

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS, ALGAS E  
PLANTAS**

**THAISE GERBER**

**PERFIS METABÓLICOS DE CALOS DE *Cedrela fissilis* VELL.  
(MELIACEAE) CULTIVADOS *IN VITRO***

**Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação  
em Biologia de Fungos, Algas  
e Plantas da Universidade  
Federal de Santa Catarina  
como parte dos requisitos  
para a obtenção do Grau de  
Mestre em Biologia de  
Fungos, Algas e Plantas.**

**Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Ana  
Maria Viana.**

**Coorientador: Prof. Dr.  
Marcelo Maraschin.**

**Florianópolis**

**2013**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Gerber, Thaise

Perfis metabólicos de calos de *Cedrela fissilis* Vell.  
(Meliaceae) cultivados in vitro / Thaise Gerber ;  
orientadora, Ana Maria Viana ; co-orientador, Marcelo  
Maraschin. - Florianópolis, SC, 2013.  
202 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-  
Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas.

Inclui referências

1. Biologia de Fungos, Algas e Plantas. 2. Calos. 3.  
Fonte de carbono. 4. Glutamina. 5. Tipos de explantes. I.  
Viana, Ana Maria. II. Maraschin, Marcelo. III.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-  
Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas. IV. Título.

**Thaise Gerber**

**PERFIS METABÓLICOS DE CALOS DE *CEDRELA FISSILISVELL.* (MELIACEAE) CULTIVADOS *IN VITRO***

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre”, e \_\_\_\_\_ em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas.

Florianópolis, 22 de abril de 2013.

\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup>Dr.<sup>a</sup> Maria Alice Neves  
Coordenadora do Curso

**Banca Examinadora:**

\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup>, Dr.<sup>a</sup> Ana Maria Viana,  
Orientadora  
Universidade Federal de Santa Catarina

\_\_\_\_\_  
Prof., Dr. Marcelo Maraschin,  
Coorientador  
Universidade Federal de Santa Catarina

\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup>, Dr.<sup>a</sup> Rosete Pescador,  
Universidade Federal de Santa Catarina

\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup>, Dr.<sup>a</sup> Rozangela Curi Pedrosa,  
Universidade Federal de Santa Catarina

\_\_\_\_\_  
Prof., Dr. Paulo César Firmino Junior,  
Universidade Federal do Ceará

\_\_\_\_\_  
Prof., Dr. João de Deus Medeiros,  
Universidade Federal de Santa Catarina



## **DEDICATÓRIA**

Dedico a minha mãe Isolete, a meu pai Osmair e ao meu amor Júnior, com todo amor!

"Apesar dos nossos defeitos, precisamos enxergar que somos pérolas únicas no teatro da vida e entender que não existem pessoas de sucesso e pessoas fracassadas. O que existem são pessoas que lutam pelos seus sonhos ou desistem deles."

(Augusto Cury)



## AGRADECIMENTOS

Quero agradecer primeiramente a Deus pela oportunidade e pela minha força de vontade em querer tanto concretizar este sonho.

A minha orientadora Profa. Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Viana pelas orientações, ensinamentos, carinho e dedicação pelo seu trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcelo Maraschin, pelas orientações, ensinamentos e a sua determinação pelas análises bioquímicas e pela disponibilidade em realizar este trabalho que fez com que gostasse ainda mais desta pesquisa.

A Profa. Zenilda Laurita Bouzon, pela disponibilização dos recursos do laboratório de algas marinhas (LAMAR).

À Dr<sup>a</sup>. Fernanda Ramlov, pelo apoio, conselhos, amizade e ensinamentos que foram fundamentais para a concretização do meu trabalho.

Ao Dr. Éder Carlos Schmidt, pela amizade e colaboração nas análises de histoquímica.

Ao laboratório de Fisiologia Vegetal, Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (LMBV) e Laboratório de algas marinhas (LAMAR) pela disponibilidade dos equipamentos e aos colegas de laboratório pela ajuda na realização dos meus experimentos.

Aos colegas do laboratório de Fisiologia Vegetal, Ana Flávia Pavei, Eduardo da Costa Nunes, Valéria Bulgarelli, Juliane Lemos, Luana Souza e Joice pelo apoio, idéias trocadas, piadas, brincadeiras que levaram ao trabalho a superar obstáculos e a ficar mais colorido.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Fungos, algas e plantas, pela oportunidade de realizar o mestrado.

A todo o corpo docente do PPGBV pela competência e profissionalismo.

À Vera, ex-secretária e a atual secretária, Priscila do Programa de Pós-graduação em Biologia de Fungos, algas e plantas pelos serviços prestados, durante o mestrado e pelo seu apoio para realizá-lo.

