gênero *Piper* caracteriza-se pela abundância de metabólitos secundários bioativos, incluindo alcalóides, amidas, flavonóides e terpenos de importância econômica e medicinal. Entre as espécies de *Piper* se destaca a *Piper permucronatum* Yuncker, que é um arbusto aromático perene, cujas folhas são utilizadas na medicina popular na forma de chá contra cólicas menstruais e intestinais, problemas digestivos, dor de estômago, diarreia, hemorragia e náusea. Métodos de cultivo *in vitro* têm sido utilizados com sucesso para a obtenção de metabólitos secundários de plantas em larga escala. O objetivo deste trabalho é determinar um protocolo para a indução de calos *in vitro* a partir de explantes foliares de *P. permucronatum*, visando ao estabelecimento de suspensões celulares para a produção de metabólitos secundários de interesse agrônomo e pecuário. Explantes foliares de *P. permucronatum* foram inoculados em meio Murashige & Skoog suplementado com diferentes concentrações dos reguladores de crescimento 2,4-D e BAP. O tratamento que resultou em maior porcentagem de indução de calos foi: 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D + 1,0 mg L⁻¹ de BAP, com calos em 100% dos explantes. Na ausência de reguladores de crescimento, não ocorreu formação de células de calos. Na ausência de 2,4-D não ocorreu nenhuma indução de calos. Na ausência de BAP houve oxidação e necrose de todos os calos. O tratamento que resultou em maior porcentagem de calos friáveis foi repetido para obtenção de grande número de calos e subsequente determinação da curva de crescimento dos calos e estabelecimento das suspensões celulares.

PALAVRAS-CHAVE: Piperaceae, metabólitos secundários, calos.

ABSTRACT

The Piperaceae family is distributed in tropical and subtropical in both hemispheres. In Brazil there is a wide diversity of this family with and more than 500 species are concentrated mainly in the Amazon and Atlantic forests. The *Piper* genus is characterized for the abundance of bioactive secondary metabolites including alkaloids, amides, flavonoids and terpenes of economic and medicinal importance. Among the *Piper* species stands out *Piper permucronatum* Yuncker, an aromatic perennial shrub whose leaves are traditionally use in the form of tea to combat menstrual and intestinal cramps, stomach pain, digestive problems, diarrhea, hemorrhage, and nausea. *In vitro* methods of cultivation have been successfully used for large-scale production of plant secondary metabolites. The objective of this study is to determine a protocol for *in vitro* callus induction in leaf explants of *P. permucronatum*, aiming at the establishment of cell suspensions for the production of secondary metabolites of agricultural interest. Leaf explants of *P. permucronatum* were inoculated in a Murashige & Skoog medium supplemented with different concentrations of the growth regulators 2,4-D and BA. The treatment that resulted in the highest percentage of callus induction was 1.0 mg L⁻¹ 2,4-D + 1.0 mg L⁻¹ BA, with callus in 100% of the explants. In the absence of growth regulators callogenesis did not occur. In the absence of 2,4-D callus induction did not occur as well. In the absence of BA there was oxidation and necrosis of the calluses. The treatment that resulted in the highest percentage of friable calluses was repeated in order to produce a large number of calluses and subsequent determination of the callus growth curve and establishment of cell suspensions.

KEY WORDS: Piperaceae, secondary metabolites, callus.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** *Piper permucronatum* Yuncker. 15
- Figura 2.** *Piper permucronatum* Yuncker. (A) Procedimento de pré-limpeza. (B) Desinfestação. (C) Explante recém-inoculado. 23
- Figura 3.** Aspectos de calos de explantes foliares de *Piper permucronatum* Yuncker inoculados em meio MS contendo BAP e 2,4-D. 27
- Figura 4.** Calos de *Piper permucronatum* Yuncker inoculados em meio MS 50% com BAP e 2,4-D. A - Inoculação, B – 15 dias, C – 30 dias, D – 45, E - 60 dias e F – 75 dias. 29
- Figura 5.** Curva de crescimento de calos de *Piper permucronatum* Yuncker obtidos a partir de segmentos foliares inoculados em meio MS 50%, contendo 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e 1,0 mg L⁻¹ de BAP durante 70 dias de cultivo. A – Peso Massa Seca e B – Teor de água (%). 30
- Figura 6:** Porcentagem de teor de água em calos de *Piper permucronatum* Yuncker obtidos a partir de segmentos foliares inoculados em meio MS 50%, contendo 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e 1,0 mg L⁻¹ de BAP durante 70 dias de cultivo. 31
- Figura 7:** Curva de crescimento de células em suspensão em função da duração da cultura no meio MS líquido suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e 1,0 mg L⁻¹ de BAP durante 15 dias de cultivo. 33

LISTA DE TABELA

28

Tabela 1 – Porcentagens de indução de calos em explantes foliares de *P. permucronatum* sob diferentes concentrações de BAP e 2,4-D no meio de cultivo, após 49 dias de cultivo.

LISTA DE ABREVIATURAS

BAP	Benzilaminopurina
2,4-D	Ácido 2,4 Diclorofenoxiacético
GA ₃	Ácido Giberélico
ANA	Ácido Alfa- Naftalenoacético
CIN	Cinetina
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
v/v	Volume por volume
Cm	Centímetro
cm ²	Centímetro Quadrado
MS	Murashige & Skoog
pH	Potencial de Hidrogênio
mg L ⁻¹	Miligrama por Litro
g.L ⁻¹	Gramas por Litro
ml	Mililitro
μM	Micrometro

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	10
1. OBJETIVOS	12
1.1 GERAL	12
1.2 ESPECÍFICOS	12
2. REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	13
2.2 Piper permucronatum, Yuncker (PIPERACEAE).....	15
2.3 CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS	16
2.3.1 Calogênese	17
2.3.2 Curva de Crescimento de Células de Calo	18
2.3.3 Culturas de Células em Suspensão para Produção in vitro de Metabólitos Secundários.....	19
2.4 CONTRIBUIÇÕES PARA O DESENVOLVIMENTO REGIONAL.....	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 INDUÇÃO DE CALOS.....	23
3.1.1 Desinfestação do Material.....	23
3.1.2 Indução de calos.....	24
3.2 CURVA DE CRESCIMENTO DE CALOS.....	24
3.3 DETERMINAÇÃO DA MASSA SECA E DO TEOR DE ÁGUA DE CALOS	25
3.4 CURVA DE CRESCIMENTO DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO.....	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1 INDUÇÃO DE CALOS	26
4.2 ESTABELECIMENTO DA CURVA DE CRESCIMENTO.....	29
4.3 ESTABELECIMENTO DA CURVA DE CRESCIMENTO DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO.....	32
CONCLUSÕES	35
REFERÊNCIAS	36

INTRODUÇÃO

Atualmente vem sendo desenvolvido na Embrapa Rondônia um projeto que contempla a aplicação de metabólitos secundários contra carrapatos (*Rhipicephalus microplus*) de bovinos, como forma de minimizar os prejuízos que estes organismos causam à bovinocultura da região Amazônica.

As doenças parasitárias são as que geram os maiores prejuízos nos sistemas pecuários, sejam eles diretos através da ação espoliadora dos parasitas nos animais, ou indiretos, pelos altos custos para a aquisição de fármacos utilizados para o controle. Mesmo com outras formas mais recomendáveis, como controles estratégicos ou integrados e utilizando-se conhecimentos epidemiológicos e bioecológicos das espécies parasitárias, a principal forma de combate aos parasitas pecuários ainda é a aplicação de fármacos pesticidas e quimioterápicos. Isto tem ocasionado duas importantes situações: a emergência da resistência a pesticidas nas populações parasitárias e a presença de resíduos metabólitos dos pesticidas e dos antibióticos nos produtos de origem animal, que tende a se agravar justamente pela necessidade de um maior número de tratamentos parasiticidas ou da necessidade de aplicação de formulações parasiticidas mais concentradas direcionadas ao controle das populações já resistentes.

Por isso é importante o estímulo de estudos sobre novas técnicas de controle, incluindo-se a utilização de produtos naturais que sejam menos agressivos ao meio ambiente. Atualmente, a demanda de pesquisas tem se concentrando nas atividades biológicas de metabólitos secundários de plantas. Algumas espécies têm se revelado bastante eficazes para uso como inseticida botânico, além de outros efeitos biológicos, como atividade bactericida e também fungicida. Estudos revelaram que dentre as plantas presentes na flora Amazônica com estes efeitos biológicos se encontram as da família Piperaceae, especialmente as espécies pertencentes ao gênero *Piper*.

O presente estudo visa ao estabelecimento de suspensões celulares de *Piper permucronatum* a partir de pequenos fragmentos de folhas, inoculados em meio nutritivo suplementado com diferentes concentrações de reguladores de crescimento (BAP e 2,4-D).

Com isso espera-se contribuir para a produção agropecuários que é o aumento da produtividade direcionado a atender à crescente demanda pela oferta de alimentos seguros produzidos com mais eficiência, maior competitividade e isentos de efeitos prejudiciais ao

meio ambiente, e que ainda sejam de qualidade e não causem perdas à saúde daqueles que irão consumi-los.

Muitas outras metodologias importantes no campo da cultura de tecidos vegetais têm sido diariamente implementadas e tem trazido novas possibilidades para o desenvolvimento e aplicabilidade da biotecnologia na agropecuária. A intensificação das pesquisas no campo da cultura de tecidos vegetais possibilitará a aplicação de benefícios em um maior número de espécies vegetais, incluindo muitas espécies nativas da Amazônia que até o momento ainda não foram estudadas.

1. OBJETIVOS

1.1 GERAL

Estabelecer um protocolo para a indução de calos e o estabelecimento de suspensões celulares *in vitro* a partir de explantes foliares de *P. permucronatum*, visando à produção de princípios ativos de interesse agrônômico e pecuário.

1.2 ESPECÍFICOS

1. Testar protocolos para indução de calogênese em explantes foliares de *P. permucronatum* em meio de cultivo suplementado com diferentes concentrações dos reguladores de crescimento 2,4-D e BAP;
2. Determinar a curva de crescimento de calos induzidos em segmentos foliares de *P. permucronatum*, visando à identificação das fases de crescimento, com foco na fase desaceleração, quando os calos devem ser subcultivados para estabelecimento de suspensões celulares;
3. Estabelecer culturas de células em suspensão a partir dos calos obtidos e determinar sua curva de crescimento, identificando a fase estacionária, quando a produção de metabólitos secundários é máxima.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Em ambientes naturais, os vegetais estão vulneráveis a um grande número de herbívoros, bactérias, vírus, fungos, nematódeos, ácaros, insetos entre outros. Para compensar a impossibilidade de deslocamentos, os vegetais desenvolveram alguns mecanismos de defesa, como a superfície das folhas composta por uma camada cerosa e um tecido protetor e a produção de metabólitos secundários (GERSHENZON & ENGELBERTH, 2013).

Os metabólitos secundários se diferem dos primários porque não estão relacionados a processos metabólicos como respiração, fotossíntese, absorção de nutrientes e crescimento da planta, mas sim a processos mais complexos que podem envolver defesa contra a predação por insetos e outros organismos, contra ataques de fungos e bactérias, atração de insetos polinizadores e alelopatia, dentre outros (GERSHENZON & ENGELBERTH, 2013; WINK, 2003).

Com isso os metabólitos secundários produzidos e liberados por plantas têm um papel importante na adaptação destas aos seus ambientes; essas moléculas contribuem para que as plantas possam ter uma boa interação com os diferentes ecossistemas (GOBBO-NETO & LOPES, 2007; HARBORNE, 1998). Assim, aumentam a probabilidade de sobrevivência de uma espécie, pois são responsáveis por diversas atividades biológicas como antibióticos, antifúngicos e antivirais para proteger as plantas dos patógenos, e também apresentando atividades antigerminativas ou tóxicas para outras plantas, fitoalexinas. A fitotoxicidade constitui uma fonte relativamente inexplorada de novos pesticidas (ROZWALKA et al., 2008; DIAS & DIAS, 2007).

Ao longo dos séculos, devido às extensas atividades biológicas dos metabólitos secundários, as plantas são utilizadas na medicina popular e atualmente, além de seu uso como medicamentos, também são utilizadas na área agrônômica, tendo em vista o potencial inseticida dos metabólitos secundários (ROZWALKA et al., 2008; BIAVATTI et al., 2007).

A produção de metabólitos secundários de plantas, há tempos, vem sendo feita por plantio de plantas medicinais. Contudo, plantas originárias de biótipos específicos podem ter problemas para se desenvolver fora de seus ecossistemas locais. Algumas espécies de plantas comuns não podem ser cultivadas em grandes quantidades em decorrência à sua susceptibilidade a patógenos (ex. antracnose para *Hypericum* ou *Arnica montana*). Este fato

tem levado os cientistas e biotecnologistas a considerar as culturas de células, tecidos e órgãos como segunda maneira para produzir os correspondentes metabólitos secundários *in vitro*.

No Brasil há uma imensa diversidade de espécies vegetais cujo potencial de produção de metabólitos secundários ainda não foi explorado. Entre as pesquisas existentes sobre o potencial fitoinseticida de algumas plantas nativas a família Piperaceae vem se destacando com algumas espécies promissoras no controle de diversas pragas (ROEL, 2001).

Os compostos secundários de plantas são frequentemente classificados de acordo com a sua rota biossintética. As principais famílias de moléculas são os compostos fenólicos, terpênicos e esteróides, e os alcalóides (TAIZ & ZEIGER, 2004; HARBORNE, 1998).

O papel dos compostos fenólicos está relacionado com a síntese das ligninas, que são comuns a todas as plantas superiores, onde o odor, sabor e coloração agradáveis podem atrair os seres humanos, assim como também a animais e insetos para polinização ou dispersão de sementes. Esse grupo de compostos também ajuda a proteger as plantas contra os raios ultravioleta, insetos, fungos, vírus, bactérias e ainda impedir o crescimento de outras plantas competidoras (ação alelopática) (CROTEAU et al., 2000).

Os alcalóides podem ser definidos como compostos farmacologicamente ativos, possuindo um nitrogênio e derivados de aminoácidos (CORDELL, 1981). Porém, não são distribuídos de maneira uniforme no reino vegetal e são mais específicos para alguns gêneros e espécies de plantas. Esta restrita distribuição dos compostos secundários estabelece a base da quimiotaxonomia e ecologia química (HARBORNE, 1998). A função dos alcalóides nas plantas ainda não foi definida, contudo de acordo com Croteau et al. (2000), algumas respostas estão aparecendo com base nas funções eco-químicas destes compostos. Com relação às defesas químicas das plantas os alcalóides apresentam grande variedade de efeitos fisiológicos sobre os animais e também atividades antimicrobianas. Muitos alcalóides são tóxicos aos insetos e agem como repelente para herbívoros.

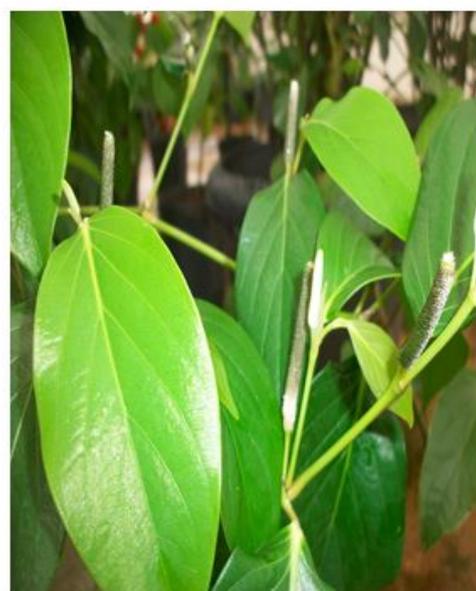
2.2 *Piper permucronatum*, Yuncker (PIPERACEAE)

A família Piperaceae é considerada uma das mais complexas e diversificadas entre as angiospermas basais (famílias que apresentam características comuns a espécies consideradas primitivas e evolutivamente distintas), e é por isso que a definição do número de gêneros e composição de espécies, a sua filogenia e modelo da diversidade floral é atualmente objeto de grande controvérsia (JARAMILLO & MANOS, 2001). Para alguns autores, contém 14 gêneros e cerca de 1.950 espécies, amplamente distribuída em ambos os hemisférios e inclui plantas herbáceas, arbustos, trepadeiras e árvores (MABBERLEY, 1997). No Brasil, esta família está representada por 5 gêneros – *Ottonia* Spreng., *Piper* L., *Peperomia* Ruiz & Pav., *Pothomorphe* Miq. e *Sarcochachis* Trel - e um total de 479 espécies, sem especificar o número de espécies endêmicas (BARROSO, 1978; YUNCKER, 1972); recentemente espécies de *Ottonia* foram incorporados ao gênero *Piper* (TEBBS, 1989).

O gênero *Piper* compreende cerca de 1.200 espécies distribuídas em regiões tropicais e subtropicais nos dois hemisférios. A maior diversidade, porém, está na região Neotropical, onde cerca de dois terços das espécies descritas são encontrados. Na região Amazônica é estimada a existência de cerca de 300 espécies (TAWAN et. al., 2002).

Neste gênero se encontra a espécie *P. permucronatum* Yuncker (Figura 1), um arbusto aromático, conhecido pelo nome popular de elixir paregórico e cujas folhas são utilizadas na forma de chá contra cólicas menstruais e intestinais, problemas digestivos, dor de estômago, diarreia, hemorragia e náusea (ANJOS JÚNIOR, 2007).

Figura 1: *Piper permucronatum* Yuncker.



Morais et al. (2007) relata o potencial deste gênero quanto à atividade larvicida, avaliando quatro espécies ativas frente às larvas do mosquito *Aedes aegypti*, sendo as mais ativas *P. permucronatum* e *P. hostmanianum*. A atividade biológica foi atribuída principalmente à presença dos arilpropanóides dilapiol e miristicina.

2.3 CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS

Técnicas de cultura de tecidos têm sido aplicadas às espécies vegetais produtoras de princípios ativos úteis e com potencial de exploração econômica (KERBAUY, 1997). As plantas que produzem compostos bioativos são, na maioria das vezes, obtidas a partir de coleta predatória e indiscriminada (VILLAREAL et al., 1997), por esta razão a cultura de tecidos para produção de metabólitos secundários não só é vantajosa pela questão ecológica como também do ponto de vista econômico. Tais vantagens incluem ainda a geração de material necessário para os estudos em torno de um ano, células indiferenciadas, estado de desenvolvimento das células relativamente uniforme, ausência da interferência de microrganismos (CROTEAU et al., 2000).

As culturas de células de plantas podem sintetizar grandes quantidades de metabólitos secundários. Podendo ser mais favorável em relação à produção nas plantas, para as quais o espaço de tempo para o acúmulo destes metabólitos pode variar entre estações para plantas anuais ou entre diversos anos no caso das plantas perianuais, como por exemplo as árvores. E ainda, com esta técnica as taxas de biossíntese podem ser aumentadas, facilitando grandemente os estudos (SANTOS et al., 2007; CROTEAU et al., 2000).

Dentre as técnicas, atualmente a suspensão celular é empregada em trabalhos com biorreatores visando à produção de metabólitos secundários ou material clonal em escala comercial (CID, 1998). Para isso, faz-se necessário determinar protocolos eficientes para a indução e manutenção de calos friáveis (KOLLÁVORÁ, 2004; OKSMAN-CALDENTY & INZÉ, 2004).

Além disso, 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 & NICOLOSO, 2007).

2.3.1 Calogênese

A cultura de tecidos vegetais tem auxiliado na propagação clonal de diversos genótipos de plantas medicinais, permitindo a conservação do seu germoplasma; a obtenção de novas fontes de variabilidade por meio do cultivo de calos e células; na engenharia genética e no melhoramento para aumentar a produção de metabólitos secundários de interesse medicinal, ecológico ou agrônômico (ARIKAT, 2004; RAO & RAVISHANKAR, 2002; BOTTA et al., 2001). Neste contexto, a técnica de indução de calos tem sido amplamente utilizada visando ao aumento da produção destes metabólitos (KERBAUY, 1997).

O calo é um aglomerado de células e tecidos formado pela intensa divisão das células do explante em resposta à determinadas condições hormonais a que são submetidas, as quais podem estimular o crescimento da massa de células de forma desorganizada ou o desenvolvimento de órgãos como gemas, raízes ou embriões, por organogênese ou embriogênese (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). O tipo de calo formado em um determinado genótipo, seu grau de diferenciação celular e potencial morfogênico dependem, sobretudo do explante, meio de cultura e fitoreguladores. Também podem diferir em textura, consistência e coloração. Alguns calos são compactos e crescem vagarosamente, outros são friáveis e mais difíceis de manipular (FLORES et al., 2006).

Diversos fatores interferem na calogênese, tais com o tamanho do explante, composição do meio de cultura, reguladores de crescimento, órgão fornecedor do explante, idade e época do ano em que o explante é colhido e genótipo da planta doadora (CERQUEIRA et al., 2002). Os calos são de grande importância para estudos morfogênicos *in vitro* e para o estabelecimento de suspensões de células para a obtenção de produtos secundários, incluindo fármacos, representando uma biotecnologia de grande interesse científico e comercial (RODRIGUES & ALMEIDA, 2010).

Para a obtenção dos calos é necessário determinar o meio de cultura adequado para a inoculação e manutenção destes tecidos. Por isso, condições para a formação de calos e de seu crescimento devem ser estudadas, sendo necessário o suplemento exógeno de reguladores de crescimento. O balanço hormonal entre auxinas e citocininas é o aspecto mais importante para a cultura de calos (NOGUEIRA et al., 2007; TORRES et al., 1998). Esta é uma etapa empírica, relativamente longa, mas que pode ser facilitada pelo uso de experimentos fatoriais incompletos ou métodos de resposta de superfície (BARROS NETO et al., 1996; BOX, 1954).

Em um experimento fatorial para indução de calos, é necessário primeiramente especificar os níveis em que cada fator será estudado, isto é, os valores dos fatores (concentração de auxinas e citocininas) que serão empregados nos experimentos (BARROS NETO et al., 1996). Para avaliar o efeito das concentrações de auxinas e citocininas é preciso um planejamento fatorial que requer a realização de experimentos para todas as combinações possíveis dessas concentrações. Cada um desses experimentos, em que o sistema é submetido a um conjunto de níveis definidos, é um ensaio experimental (CALDAS et al., 1998).