À Universidade Federal de Santa Catarina pela concretização do mestrado e a CAPES pelo auxílio financeiro.

Às amigas e amigos, em especial: Fernanda Ramlov, Aline Pereira, Ana Voytena, Bianca Coelho, Bruno Minardi, Elise Lara Galitzski, Graziela Geisler, Kátia Arenhart Hoss, Jeovane Warmling, Tassiane Terezinha Pinto, Richard Tito, Robson Avi, Rodolfo Moresco, Eva Regina, Patricia Chioffi, Vivian Phillipi, Maevi Ottonelli, Pamela Muñoz, Marthiellen Roosevelt, Lusk Pollo pelos conselhos, força, ajuda,

união, conversas, idéias trocadas, emoções, divertimentos, festas, companheirismo durante o curso, sem eles eu não seria nada. Muito Obrigada!!

A meus pais, Isolete Marlene Fell e Osmair Gerber pela minha educação, por sempre acreditarem em mim e pelo apoio que sempre vêm me dando, a desistir jamais e sim seguir em frente com garra e determinação.

Ao meu grande amor Juninho, por sempre me incentivar, aconselhar, acreditar e por entender minha ausência em muitas situações. Valeu amor!

A todos de que de uma forma ou de outra sempre me incentivaram a superar obstáculos, devemos acreditar que o que queremos, conseguimos, não importa tão quão difícil seja, o importante é querer e fazer acontecer.





## RESUMO

*Cedrela fissilis* Velloso (Meliaceae) é uma espécie arbórea, nativa da Floresta Atlântica de grande interesse econômico devido à sua madeira de qualidade e ao crescimento rápido. É utilizada em arborização de espaços urbanos, além de produzir metabólitos secundários de interesse econômico, principalmente terpenos. Este trabalho teve como objetivos estudar, em calos cultivados *in vitro*, os efeitos de fontes de carbono, glutamina, tipos de explantes, reguladores de crescimento (BAP e ANA), presença e ausência de luz sobre os conteúdos de proteínas totais, açúcares solúveis totais, amido, fenólicos totais, flavonoides, carotenoides (conteúdos e tipos), clorofilas *a* e *b*, perfis metabólicos, atividade antioxidante, morfologia e histoquímica. Calos de *Cedrela fissilis* foram induzidos em todos os tipos de explantes testados (nó foliar, nó cotiledonar, segmentos de epicótilo, folha, cotilédone, hipocótilo, raiz) (exceto em explantes de folhas cultivados com 118 mM de sacarose, 2,73 mM de glutamina e na luz), cultivados em diferentes fontes de carbono (sacarose, frutose, glucose), em todas as combinações de concentrações de BAP e ANA (2,5  $\mu$ M e 5  $\mu$ M), em diferentes concentrações de glutamina (0; 2,73 e 5,46  $\mu$ M), na presença ou na ausência da luz. Através da manipulação das concentrações de sacarose (59 mM e 118 mM) e de glutamina (0; 2,73 e 5,46 mM) em meio de cultura Murashige & Skoog, suplementado com 0,2% de Phytigel, 2,5  $\mu$ M de BAP e 5  $\mu$ M de ANA foi possível determinar as melhores condições de cultivo de calos de nós cotiledonares, para estimular a produção de proteínas totais (59 mM de sacarose e 5,46 mM de glutamina), açúcares solúveis totais e amido (118 mM sacarose e 5,46 mM glutamina), fenólicos totais (118 mM sacarose e 2,73 mM de glutamina), flavonoides (118 mM sacarose e 2,73 mM glutamina), carotenoides (118 mM sacarose e 5,46 mM de glutamina), clorofilas *a* (59 mM de sacarose e 5,46 mM de glutamina) e *b* (59 mM de sacarose e 5,46 mM de glutamina, 118 mM de sacarose e 2,73 mM de glutamina) e a maior porcentagem de inibição do radical livre DPPH• (118 mM de sacarose e 2,73 mM de glutamina). Através da manipulação das fontes de carbono (sacarose, glucose e frutose a 118 mM) e de combinações de concentrações de BAP e ANA (2,5  $\mu$ M e 5  $\mu$ M), em meio de cultura MS, suplementado com 0,2% de Phytigel e 2,73 mM de glutamina foi possível determinar as melhores condições de cultivo de calos de nós cotiledonares para estimular a biossíntese de proteínas totais (sacarose, 5  $\mu$ M de BAP e 5  $\mu$ M de ANA; frutose 2,5  $\mu$ M de BAP e 5  $\mu$ M de ANA), açúcares solúveis totais (sacarose, 2,5  $\mu$ M de BAP e 2,5  $\mu$ M de ANA),