Depois da formação dos calos, pode ser necessário um período de subculturas periódicas (transferência de fragmentos dos calos para um meio de cultura novo) para garantir a estabilidade e/ou uniformidade dos tecidos de calos. Isto se deve a variações somaclonais geradas *in vitro* podendo ocorrer com alguma frequência em tecidos de calos (MACHADO & COLLETI, 1991). Esta variação gerada *in vitro* pode determinar uma produção de metabólitos secundários variável, entre um ciclo e outro dos subcultivos. De acordo com Bourgaud et al. (2001), é preciso vários ciclos de subculturas para que os calos apresentem um crescimento uniforme e possam ser considerados como um conjunto de células homogêneas, como se fossem resultado de uma única célula clonada.

2.3.2 Curva de Crescimento de Células de Calo

O calo deve ser avaliado quanto à velocidade de seu crescimento, bem como as concentrações intracelulares e extracelulares do metabólito (FUMAGALI et al., 2008). De acordo com Santos et al. (2015), as curvas de crescimento dos calos são importantes para identificar os estágios dos processos fundamentais de crescimento, permitindo inferir sobre o exato momento de subcultivar os calos em um novo meio de cultivo ou a possibilidade da sua utilização em suspensões celulares, visando a produção de metabólitos secundários em espécies medicinais.

Segundo George et al. (2008) e Castro et al. (2008), o crescimento e o desenvolvimento de calos podem ser verificados pela sua curva de crescimento, que normalmente exibe cinco fases distintas: lag, exponencial, linear, desaceleração e estacionária. A fase lag se caracteriza como a de maior produção de energia, correspondendo ao período que as células se preparam para o início da divisão celular, visando sua expansão, onde ocorre o início da mobilização de metabólitos, síntese de proteínas e compostos específicos, resultando em um pequeno crescimento de calos. A fase exponencial é biossintética, possuindo maior crescimento de calos, devido à alta taxa de divisão celular e ao

aumento do número de células. A fase linear caracteriza-se por diminuição da divisão, mas aumento de volume celular; a fase de desaceleração é o momento em que as culturas devem ser transferidas para outro meio, pois ocorre a redução de nutrientes, produção de produtos tóxicos, secagem do ágar, consequência da redução do oxigênio no interior das células. Na fase estacionária, ocorre maior acúmulo de metabólitos secundários (SMITH, 1992).

2.3.3 Culturas de Células em Suspensão para Produção *in vitro* de Metabólitos Secundários

A suspensão celular destina-se à obtenção e proliferação de células isoladas ou pequenos aglomerados, dispersos em um meio líquido, sob agitação contínua, para evitar possíveis gradientes nutricionais e gasosos no meio de cultura (SOUZA & SANTOS, 2007). Além da produção de metabólitos secundários, a suspensão celular também tem aplicabilidade nas áreas de bioquímica, fisiologia vegetal, fitopatologia e genética de plantas (FURDEN et al., 2005; TORRES et al., 1998).

É necessário selecionar as diferentes linhagens de calos de acordo com a sua competência celular para garantir uma produção eficiente do metabólito de interesse. Para isso, cada calo deve ser testado separadamente, para avaliar a velocidade de seu crescimento, bem como as concentrações intracelulares e extracelulares do metabólito. Isto permite uma avaliação da produtividade de cada linhagem celular para que somente as linhagens mais produtoras sejam utilizadas nos estudos de células em suspensão ou biorreatores (FUMAGALI et al., 2008).

O monitoramento periódico da população celular, através da contagem de células em percentuais retirados da suspensão, é o método mais recomendado para acompanhar o crescimento. Existem também outros métodos mais práticos, como: o volume das células sedimentadas, depois de serem levemente centrifugadas; o diâmetro das células sedimentadas no frasco da cultura; e o aumento do peso da matéria fresca ou seca (SOUZA & SANTOS, 2007; TORRES et al., 1998).

Na cultura de células em suspensão, a maioria dos metabólitos secundários é produzida durante a fase de platô. Este déficit na produção durante os estágios iniciais pode ser explicado pela alocação de carbono estar distribuída preferencialmente com o metabolismo primário (construção das estruturas celulares e respiração) quando o crescimento é muito ativo. Por outro lado, quando o crescimento cessa, quantidades elevadas de carbono

não são mais necessárias para o metabolismo primário e os compostos secundários podem ser sintetizados mais ativamente (MACHADO et al., 2006).

De acordo com Scott et al. (1981) e Verpoorte & Maraschin (2001) as células em suspensão constituem um bom material biológico para estudos sobre rotas biossintéticas. Quando comparado às culturas de calos, as células em suspensão permitem a recuperação de grandes quantidades de células das quais as enzimas podem ser facilmente isoladas.

2.4 CONTRIBUIÇÕES PARA O DESENVOLVIMENTO REGIONAL

A intervenção no espaço de gestão passou a demandar novas abordagens, devido ao aparecimento de diferentes necessidades e limitações encontradas no processo de planejamento regional. Nas políticas e diretrizes de gestão foi integrada a participação da sociedade e os projetos de desenvolvimento regional passaram a ser estabelecidos num sistema integrado (FEDOZZI, 2011).

No que diz respeito à estrutura do planejamento para o desenvolvimento regional, as novas abordagens procuram utilizar uma visão sustentável inter-relacionada e fundamentada por três dimensões que envolvem: a) as questões institucionais, econômicas e sociais que envolvem, na maioria, as ciências sociais aplicadas; b) as questões de natureza territorial que envolvem aspectos da geografia humana e organização do espaço regional; e c) as demandas ambientais que envolvem, principalmente o equilíbrio para o uso racional do meio ambiente local (VEIGA, 2006).

Nos últimos anos a sociedade vem consolidando a adoção de um novo referencial científico para se pensar a relação entre os seres humanos e o meio ambiente. Mediante conceitos derivados da ecologia e da evolução, e também influenciados pelo movimento ambientalista, foi definido o conceito de sustentabilidade ecológica como indicador mais importante de suas análises (LIMA & POZZOBON, 2005). Segundo Gadotti (2008), sustentabilidade ecológica, ambiental e demográfica (recursos naturais e ecossistemas), que se refere à base física do processo de desenvolvimento e com a capacidade da natureza suportar a ação humana, com vistas à sua reprodução e aos limites das taxas de crescimento populacional.

De acordo com Lima & Pozzobon (2005), as atitudes de uma dada categoria socioambiental em relação ao ambiente é influenciado por características de sua formação social, tais como a orientação de sua produção econômica, grau de envolvimento com o mercado e a posse de uma cultura ecológica.

Com a prática de medidas políticas eficazes será possível concentrar as atividades dos diversos grupos sociais e suas reivindicações e direitos de uso da terra em um desenvolvimento regional adaptado as características ecológicas e as necessidades da população envolvida (KOHLHEPP et al., 2002).

Para que ocorra o desenvolvimento regional é necessário o bom emprego de todos os potenciais locais. Pelos conceitos formulados pela teoria econômica, problemas enfrentados por determinada atividade refletem imediatamente no resultado global da economia, devido à interdependência setorial da produção. Da mesma forma, se um setor apresenta desenvolvimento, todos os outros tendem a crescer em conjunto (KROETZ et. al., 2009).

Na busca de se conceber uma nova proposta de desenvolvimento rural, os aspectos da localidade, interagindo com as demais características da sustentabilidade e integração social e territorial, emergem como um dos seus aspectos fundamentais. O entendimento de desenvolvimento centrado essencialmente no local apresenta-se com uma conotação fundamentalmente integracionista, referente à superação das necessidades específicas das localidades; e, de uma integração das especificidades locais, referente à formação de sinergias territoriais (ARAGÃO & BORRERO, 2007).

A agropecuária é formada por atividades agrícolas, pecuárias e da silvicultura. E delas desmembram-se várias outras, principalmente aquelas ligadas a industrialização de alimentos, que por outro lado necessitam de variados serviços. Este ciclo motiva, em última instância, o desenvolvimento econômico regional (KROETZ et. al., 2009). Desta maneira, é imprescindível que os estudos regionais considerem todos os elos da cadeia produtiva local.

Mas para atender as exigências de mercado, Rondônia precisa buscar pela garantia da qualidade de seus produtos pecuários, seja ela direcionada à produção de carne ou de leite, determinando a redução do uso de produtos pesticidas nos rebanhos, não somente pelos transtornos da resistência às moléculas parasiticidas e suas consequências diretas, mas também pela questão ambiental e a presença de resíduos químicos em produtos de origem animal (JANK et al., 2005). Essa situação só pode ser vislumbrada com a utilização de princípios ativos eficientes para o controle das parasitoses que acometem os rebanhos pecuários. Tal cenário impõe um aprimoramento do setor produtivo, o qual deve incorporar tecnologias direcionadas ao aumento da produtividade e que estejam alinhadas à sustentabilidade da pecuária (SOUZA et al., 2003).

Dentre os mais importantes problemas para os sistemas pecuários bovídeos, as parasitoses mostram-se como fator limitante para a máxima produtividade dos rebanhos. A

eficácia das bases parasiticidas de uso veterinário na atualidade representa um desafio para o controle das populações de artrópodes e hematozoários de interesse pecuários devido à emergência e fixação nas populações parasitárias de genótipos resistentes às bases parasiticidas disponíveis para comercialização (PINAZZA, 1998).

O processo de descoberta e desenvolvimento de compostos bioativos é complexo, longo e de alto custo, tendo suas raízes profundamente ligadas às inovações científicas e tecnológicas (JOSHI, 2007). Em nenhum lugar do mundo existem mais espécies de flora e fauna do que na Amazônia. Esse imenso patrimônio genético, já escasso nos países desenvolvidos, tem na atualidade valor econômico-estratégico inestimável em várias atividades, mas é no campo do desenvolvimento de novos compostos químicos que reside sua maior potencialidade (CALIXTO, 2003).

A procura por novas moléculas eficientes para o controle das parasitoses mostra-se premente e alinhada às diretrizes da produção de alimentos seguros, uma vez que a ocorrência de infestações e infecções por parasitas pecuários representam importantes eventos que expõem os sistemas de produção pecuários a perigos químicos devido à necessidade da utilização de fármacos parasiticidas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

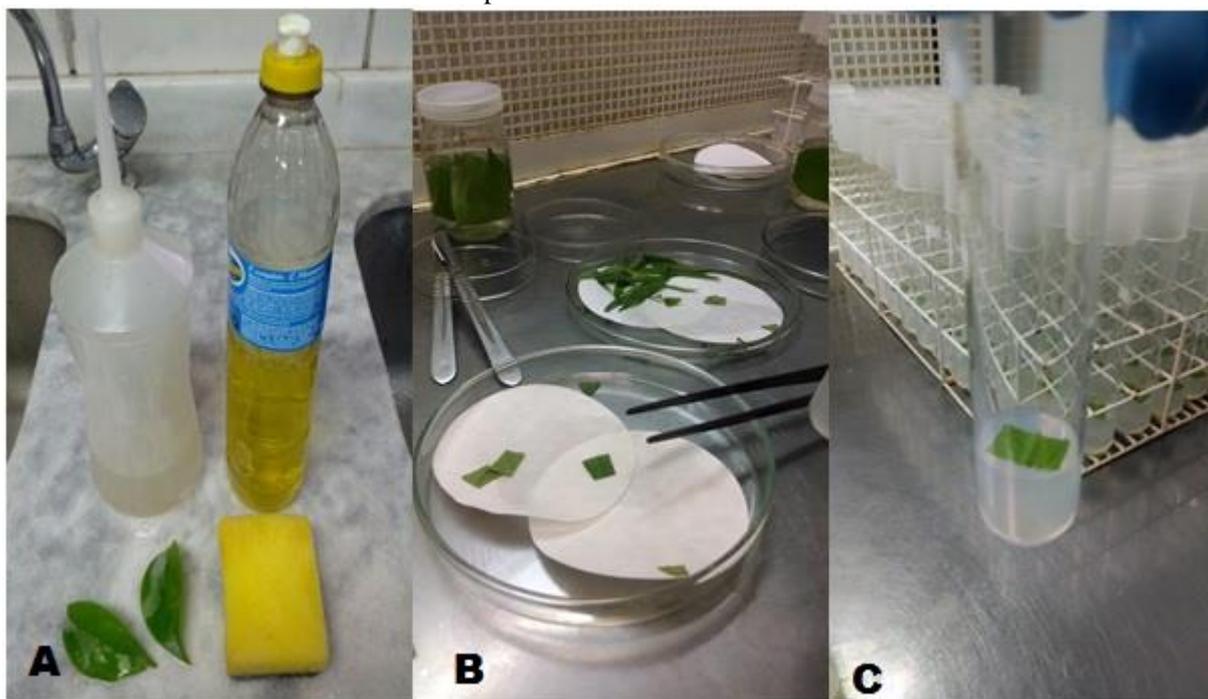
Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Embrapa Rondônia, em Porto Velho, em parceria com o Laboratório de Fitoquímica e com o Laboratório de Química de Produtos Naturais da Universidade Federal de Rondônia (UNIR)

3.1 INDUÇÃO DE CALOS

3.1.1 Desinfestação do Material

As coletas de material vegetal foram realizadas de plantas matrizes mantidas em casa de vegetação, com seis meses de idade e aproximadamente 50 cm de altura. As folhas foram conduzidas ao Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, e lavadas com água corrente, detergente e esponja autoclavada durante cinco minutos e então, enxaguadas com água destilada. Em câmara de fluxo horizontal, foram submersas em álcool 70% (v/v) por 1 minuto e em hipoclorito de sódio 0,5% (v/v) por 20 minutos e em seguida, enxaguadas três vezes com solução estéril de água destilada. As folhas foram reduzidas a segmentos de 1cm² em placas de Petri esterilizadas (Figura 2).

Figura 2: *Piper permucronatum* Yuncker. (A) Procedimento de pré-limpeza. (B) Desinfestação. (C) Explante recém-inoculado.



3.1.2 Indução de calos

Os explantes foram inoculados individualmente em tubos de ensaio contendo meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) a 50% (metade dos sais minerais e vitaminas), acrescido dos reguladores de crescimento 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético) e BAP (benzilaminopurina), nas concentrações de 1, 2 e 4 mg L⁻¹ em combinações fatoriais. O experimento foi mantido em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas, a 26±1°C. Ao final de 38 dias foi avaliado o percentual de explantes com calos friáveis, contaminação por fungos e bactérias, oxidação e necrose. Foi utilizado delineamento experimental inteiramente casualizado, sendo os tratamentos compostos por cinco repetições de quatro tubos de ensaio contendo um explante cada, aplicados em combinações fatoriais entre as diferentes concentrações de reguladores de crescimento, e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5%. Os tratamentos que resultaram em maiores porcentagens de calos friáveis foram repetidos para obtenção de grande número de calos. Estes calos foram utilizados para estabelecer suspensões celulares em meio líquido sob agitação.

3.2 CURVA DE CRESCIMENTO DE CALOS

Secções foliares foram inoculadas em tubos de ensaio contendo meio MS 50%, pH 5,8 suplementados com 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D + 1,0 mg L⁻¹ de BAP, 15 g.L⁻¹ de sacarose e 6 g.L⁻¹ de ágar. Após a inoculação, os tubos foram mantidos em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas, a 26±1°C. As avaliações do desenvolvimento dos calos para fins de obtenção da curva de crescimento foram feitas a partir do dia da inoculação até o 70º dia, em intervalos de sete dias. Em cada avaliação, três calos foram cuidadosamente retirados dos tubos de ensaio, limpos com papel absorvente para retirar excesso de meio de cultura e pesados individualmente em balança de precisão.

Com os resultados foi estabelecida a curva de crescimento com as fases lag, exponencial, linear, desaceleração, estacionária e declínio. A importância de se estabelecer a curva de crescimento de calos de determinada espécie está na identificação das fases em que ocorrem os processos cinéticos fundamentais, permitindo a correta manipulação dos mesmos.

O percentual de crescimento dos calos observado em cada fase foi determinado pela equação proposta por Lameira (1997):

$$\% \text{ crescimento} = \frac{P_f - P_i}{P_f} \times 100$$

onde:

P_f = Matéria seca final e P_i = Matéria seca inicial

3.3 DETERMINAÇÃO DA MASSA SECA E DO TEOR DE ÁGUA DE CALOS

Para a determinação da massa fresca, os calos foram pesados imediatamente após a remoção do meio de cultura, e para a determinação da massa seca os calos foram transferidos para placas de Petri de 6 cm de diâmetro e mantidos em estufa, por 24 horas a 70°C. O teor de água dos explantes e calos foi avaliado visando à confirmação das fases de crescimento identificadas por meio da matéria seca.

O teor de água nos explantes foi expresso em porcentagem da massa fresca e determinado através da seguinte fórmula (BEWLEY & BLACK, 1994):

Teor de água (% da massa fresca) = (massa fresca – massa seca)/massa fresca x 100.

3.4 CURVA DE CRESCIMENTO DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO

Os calos friáveis obtidos foram subcultivados em pequenos frascos de 20 ml contendo 5 ml de meio de cultura MS líquido suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e a combinação de reguladores de crescimento que deu origem ao calo com 50 mg de massa celular úmida em cada frasco. Os frascos foram mantidos em sala de crescimento nas condições descritas, em agitador orbital, a 30 rpm. O volume celular sedimentado (VCS) foi determinado durante os vinte e sete dias subsequentes. As células foram isoladas do meio de cultura, por meio de filtração em membranas de nylon com porosidade de 0,2 µm, a cada 3 dias de cultivo. Foram coletados dois frascos para determinação da concentração celular e quantificada a massa celular de todo o conteúdo presente em cada frasco de vidro. A membrana contendo o material filtrado foi levada à estufa com 50°C até atingir peso constante. Assim, a concentração de células, expressa em massa fresca e seca de células por volume de meio de cultivo apresentou um perfil de produção, identificando as diferentes fases de multiplicação e crescimento celular.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 INDUÇÃO DE CALOS

Para o estabelecimento de protocolos de indução de calogênese em explantes foliares de *P. permucronatum* foram testados meios de cultivos suplementados com várias concentrações de diferentes reguladores de crescimento ácido giberélico (GA₃) e as auxinas ácido alfa-naftalenoacético (ANA) e 2,4-D, e a citocinina BAP. Porém, somente as combinações fatoriais de ácido 2,4-D e BAP originaram os resultados significativos.

Contudo, Costa et al. (2008) verificou que a adição da auxina ANA nas concentrações de 2,5 e 5,0 mg L⁻¹ possibilitou os maiores percentuais de formação de calos friáveis em explantes foliares de *Piper hipidinervum* C. DC. e que o tipo de explante utilizado teve forte influência sobre esta variável. Nessas concentrações de ANA, a formação de calos observada com a utilização de segmentos foliares foi de 83,2% a 91,6%, valores significativamente superiores àqueles observados para os segmentos internodais, que foram de 43,1% e 49,6%.

Já Paredes et al. (2012), em estudos com *P. aduncum*, obtiveram além de calos friáveis, a regeneração de brotos em folhas e entrenós com outras combinações de reguladores de crescimento (ANA, BAP e GA₃), mostrando um potencial morfogênico superior com resposta de 66,5% de indução de calos.

Trabalhos prévios foram realizados para testar a eficiência do meio MS 50% e 100% com as mesmas combinações fatoriais de 2,4-D e BAP descritas anteriormente, de onde se concluiu que para a potencialização dos resultados de calogênese com explantes foliares de *P. permucronatum* se daria com o meio MS 50% por apresentar menor oxidação dos explantes. A composição de sais minerais do meio basal utilizado é conhecida por afetar a capacidade de regeneração e até mesmo a indução de calos em várias espécies (SATO et al., 1995; PREECE 1995).

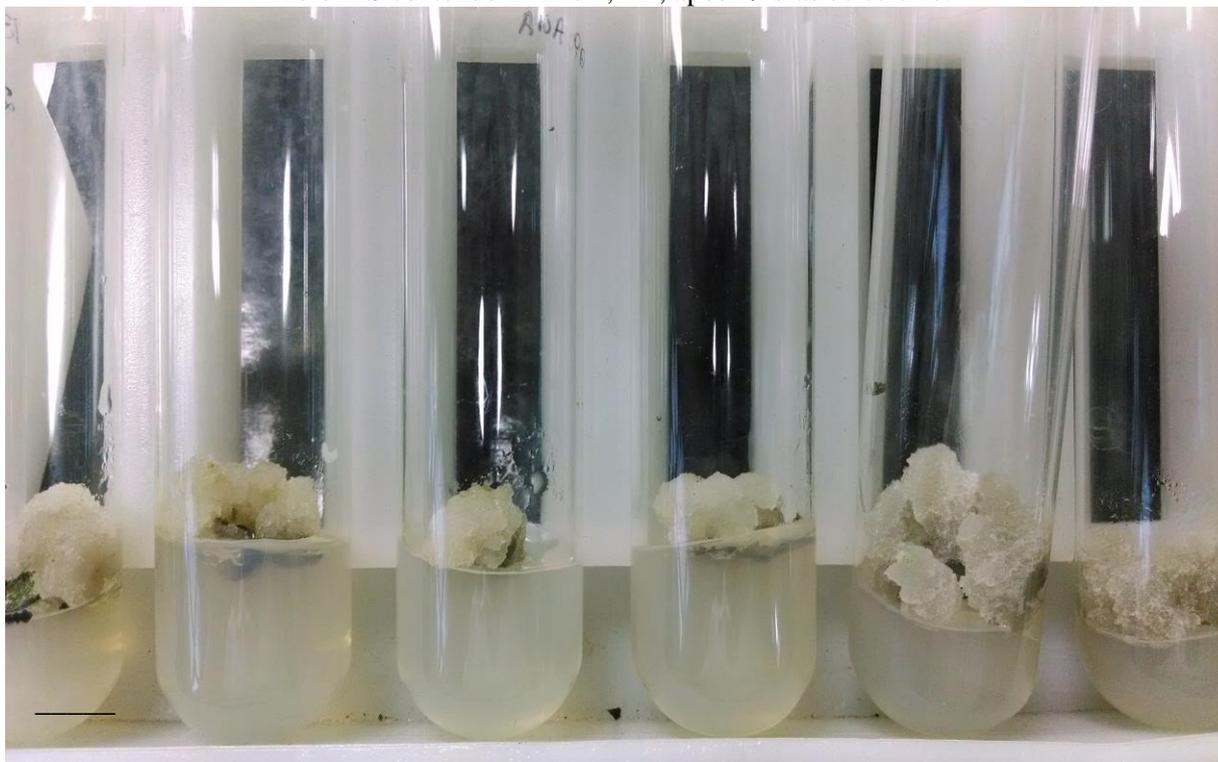
Kelkar et al. (1996) observou em estudos com *Piper colubrinum* que o uso de MS 50% reduziu o escurecimento dos explantes a 17,5% e aumentou o percentual de indução de calos para 66%. Resultado similar foi observado por Silva et al. (2003), que estudaram a influência da concentração de sais e fitorreguladores sobre a indução de calos em ápices caulinares de carqueja (*Baccharis trimera*) e observaram que a maior indução e crescimento de calos ocorreu em meio MS 50% suplementado com 2,8 mg L⁻¹ de ANA individualizado, ou nas

concentrações de 1,9 e 2,8 mg L⁻¹ em combinação com 1,25 ou 2,50 μM 0,3 e 0,6 mg L⁻¹ de cinetina (KIN).