amido (sacarose, 2,5  $\mu$ M de BAP e 2,5  $\mu$ M de ANA), fenólicos totais (sacarose, 2,5  $\mu$ M de BAP e 2,5  $\mu$ M de ANA), flavonoides (glucose 2,5  $\mu$ M de BAP e 2,5  $\mu$ M de ANA), carotenoides (sacarose, 5  $\mu$ M de BAP e 2,5  $\mu$ M de ANA), clorofilas *a* (glucose 5  $\mu$ M de BAP e 2,5  $\mu$ M de ANA) e *b* (sacarose 2,5  $\mu$ M de BAP e 2,5  $\mu$ M de ANA; glucose 5  $\mu$ M de BAP e 2,5  $\mu$ M de ANA) e a maior porcentagem de inibição do radical livre DPPH (glucose 5  $\mu$ M de BAP e 5  $\mu$ M de ANA). Através da manipulação dos tipos de explantes, fontes de carbono (sacarose, glucose e frutose a 118 mM), glutamina (0 e 2,73 mM), em meio de cultura MS, suplementado com 0,2% de Phytigel e 2,5  $\mu$ M de BAP e 5  $\mu$ M de ANA, presença e ausência de luz foi possível estabelecer as condições para estimular a biossíntese de proteínas totais (sacarose, cotilédone, sem glutamina, luz), açúcares solúveis totais (sacarose, cotilédone, nó foliar, sem glutamina, luz), amido (sacarose, nó foliar, sem glutamina, luz), fenólicos totais (sacarose, cotilédone, com glutamina, luz), flavonoides totais (sacarose, cotilédone, com glutamina, luz; frutose, folha, sem glutamina, luz), carotenoides (frutose ou glucose, folha, com glutamina, luz), clorofila *a* (sacarose, cotilédone, com glutamina, luz; frutose, folha, cotilédone, sem glutamina, luz e glucose, folha, com glutamina luz); clorofila *b* (sacarose, cotilédone, com glutamina, luz; frutose, folha, sem glutamina luz; glucose, folha, com glutamina luz); porcentagens de inibição do radical livre DPPH• acima de 70% (sacarose, todos os explantes, com ou sem glutamina, luz ou escuro, exceto para explantes de nó cotiledonar (glutamina, luz), hipocótilo (glutamina, luz ou sem glutamina, escuro). As fontes de carbono, glutamina e concentrações de BAP e ANA influenciaram os perfis metabólicos dos calos determinados através de varredura em UV-vis. As fontes de carbono, tipos de explantes e glutamina influenciaram os tipos de carotenoides produzidos pelos calos, assim como as concentrações, sendo que a frutose estimulou o aparecimento de tipos de carotenoides como beta-criptoxantina e *trans*-beta-criptoxantina, que não foram produzidas com sacarose, ou que apareceram em poucos tratamentos com glucose, conforme evidenciado através da análise de carotenoides por CLAE. Os testes de coloração de AT-O, PAS e CBB indicaram respectivamente a reação metacromática na parede celular das células do calo, a presença de grânulos ortocromáticos, possivelmente indicando a presença de compostos fenólicos e reação positiva aos polissacarídeos neutros, evidenciando a presença de celulose. No citoplasma foram detectados poucos grãos de amido e a presença de organelas ricas em material protéico. Os resultados obtidos neste trabalho permitiram otimizar, para cada fonte de carbono, as condições

de cultura dos calos necessárias para estimular a produção de vários metabólitos. Os sistemas de culturas de células desenvolvidos viabilizarão os futuros estudos sobre a biossíntese, identificação e otimização da produção de compostos de interesse.

**Palavras-chave:** calos; fontes de carbono; reguladores de crescimento; tipos de explante; glutamina; presença e ausência de luz.

## ABSTRACT

*Cedrela fissilis* Velloso (Meliaceae) is a fast growing native tree from the Atlantic Forest economically important for its medicinal properties and for producing valuable hardwood. The objectives of this work were to study the effects of carbon sources (sucrose, glucose, fructose), glutamine, explant types (leaf node, leaf, epicotyl, cotyledonary node, cotyledon, hypocotyl, root), growth regulators (BAP and NAA), light and dark on the levels of total proteins, total soluble sugars, starch, total phenolics, flavonoids, carotenoids (content and types), chlorophylls a and b, metabolic profiles, antioxidant activity of *in vitro* cultured calluses, and to evaluate the morphology and histochemistry of callus originated from the different explants type cultured on glucose. Calluses were induced on Murashige and Skoog culture medium supplemented with 0,2% Phytigel from all types of explant tested (except from leaf explant cultured on 118 mM sucrose, 2,73 mM glutamine in the light), cultured on different carbon sources (sucrose, fructose, glucose), in all combinations of BAP and NAA concentration (2,5  $\mu\text{M}$  e 5  $\mu\text{M}$ ), in different glutamine concentration (0; 2,73 e 5,46  $\mu\text{M}$ ), either in light or in the dark. The manipulation of sucrose (59 mM e 118 mM) and glutamine concentration (0; 2,73 e 5,46 mM) in Murashige & Skoog, supplemented with 0,2% de Phytigel, 2,5  $\mu\text{M}$  BAP and 5  $\mu\text{M}$  NAA allowed the establishment of optimal callus culture condition for cotyledonary node which promoted the production of the highest levels of total proteins (59 mM sucrose and 5,46 mM glutamine), total soluble sugars (118 mM sucrose and 5,46 mM glutamine), starch (118 mM sucrose and 5,46 mM glutamine), total phenolics (118 mM sucrose and 2,73 mM de glutamine), flavonoids (118 mM sucrose and 2,73 mM glutamine), carotenoids (118 mM sucrose and 5,46 mM glutamine), chlorophylls a (59 mM sucrose and 5,46 mM de glutamine) e b (59 mM de sucrose and 5,46 mM glutamine, 118 mM sucrose and 2,73 mM glutamine) and highest percentage of DPPH free radical inhibition (118 mM sucrose and 2,73 mM de glutamine). The manipulation of carbon sources (118 mM sucrose, fructose, glucose) in combination with BAP and NAA (2,5  $\mu\text{M}$  e 5  $\mu\text{M}$ ), in MS culture medium supplemented with 0,2% de Phytigel and 2,73 mM glutamine optimized the biosynthesis of total proteins (sucrose, 5  $\mu\text{M}$  BAP and 5  $\mu\text{M}$  NAA; fructose 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP and 5  $\mu\text{M}$  NAA), total soluble sugars (sucrose, 2,5  $\mu\text{M}$  BAP and 2,5  $\mu\text{M}$  NAA), starch (sucrose, 2,5  $\mu\text{M}$  BAP and 2,5  $\mu\text{M}$  NAA), total phenolics (sucrose, 2,5  $\mu\text{M}$  BAP and 2,5  $\mu\text{M}$  NAA), flavonoids (glucose 2,5  $\mu\text{M}$  BAP and 2,5  $\mu\text{M}$  NAA), carotenoids (sucrose, 5  $\mu\text{M}$  BAP and 2,5  $\mu\text{M}$  NAA), chlorophylls a (glucose 5  $\mu\text{M}$  BAP and 2,5  $\mu\text{M}$  NAA) and b (sucrose, 2,5  $\mu\text{M}$  BAP and 2,5  $\mu\text{M}$  NAA; glucose 5  $\mu\text{M}$  BAP and 2,5  $\mu\text{M}$  NAA) and the highest percentage of DPPH free

radical inhibition (glucose 5  $\mu$ M BAP and 5  $\mu$ M NAA) in callus originated from cotyledonary nodes. The manipulation of explant types (leaf node, cotyledonary node, segments of epicotyl, leaf, cotyledon, hypocotyl, root), carbon source (118 mM sucrose, fructose, glucose), glutamine (0; 2,73 mM), light and dark promoted the biosynthesis of total proteins (sucrose, cotyledon, without glutamine, light), total soluble sugars (sucrose, cotyledon, leaf node, without glutamine, light), starch (sucrose, leaf node, without glutamine, light), total phenolics (sucrose, cotyledon, glutamine, light), flavonoids (sucrose, cotyledon, glutamine, light; fructose, leaf, without glutamine, light), carotenoids (fructose or glucose, leaf, glutamine, light), chlorophyll a (sucrose, cotyledon, glutamine, light; fructose, leaf, cotyledon, without glutamine, light; glucose, leaf, glutamine light); chlorophyll b (sucrose, cotyledon, glutamine, light; fructose, leaf, without glutamine, light; glucose, leaf, glutamine light); the percentage of DPPH free radical inhibition higher than 70% (sucrose, all explants types cultured either with or without glutamine, in light or dark, except for cotyledonary node (with glutamine, light), hypocotyls (with glutamine, light or without glutamine, dark). The carbon sources, glutamine, BAP and NAA influenced the calluses metabolic profiles determined through the UV-vis scanning. The carbon sources, explants types and glutamine affected the types and concentrations of carotenoids produced by calluses, fructose promoted the biosynthesis of carotenoids types as beta-cryptoxanthin and trans-beta-cryptoxanthin which were not produced with sucrose or were detected in a few treatments with glucose, as demonstrated by the HPLC analysis. The AT-O, PAS e CBB tests indicated, respectively, the metachromatic reaction in the callus cell wall, the presence of orthochromatic granules, possibly phenolics and positive reactions for neutral polysaccharides, as cellulose. Few starch grains and rich protein organelles were detected in the cytoplasm. The results obtained in this study showed that optimal callus culture conditions were established, through the manipulation of carbon sources, explant type, glutamine, light and dark, which increased the production of a range of metabolites of interest and could foster further investigation on biosynthesis, identification and optimization of the production of important compounds by the cell culture systems developed.