Em contraste, Mathews & Rao (1984), Philip et al. (1992), Bhat et al. (1992) e Aminuddin et al. (1993) tiveram resultados positivos usando MS 100% em culturas de tecido com espécies do gênero *Piper*.

Neste experimento, a formação de calos iniciou aos 14 dias de cultura, com o intumescimento dos explantes. Aos 49 dias, a formação de calos foi observada em todos os tratamentos com o 2,4-D, indicando que este regulador de crescimento é necessário para a calogênese nesta espécie. A figura 3 mostra o aspecto destes calos que apresentaram uma coloração branca e friável.

Figura 3: Aspectos de calos de explantes foliares de *Piper permucronatum* Yuncker inoculados em meio MS contendo BAP e 2,4-D, após 49 dias de cultivo.



Barra = 1 cm.

O equilíbrio hormonal adequado estaria entre as combinações de concentrações de 1 - 4 mg L⁻¹ de 2,4-D e 1 mg L⁻¹ de BAP como pode ser observado na Tabela 1. A atividade do 2,4-D é evidenciada ao se observar que nos tratamentos sem este regulador não ocorreu indução. Mesmo não sendo observada formação de calos nos tratamentos com BAP

isoladamente, a atividade deste regulador é importante, pois nos tratamentos em que esteve presente houve diminuição de oxidação e escurecimento dos calos.

Tabela 1: Porcentagens de indução de calos em explantes foliares de *P. Permucronatum* sob diferentes concentrações de BAP e 2,4-D no meio de cultivo, após 49 dias de cultivo.

BAP (mg L ⁻¹)	2,4-D (mg L ⁻¹)			
	0	1	2	4
0	0 Ac*	40 Cb	45 Cb	60 Aa
1	0 Ac	100 Aa	80 Ab	75 Ab
2	0 Ab	65 Ba	60 Ba	70 Aa
4	0 Ab	50 Ca	60 Ba	60 Aa

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si dentro da mesma coluna, pelo teste de Tukey a 5%; médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si dentro da mesma linha, pelo teste de Tukey a 5%.

O mesmo foi observado no trabalho de Costa et al. (2008) que teve alta mortalidade (63,5%) em explantes foliares de *P. hipidinervum* nos tratamentos com 2,4-D nas concentrações de 2,5 e 5,0 mg L⁻¹.

Estudando a influência de diferentes combinações de auxina e citocinina sobre a formação de calos em explantes foliares de *P. hipidinervum*, Valle (2003) verificou efeito significativo da combinação de reguladores de crescimento utilizada. O cultivo desses explantes em meio contendo 5,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e 10,2 mg L⁻¹ de BAP proporcionou a maior formação de calos friáveis de coloração verde intensa. A interação destes reguladores corroboram com os resultados obtidos nesta pesquisa com *P. permucronatum*. Contudo, os resultados obtidos por Valle (2003) foram provocados possivelmente pela alta concentração de citocinina usada, em combinação com o 2,4-D, fato que pode ter anulado o efeito tóxico do 2,4-D.

Apresentando resultados contrários quanto ao emprego isolado de 2,4-D, Briskin et al. (2001) obtiveram além de calogênese, a organogênese de raiz a partir explantes foliares de *P. methysticum* na concentração de 2,0 mg L⁻¹.

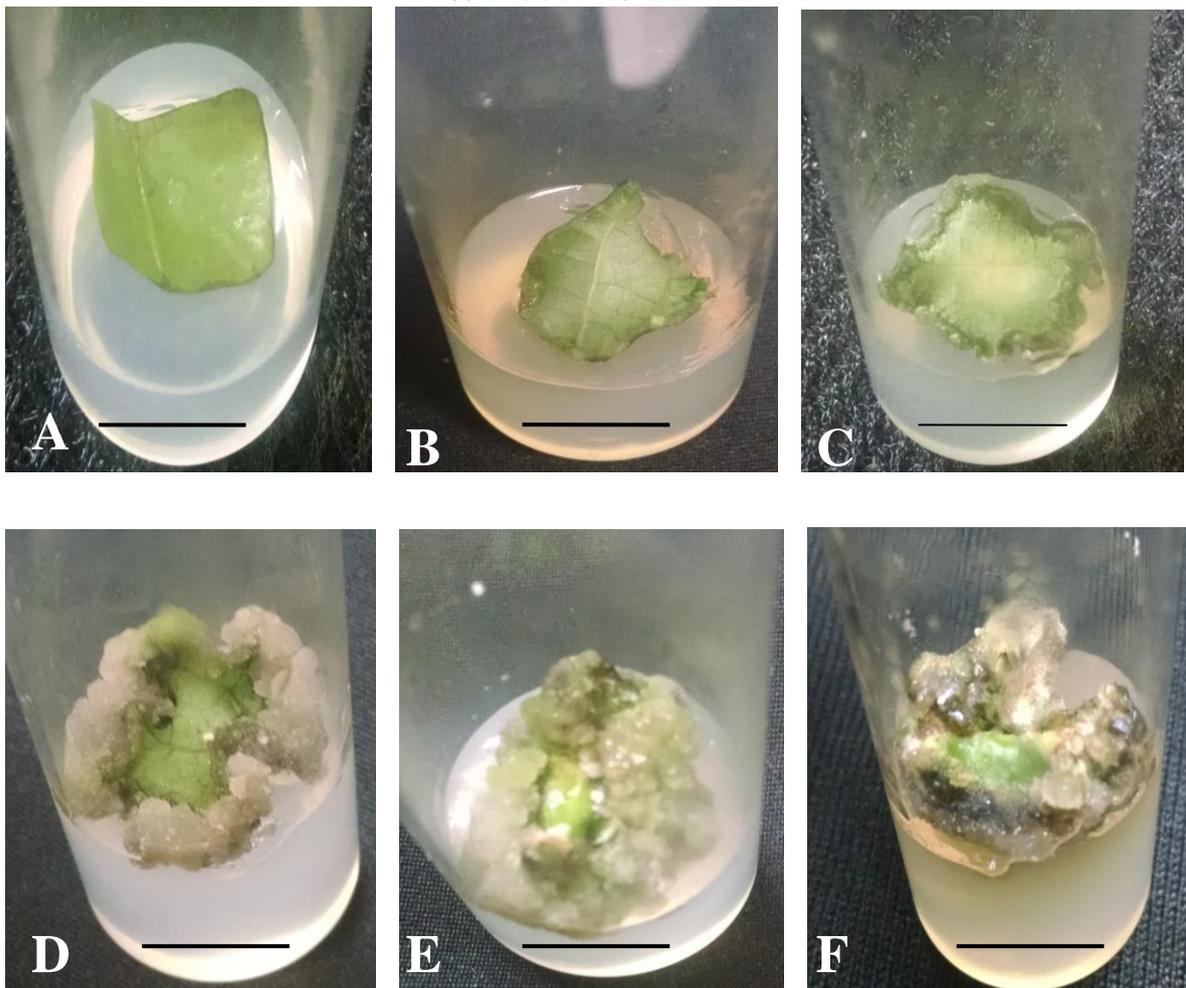
No presente trabalho, o tratamento que resultou em maior porcentagem de indução de calos foi: 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D + 1,0 mg L⁻¹ de BAP, com calos em 100% dos explantes. Estes tratamentos foram repetidos para obtenção de grande número de calos friáveis a fim de determinar a curva de crescimento de calos e posterior estabelecimento de suspensões celulares.

Com relação à interação de BAP com 2,4-D, Briskin et al. (2001) e Kelkar et al. (1996) potencializaram a indução de calos em explantes foliares realizando subcultivos nas mesmas concentrações do melhor tratamento deste trabalho ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D + $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP) em trabalhos com *P. methysticum* e *P. colubrinum*, respectivamente.

4.2 ESTABELECIMENTO DA CURVA DE CRESCIMENTO

A Figura 4 mostra o aspecto geral da formação de calos em segmentos foliares de *P. permucronatum* em meio MS 50% suplementado com os reguladores de crescimento BAP e 2,4-D ambos nas concentrações de 1 mg L^{-1} , desde a inoculação até 70 dias de cultivo.

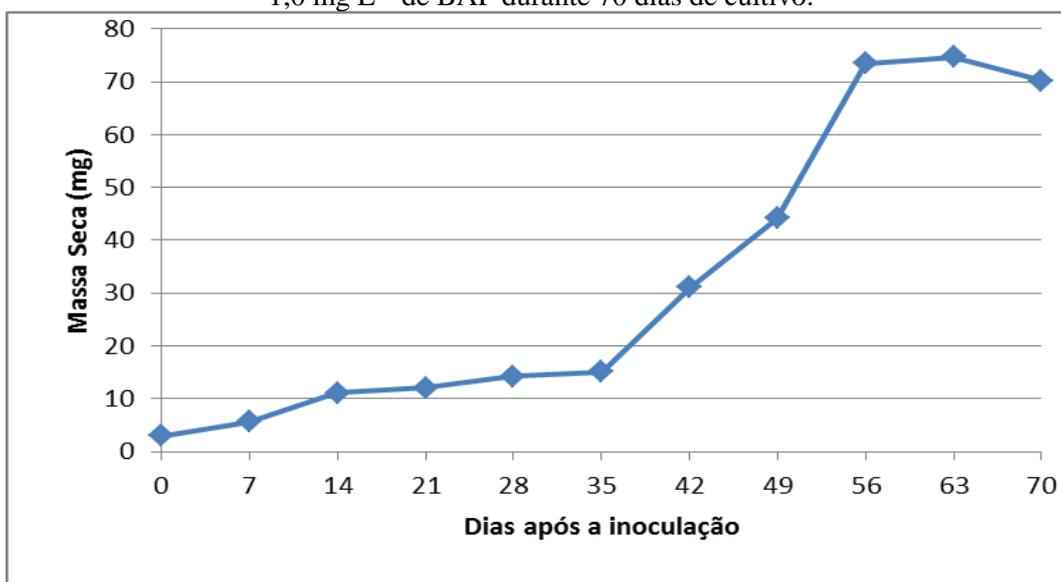
Figura 4: Calos de *Piper permucronatum* Yuncker inoculados em meio MS 50% com BAP e 2,4-D. A – primeiro dia de cultivo, B – 15 dias, C – 30 dias, D – 45, E – 60 dias e F – 75 dias de cultivo.



Barra = 1 cm.

A curva de crescimento dos calos seguiu o padrão sigmoidal, apresentando seis fases distintas: lag, exponencial, linear, desaceleração e estacionária e declínio (Figura 5). Esse tipo de curva de crescimento já foi observado em outras espécies de plantas lenhosas de uso medicinal como o murici-pequeno (NOGUEIRA et al., 2008), copaíba (AZEVEDO, 2003), sangra d'água (LIMA et al., 2007), aroeira-do-sertão (VASCONCELOS et al., 2012), japecanga (SANTOS et al., 1997) e barbatimão (CASTRO et al., 2008).

Figura 5: Curva de crescimento de calos de *Piper permucronatum* Yuncker obtidos a partir de segmentos foliares inoculados em meio MS 50%, contendo $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D e $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP durante 70 dias de cultivo.



O comportamento da curva de calos acontece em função da espécie de estudo e do explante utilizado. Para cafeeiro não foram identificadas todas as fases, somente três; lag, exponencial e linear, devido à baixa velocidade de crescimento de calos que essa espécie apresenta (SANTOS et al., 2003).

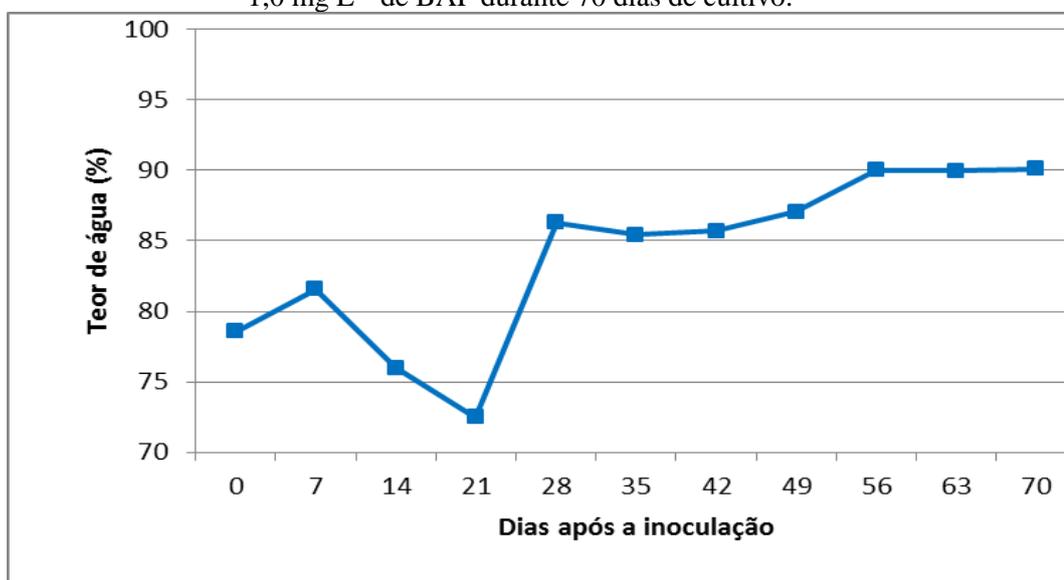
A fase *lag*, onde as células do explante se preparam para a divisão celular e produção de energia, ocorreu até o 21º dia após a inoculação, com um incremento médio de 9,1 mg de matéria seca nos explantes. Valle (2003) avaliando o crescimento de calos obtidos com base em segmentos foliares de pimenta longa (*Piper hispidinervum*) observou a fase lag em torno de 10 dias de cultivo.

A segunda fase, *exponencial*, estendeu-se do 21º ao 49º dia de cultivo, com acúmulo de 32,1 mg de matéria seca, período esse caracterizado pela máxima divisão celular. A fase lag pode ser considerada como uma fase produtora de energia e a fase exponencial como fase biossintética (SHIMIZU, 1977). O período da fase exponencial de crescimento em outras culturas encontrado na literatura é variável. Em *Stryphnodendron adstringens* a duração foi

entre o 31° ao 50° dia de cultivo (CASTRO et al., 2008), 14 dias para *Taxus chinensis* (CHOI et al., 2000), 18 dias com *Rauwolfia sellowii* (RECH et al., 1998) e 26 dias em cultura de *Taxus baccata* (HIRASUNA et al., 1996).

O teor de água dos explantes e calos foi avaliado visando à confirmação das fases de crescimento identificadas por meio da matéria seca. Na Figura 6 pode ser observado que a maior porcentagem de teor de água, 90%, ocorreu entre o 49° ao 56°, que coincide com a fase linear do crescimento de calos. Esta fase é caracterizada pela diminuição da divisão celular e aumento do volume celular, o que explicaria maior conteúdo de água. O incremento de matéria seca nesta fase foi de 29,3 mg por explante.

Figura 6: Porcentagem de teor de água em calos de *Piper permucronatum* Yuncker obtidos a partir de segmentos foliares inoculados em meio MS 50%, contendo $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D e $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP durante 70 dias de cultivo.



Mesmo que o período de crescimento *linear* de calos de *P. permucronatum* tenha sido alcançado com aproximadamente dois meses de cultivo, outras espécies podem atingir essa fase com maior rapidez, principalmente quando se utiliza explantes secundários, em que o tecido se apresenta mais homogêneo. Soares (2003), por exemplo, estudando a curva de crescimento de calos induzidos baseando-se em explantes foliares de ingá (*Inga vera*), observou a ocorrência da fase linear entre o 30° e 60° dia após a inoculação. Nogueira et al. (2008) observou a fase linear da curva de crescimento de explantes foliares de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia*) entre o 40° e 60° dia após a inoculação. Já com sangra d'água (*Croton urucurana*) ocorreu somente entre o 70° e 98° dias de cultivo (LIMA et al., 2007).

Entre o 56° e 63° dia observou-se a fase de *desaceleração* e *estacionária*, com apenas 1,2 mg de incremento de matéria seca por explante. Na fase de desaceleração, os calos devem ser transferidos para um novo meio de cultura, devido à redução de nutrientes, secagem do ágar e acúmulo de substâncias tóxicas (SMITH, 1992). Com isso, os resultados desse estudo indicam que a repicagem de calos de folhas de *P. permucronatum* deve ser realizada no início da fase de desaceleração, ou seja, aos 56 dias de cultivo. Vasconcelos et al. (2012), estudando a curva de crescimento de aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.), também recomendam que a repicagem fosse feita aproximadamente aos 60 dias após a inoculação. Já Santos et al. (2008) verificaram que a repicagem de calos provenientes de folhas de *Coffea canephora* L. cv. Apoatã deve ser efetuada aos 70° dia de cultivo.

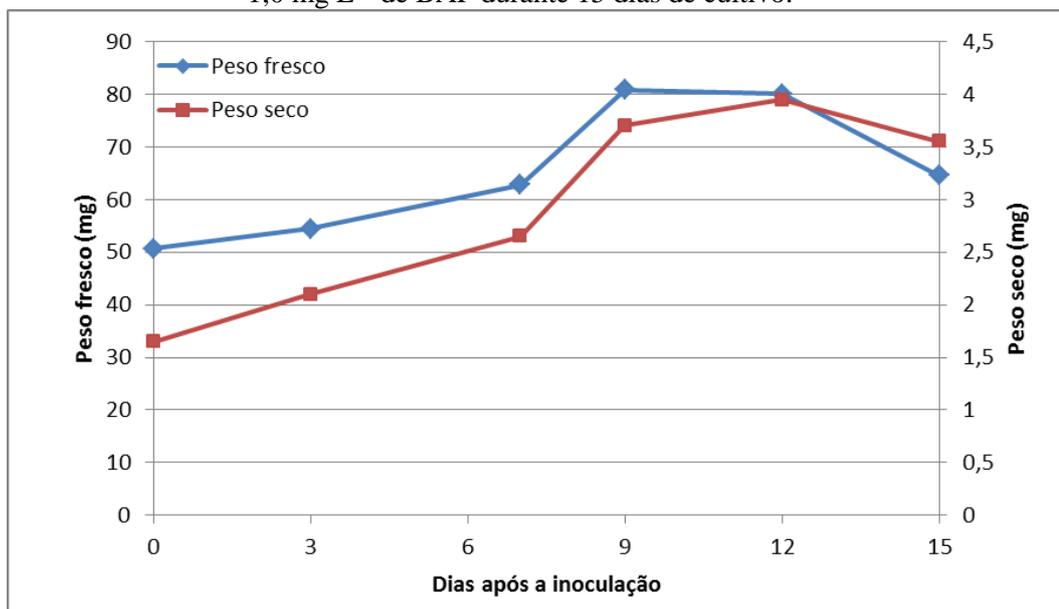
A partir do 70° dia, a cultura entrou em fase de *declínio*, com perda de 4,5 mg por explante. Na fase de declínio os calos iniciaram um processo de degradação, apresentando escurecimento da massa e do meio (Figura 4-F). Os compostos pigmentados formados nos calos podem estar relacionados à senescência do calo como uma resposta ao estresse surgido frente a um possível déficit de hormônios, nutrientes ou água, condições de provocam um aumento em radicais livres (ARNALDOS et al., 2001). Valle (2003) também observou esta fase em *P. hispidinervium* a partir de 40-45% de cultivo. Já Nogueira et al. (2008) observaram esta fase a partir do 100° dia em *Byrsonima intermedia* (murici-pequeno).

Os resultados apresentados pela curva de crescimento de calos de *P. permucronatum* é lento, o qual possivelmente está associado à ocorrência de um ciclo celular também lento (ALBERTS et al., 1997).

4.3 ESTABELECIMENTO DA CURVA DE CRESCIMENTO DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO

A curva de crescimento da cultura em suspensão teve um padrão semelhante ao do calo (Figura 5). O crescimento de células apresentou seis fases distintas: lag, exponencial, linear, desaceleração, estacionária e declínio, conforme mostrado na Figura 7.

Figura 7: Curva de crescimento de células em suspensão em função da duração da cultura no meio MS líquido suplementado com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D e $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP durante 15 dias de cultivo.



A fase *lag* ocorreu até o 3º dia, com um incremento médio de 3,8 mg e 0,45 mg de matéria fresca e seca respectivamente. Esses resultados foram similares aos obtidos em *Cataranthus roseus* (PETERSEN, 2006) e em *Cordia verbenacea* (LAMEIRA et al., 2009).

O período de máxima divisão celular ou período de crescimento *exponencial* ocorreu entre o 3º e o 6º dia com um incremento médio de 8,2 mg e 0,55 mg de matéria fresca e seca respectivamente. Em *Piper solmsianum* esse período se estendeu por cerca de 6 dias entre o 6º e o 12º dia de cultivo (BALBUENA et al., 2009). Em suspensão de células de *Salvia frutiosa*, essa fase durou cerca de 12 dias, entre o 4º e 16º dia de cultivo (KARAM et al., 2003).

O período de crescimento *linear* ocorreu entre o 6º e o 9º dia, com um incremento médio de 18,1 mg e 1,05 mg de matéria fresca e seca respectivamente. Nesse período, a divisão celular diminui e as células crescem (SMITH, 1992). Petersen (2006) observou a ocorrência desta fase entre o 5º e o 7º dia de cultivo em *Cataranthus roseus*. Karam et al., 2003 observaram a fase linear na *Salvia frutiosa*, entre o 16º e 20º dia.

Após o período de crescimento, as células entram na fase de *desaceleração* seguida da fase *estacionária* onde há um maior número de células com menor capacidade de divisão celular e a célula entra em estágio de diferenciação celular. Estas fases foram observadas entre o 9º e o 12º dia, com uma leve perda de 0,8 mg de matéria fresca e incremento médio de 0,25 mg de matéria seca por explante. Na fase estacionária, geralmente ocorre o maior acúmulo de metabólitos secundários, porém com menor crescimento celular. Em *Piper cernuum* estas

fases foram observadas entre o 18º e o 21º dia de cultura e em *Piper crassinervium* entre o 16º e o 26º dia (DANELUTTE et al., 2005); entretanto Balbuena et al., 2009 verificaram essa fase entre o 30º e o 42º dia de cultura em *Piper solmsianum*.

A partir do 12º dia, a cultura entrou em fase de *declínio*, com perda de 15,5 mg e 0,4 mg de matéria fresca e seca, respectivamente, por explante. Ciclos muito mais longos em geral são observados em outras espécies e gêneros.

Este estudo vai subsidiar trabalhos relacionados à identificação do potencial bioativo de metabólitos secundários de espécies de piperaceae atuando como método alternativo de controle do ácaro *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Pesquisas realizadas reportam que essas plantas apresentam atividade inseticida, bactericida, fungicida e acaricida (SILVA, 2014; MESQUITA et al., 2005). A utilização de plantas tóxicas e medicinais no controle de pragas é de grande importância para a agricultura familiar e para o desenvolvimento sustentável. A grande diversidade de plantas da Amazônia possibilita a pesquisa de novos produtos que poderão vir a substituir ou diminuir o uso de defensivos químicos (SILVA et al. 2007). Assim, depois de extraídos e testados os princípios ativos de *Piper permucronatum*, poderá ser uma alternativa para controlar o carrapato bovino *R. microplus* e minimizar os impactos ambientais causados pelos acaricidas sintéticos.

Com isso, espera-se apoiar o desenvolvimento da região Norte, com a disponibilização de tecnologias passíveis de utilização para lidar com fatores limitantes da produção agropecuária.

CONCLUSÕES

- Para a indução de calos em explantes foliares de *P. permucronatum* recomenda-se a utilização de meio de cultura MS 50% suplementado com BAP e 2,4-D. O tratamento que resultou em maior porcentagem de indução de calos foi: 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D + 1,0 mg L⁻¹ de BAP com calos em 100% dos explantes.
- A curva de crescimento dos calos desta espécie apresenta um padrão sigmóide, com seis fases distintas de crescimento. O momento adequado para repicagem dos calos é entre o 56º e o 63º dia após a inoculação. Os calos possuem aspecto friável e crescem em taxas adequadas, sendo indicados para estudos de células em suspensão.
- A curva de crescimento de células em suspensão definiu o período entre o 9º e o 12º dia de cultura para o maior acúmulo de metabólitos secundários (fase estacionária).
- A utilização de plantas tóxicas e medicinais no controle de pragas é de grande importância para a agricultura familiar e para o desenvolvimento sustentável. Este estudo vai subsidiar trabalhos relacionados à identificação do potencial bioativo de metabólitos secundários de espécies de piperaceae atuando como método alternativo de controle do ácaro *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Com isso, espera-se apoiar o desenvolvimento da região Norte.

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K. WATSON, J. D. **Biologia Molecular da célula**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. 1294p.
- AMINUDDIN, JOHRI, J. K.; ANIS, M.; BALASUBRAHMANYAM, V. R. Regeneration of Piper betle from callus tissue. **Current Science**, v. 65, n. 10, p. 793-796, 1993.
- ANJOS JUNIOR, J. F. **Estudo Fitoquímico e Atividade Biológica de *Piper permucronatum* Yuncker (Piperaceae)**. 2007. Dissertação (Mestrado em Biologia Experimental) – Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, RO, 2007.
- ARAGÃO, J.L.; BORRERO, M.A.V. Esboço de uma política pública de desenvolvimento sustentável para pecuária leiteira da agricultura familiar de Rondônia em consonância com o sistema contemporâneo capitalista. In: BRASIL, V (org.). **Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente em Rondônia**. Porto Velho: Edufro, 2007, v. 1, p. 13-17.
- ARIKAT, N.A. Micropropagation and accumulation of essential oils in wild sage (*Salvia fruticulosa* Mill.). **Scientia Horticulturae**, v.100, p.93-202, 2004.
- ARNALDOS, T. L.; MUÑOZ, R.; FERRER, M. A.; CALDERÓN, A. A. Changes in phenol content during strawberry (*Fragaria x Ananassa*, cv. Chandler) callus culture. **Physiologia Plantarum**, v. 113, n. 3, p. 315-322, 2001.
- AZEVEDO, K. S. **Indução e análises bioquímicas de calos e aspectos as anatomia foliar de copaíba (*Copaíba langsdorffii* Desf.)**. 2003. 52 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Unversidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.
- BALBUENA, T. S.; SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V.; KATO, M. J.; FLOH, E. I. S. In vitro morphogenesis and cell suspension culture establishment in Piper solmsianum C. DC.(Piperaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, n. 1, p. 274-281, 2009.
- BARROS NETO, B.; SCARMINO, I.S.; BRUNS, R.E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Campinas-SP: Editora da Unicamp, 1996. 406 p.
- BARROSO, G.M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. São Paulo: LTC/EDUSP, 1978. 255 p.
- BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds: Physiology of Development and Germination**. New York: Plenum Press, 1994. 445 p.
- BHAT, S. R.; KACKAR, A.; CHANDEL, K. P. S. Plant regeneration from callus cultures of Piper longum L. by organogenesis. **Plant Cell Reports**, v. 11, n. 10, p. 525-528, 1992.
- BIAVATTI, M.; MARENSI, V.; LEITE, S.N.; REIS, A. Ethnopharmacognostic survey on botanical compendia for potential cosmeceutic species from Atlantic Forest. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 4, p. 640-653, 2007.

- BOTTA, B.; SILVESTRINI, A.; MONACHE, G. D. Cultura de tecidos vegetais: doze anos de experiência. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal**. Chapecó: Argos, p.354-379, 2001.
- BOURGAUD, F.; GRAVOT, A.; MILESI, S.; GONTIER, E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant science**, v. 161, n. 5, p. 839-851, 2001.
- BOX, G.E.P. The exploration and exploitation of response surfaces: some general considerations and examples. **Biometrics**, v. 10, n. 1, p. 16-60, 1954.
- BRISKIN, D.; KOBAYASHI, H.; METHA, A.; GAWIENOWSKI, M.; AINSWORTH, L.; SMITH, M. A. L. Production of kavapyrones by Kava (*Piper methysticum*) tissue cultures. **Plant Cell Reports**, v. 20, n. 6, p. 556–561, 2001.
- 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.ma
- CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 3, p. 37-39, 2003.
- CASTRO, A. H. F.; LIMA, M. M.; PAIVA, R.; ALVARENGA, A. A.; SÓTER, M. O. Curva de crescimento, atividade da fenilalanina amônia-liase e teores de fenóis e taninos totais em calos de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Fabaceae-Mimosoideae). **Plant Cell Culture & Micropropagation**. Lavras, v. 4, n. 2, p. 99-104, 2008.
- 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.
- CHOI, H. K.; KIM, S. J.; SON, J. S.; HONG, S. S.; LEE, H. S.; LEE, H. J. Enhancement of paclitaxel production by temperature shift in suspension culture of *Taxus chinensis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 8, p. 593-598, 2000.
- CID, L.P.B; Suspensão celular. In.: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília. Embrapa-CNPq, 1998, 331-353p.
- CORDELL, G.A., **Introduction to alkaloids: a biogenetic approach**. Nova York: John-Wiley & Sons, 1981. 208p.
- COSTA, F. H. S.; LOUREIRO, T. S.; PEREIRA, J. E. S. Influência de auxinas e tipos de explantes na indução de calos friáveis em *Piper hispidinervum* C. DC1. **Revista Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v. 39, n. 2, p. 269-274, 2008.
- CROTEAU, R.; KUTCHAN, T.M.; LEWIS, N.G. Natural Products (Secondary Metabolites). In: BUCHANAN B., GRUISSEM W., JONES R. (Eds.) **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. p. 1250-1318.

- DANELUTTE, A. P.; COSTANTIN, M. B.; DELGADO, G. E.; BRAZ-FILHO, R.; KATO, M. J. Divergence of secondary metabolism in cell suspension cultures and differentiated plants of *Piper cernuum* and *P. crassinervium*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 16(6B), p. 1425-1430. 2005.
- DIAS, L. S.; DIAS, A. S. Metabólitos secundários como fontes de bioherbicidas: situação actual e perspectivas. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 30, n. 1, p. 510-517, 2007.
- FEDOZZI, L. Práticas inovadoras de gestão urbana: o paradigma participativo. **Revista Paranaense de Desenvolvimento**, Curitiba, v. 100, p. 91-105, 2011.
- 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**, Campinas, v. 8, n. 3, p. 89-95, 2006.
- FLORES, R.; NICOLOSO, F.T. Efeito do ANA e BAP na calogênese e organogênese de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Campinas, v.9, n.4, p. 92-96, 2007.
- FUMAGALI, E., GONÇALVES, R. A. C., MACHADO M. F. P. S., VIDOTI, G. J., OLIVEIRA, A. J. B. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 627-641, 2008.
- FURDEN, 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. 312-317, 2005.
- GADOTTI, M. Educar para uma vida sustentável. **Revista Pátio**, Porto Alegre, n. 6, p. 13-15, 2008.
- GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. Plant tissue culture procedure-Background. In: _____. **Plant propagation by tissue culture**. 2. Ed. Netherlands: Springer, 2008. cap. 2, p. 1-28.
- GERSHENZON J.; ENGELBERTH J. E. Metabólitos secundários e Defesa Vegetal. In TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. p. 369-399.
- GOBBO-NETO, L; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 374. 2007.
- GRATTAPLAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/CNPH, 1998. v. 1. p. 183-260.
- HARBORNE, J. B. Methods of extraction and isolation. **Phytochemical Methods**, v. 3, p. 60-66, 1998.

- HIRASUNA, T. J.; PESTCHANKER, L. J.; SRINIVASAN, V.; SHULER, M. L. Taxol production in suspension cultures of *Taxus baccata*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 44, p. 95-102, 1996.
- JANK, M. S.; NASSAR, A. M.; TACHINARDI, M. H. Agronegócio e comércio exterior brasileiro. **Revista USP**, n. 64, p. 14-27, 2005.
- JARAMILLO M. A., MANOS P. S. Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (Piperaceae). **American Journal of Botany**, v. 88, p.706-716, 2001.
- JOSHI, H. N. Drug development and imperfect design. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 343, n. 1-2, p. 1-3, 2007.
- 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, n. 2, p. 117-121, 2003.
- KELKAR, S. M.; DEBOO, G. B.; KRISHNAMURTHY, K. V. In vitro plant regeneration from leaf callus in *Piper colubrinum* Link. **Plant Cell Reports**, v.16, n. 3-4, p. 215-218, 1996.
- KERBAUY, G.B. Clonagem de plantas *in vitro*. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v.1, n.1, p. 30-33, 1997.
- KOHLHEPP, G. Conflitos de interesse no ordenamento territorial da Amazonia. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 16, n. 45, p. 37-61, 2002.
- KOLLÁVORÁ, K. Effect of auxins on *Karrwinskia humboldtiana* root cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 79, n. 2, p. 213-21, 2004.
- KROETZ, M.; LICHTENFEL, E.; SCHREINER, G. D.; DOS SANTOS, M. C. A evolução da agropecuária regional. In.: **III Encontro de Economia Catarinense: Home Eventos Programa Comissões**. FURB – Blumenau/SC, 2009.
- LAMEIRA, O. A. **Propagação *in vitro* e *in vivo*, dinâmica de crescimento de células, nutrição e identificação de flavonóides em erva-baleira (*Cordia verbenacea* L.)**. 1997. 88 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) Universidade Federal de Lavras, Lavras: 1997.
- LAMEIRA, O. A; PINTO, J. E. B. P.; CARDOSO, M. G.; ARRIGONI-BLANK, M. F. Estabelecimento de cultura de células em suspensão e identificação de flavonóides em *Cordia verbenacea* DC. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, p. 7-11, 2009.
- LIMA, D.; POZZOBON, J. Amazônia socioambiental: sustentabilidade ecológica e diversidade social. **Estudos avançados**, São Paulo, v.19, n. 54, p. 45-76, 2005.
- LIMA, E. C.; PAIVA, R.; SOARES, F. P.; NOGUEIRA, R. C. Avaliação bioquímica do desenvolvimento de calos *in vitro* a partir de segmentos foliares de sagra d'água (*Croton urucurana* Baill.). **Magistra**, Cruz das Almas, v. 19, n. 3, p. 184-190, 2007.

MABBERLEY, D. J. **The Plant Book. A Portable Dictionary of the Higher Plants.** New York, USA: Cambridge University Press, p. 706, 1997.

MACHADO, F.A.P.S.A.; CAPELASSO, M.; OLIVEIRA, A.J.B.; ZAMUNER, M.L.M.; MANGOLIN, C. A.; MACHADO, M.F.P.S. Alkaloid production and Isozymes expression from cell suspension culture of *Cereus peruvianus* Mill (Cactaceae). **Journal of Plant Science**1, v. 1, n. 4, p. 324-331, 2006.

MACHADO, M. F. P. S.; COLLETI, S. A. O. **Expressão gênica no desenvolvimento de tecidos vegetais in vitro.** Maringá: Editora da Universidade Estadual de Maringá, 1991, 95p.

MATHEWS, V.; RAO, P. S. *In vitro* responses of black pepper (*Piper nigrum*). **Current Science**, v. 53, n. 4, p. 183-186, 1984.

MESQUITA, J.M.O.; CAVALEIRO, C.; CUNHA, A.P.; LOMBARDI, J.A.; OLIVEIRA, A.B. (2005). Estudo comparativo dos óleos voláteis de algumas espécies de Piperaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n.1, p. 6-12, 2005.

MORAIS, S. M.; FACUNDO, V. A.; BERTINI, L. M. Chemical composition and larvicidal activity of essential oils from *Piper* species **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, n. 10, p. 670-675, 2007.

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.

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

NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; LIMA, E. C.; SOARES, G.A.; OLIVEIRA, L.M.; SANTOS, B.R.; EMRICH, E.B.; CASTRO, A. H. F. Curva de crescimento e análises bioquímicas de calos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 10, n. 1, p. 44-48, 2008.

OKSMAN-CALDENTY, 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. 433-40, 2004.

PAREDES, G. E. D.; KATO, M. J.; DUEÑAS, N. V.; PATIÑO, J. M.; IDROGO, C. R. Cultivo de tejidos de *Piper* sp. (Piperaceae): propagación, organogénesis y conservación de germoplasma *in vitro*. **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. 14, n. 2, p. 49-60, 2012.

PETERSEN, R. Z. **Biotransformação de terpenóides por culturas de células vegetais e fungos filamentosos.** 2006. 206 p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre: 2006.

PHILIP, V. J.; JOSEPH, D.; TRIGGS, G. S.; DICKINSON, N.M. Micropropagation of black pepper (*Piper nigrum* Linn.) through shoot tip cultures. **Plant Cell Reports**, v. 12, n. 1, p. 41-44, 1992.

PINAZZA, L. A. A Questão ambiental no agribusiness. In: SILVEIRA, M; VILELA, S. **Globalização e sustentabilidade da agricultura**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998.

PREECE, J. E. Can nutrient salts partially substitute for plant growth regulators? **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, v. 1, p. 26-37, 1995.

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

RECH, S. B.; BATISTA, C. V. F.; SCHRIPEMA, J.; VERPOORTE, R.; HENRIQUES, A. T. Cell cultures of *Rauwolfia sellowii*: growth and alkaloid production. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 54, p. 61-63, 1998.

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

ROZWALKA, L. C.; LIMA, M. L. R. Z. C.; MIO, L. L. M.; NAKASHIMA, T. Extratos, de coctos e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas na inibição de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* de frutos de goiaba. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 2, p. 301-307. 2008.

ROEL, A. R. Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o desenvolvimento rural sustentável. **Revista Internacional de Desenvolvimento Local**, v.1, n.2, p. 43-15, 2001.

SANTOS, A. S.; ARAÚJO, S. F.; GOULART, H. F.; CAETANO, L. C.; ARRUDA, M. S. P.; SANTOS, L. S.; SANTA'ANA, A. E. G. A dehydrorotenoid produced by callus tissue culture and wild plant roots of *Boerhaavia coccinea*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 538-541, 2007.

SANTOS, C. G.; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O.; PAIVA, E. Indução e análise bioquímica de calos em segmentos foliares e nodais de *Coffea canephora* L. cv. Apoatã. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 20, n. 1, p. 22-29, 2008.

SANTOS, C. G.; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O.; PAIVA, E. Indução e análise bioquímica de calos obtidos de segmentos foliares de *Coffea arábica* L., cultivar Rubi. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 3, p. 571-577, 2003.

SANTOS, M. R. A.; PAIVA, R.; BENDADIS, A. K. Cultura de tecidos de *Smilax japecanga* Grisebach: indução e crescimento de calos. **Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 28, n. 1/2, p. 37-43, 1997.

SANTOS, M. R. A.; SOUZA, C. A.; GUIMARÃES, M. C. M.; SMOZINSKI, C. V.; MAGALHÃES, G. M. O.; NOGUEIRA, W. O.; PAZ, E. S. Growth Pattern of Friable Callus from *P. carniconnectivum* Leaf Explants. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 27, n.9, p. 226-231, 2015.

SATO, T.; KWON, O. C.; MIYAKE, H.; TANIGUCHI, T.; MAEDA, E. Regeneration of plantlets from petiole callus of wild viola (*Viola patrinii* DC.). **Plant Cell Reports**, v. 14, n. 12, p. 768-772, 1995.

SCOTT, A.I.; LEE, S.L.; CULVER, M.G.; WAN, W.; HIRATA, T., GUÉRITTE, F.; BAXTER, R.L.; NORDLÖV, H.; DORSCHHELL, A.; MIZOKAMI, H.; MACKENZIE, N.E. Biosynthesis of indole alkaloids. **Heterocycles**, v. 15, p.1257-1274, 1981.

SHIMIZU, T.; CLITTO, A.; KOMAMINE, A.; FOWLER, M. W. Changes in metabolite levels during growth of *Acer pseudoplatanus* (sycamore) cells in batch suspension culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 40. p. 125-129, 1977.

SILVA, W. C. **Potencialidade acaricida e estudo fitoquímico de piper aduncum L.(Piperaceae), palicourea marcgravii St. Hil (Rubiaceae) e derris negrensis benth (Fabaceae) sobre rhipicephalus (Boophilus) microplus.** 2008. 167p. Tese (Doutorado em Biotecnologia), Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2014.

SILVA, W.C.; RIBEIRO, J.D.; SOUZA, H.E.M.; CORRÊA, R.S. Atividade inseticida de *Piper aduncum* L. (Piperaceae) sobre *Aetalion* sp. (Hemiptera:Aetalionidae), praga de importância econômica no Amazonas. **Acta amazônica**, v. 37, n. 2, p. 293-298, 2007.

SILVA, F. G.; PINTO, J. E. B. P.; SALES, J. D. F.; DIVINO, S. D. P.; BERTOLUCCI, S. K. V. Efeito da concentração de sais e fitoreguladores na indução de calos em carqueja. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 3, p. 541-547, 2003.

SMITH, R. M. **Plant tissue culture: techniques and experiments.** San Diego: Academic Press, 1992. 171p.

SOARES, G. A. **Aspectos do cultivo in vitro do ingazeiro [*Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T. D. Penn].** 2003. 107 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

SOUZA, K. C. A.; SANTOS, H.A. Biotecnologia aplicada ao estudo da lignificação. **Floresta e Ambiente**. Rio de Janeiro, v.14, n.1, p. 93-109. 2007.

SOUZA, S. V. C.; SILVA, G.; DINIZ, M. H. G. M.; SANTOS, E. V.; LIMA, J. A.; TEODORO, J. C. Determinação de resíduos de avermectinas em fígado bovino por cromatografia líquida de alta eficiência. **Ciência de Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 1, p. 54-58, 2003.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Metabólitos secundários e defesa vegetal. In:_____. **Fisiologia Vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artimed, 2004. p. 309-332.

TAWAN, C. S.; IPOR, I. B.; FASHIHUDDIN, B. A.; SANI, H. A brief account on the wild Piper (Piperaceae) of the Crocker Range, Sabah. **ASEAN Review of Biodiversity and Environmental Conservation (ARBEC)**, v. 11, 2002.

TEBBS, M. C. Revision of Piper (Piperaceae) in the new world. I: Review of characters and taxonomy of Piper section *Macrostachys*. **Bulletin of the British Museum. Natural History. Botany**, v. 19, p. 117-158, 1989.

TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A.; (Eds). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, v. 1, 1998. 509p.

VALLE, R. de C. S. C. **Estratégias de cultivo de células de Pimenta longa (*Piper hispidinervium*) e determinação de parâmetros cinéticos**. 2003. 165 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

VASCONCELOS, J. N. C.; CARDOSO, N. S. N.; OLIVEIRA, L. M.; SANTANA, J. R. F.; FERNANDEZ, L. G.; BELLO KOBLITZ, M. G.; SILVA, M.L.C. Indução, caracterização bioquímica e ultra-estrutural de calos de aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.). **Revista Brasileira de Planas Mediciniais**, Botucatu, v. 14, n. 4, p. 592-597, 2012.

VEIGA, J. E. Territórios para um desenvolvimento sustentável. In: **Territórios, Ciência & Cultura**. São Paulo: 2006, p. 58.

VERPOORTE, R.; MARASCHI, M. Engenharia do metabolismo de plantas medicinais. In: YUNES R. A.; CALIXTO J.B. (orgs.) **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001. p. 381- 432.

VILLAREAL, M. L.; ARIAS, C.; VEJA, J.; FERIA-VELASCO, A.; RAMIREZ, O.T.; NICASIO, P.; ROJAS, G.; QUINTERO, R. Cell suspension culture of *Solanum chrysostrichum* - a plant producing an antifungal spirostanol saponin. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 50, p. 39-44, 1997.

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

YUNCKER T. G. The Piperaceae of Brazil: Piper – Group I, II, III and IV. **Hoehnea**, v. 2, p. 23-366, 1972.