**Keywords:** Callus; carbon sources; growth regulators; explant types; glutamine; presence and absence of light.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Aspecto geral de uma ramificação de *Cedrela fissilis* :Em destaque, o fruto imaturo da espécie (Fonte: URBANETZ *et al.*, 2010).....6
- Figura 2:** Diferentes morfologias de calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de segmentos nodais cotiledonares e segmentos de epicótilo cultivados durante 8 semanas em meio de cultura MS semi-sólido, suplementados com 2,5 µM de BAP e 5,0 µM de ANA. A) Amostra 1: calos de epicótilo crescidos em meio de cultura contendo 118 mM de sacarose; B) Amostra 2: calos de nó cotiledonar crescidos em meio de cultura contendo 118 mM de sacarose, 2,73 mM de glutamina; C) Amostra 3: calos de nó cotiledonar crescidos em meio de cultura contendo 118 mM de sacarose e na ausência de luz; D) Amostra 4: calos de nó cotiledonar crescidos em meio de cultura contendo 118 mM de sacarose, 2,73 mM de glutamina e na ausência de luz.....11
- Figura 3:** Ciclização do licopeno à  $\alpha$  e  $\beta$ - caroteno e formação das xantofilas a partir do  $\alpha$  e  $\beta$ - caroteno (RAMLOV, 2010 adaptado de RÖMER *et al.*, 2002).....15
- Figura 4:** Via de biossíntese de compostos fenólicos (RAMLOV, 2010 adaptado de VERMERRIS & NICHOLSON, 2008).....17
- Figura 5:** Exemplos de estruturas químicas representativas das classes de compostos fenólicos (RAMLOV, 2010 adaptado de SHAHIDI & NACZK, 2006).....18
- Figura 6:** A) Plântula de *C. fissilis* com 8 semanas de idade. A localização dos explantes está indicada pelas letras: a) ápice; b) folha; c) cotilédone; d) nó cotiledonar; e) hipocótilo; f) raiz. B) Detalhe dos explantes: a) folha; b) cotilédone. C) Detalhe dos explantes: a) segmento foliar; b) segmento cotiledonar; c) segmento de hipocótilo; d) segmento de raiz; e) segmento apical; f) segmento nodal

cotiledonar	(PILATTI,
2011).....	23

**Figura 7:** Espectrofotometria de varredura em UV-Vis de extratos metanólicos de calos de *C. fissilis* iniciados a partir de segmentos de nó cotiledonar cultivados em meio de cultura MS, semi-sólido, suplementado com 59 e/ou 118 mM de sacarose, 0; 2,73 e/ou 5,46 mM de glutamina 2,5 µM de BAP e 5 µM de ANA.....85

**Figura 8:** Espectrofotometria de varredura em UV-Vis de extratos metanólicos de calos de *C. fissilis* iniciados a partir de segmentos de nó cotiledonar cultivados em meio de cultura MS, semi-sólido, suplementado com 118 mM de sacarose, frutose e/ou glucose, 2,5 e/ou 5,0 µM de BAP e 2,5 e/ou 5,0 µM de ANA.....86

**Figura 9:** Espectrofotometria de varredura em UV-Vis de extratos metanólicos de calos de *C. fissilis* iniciados a partir de segmentos de cotilédone, nó foliar e folha cultivados em meio de cultura MS, semi-sólido, suplementado com 118 mM de sacarose, 0 ou 2,73 mM de glutamina 2,5 µM de BAP e 5 µM de ANA, de calos iniciados a partir de segmentos de folha cultivados em meio de cultura MS, semi-sólido, suplementado com 118 mM de frutose, 0 ou 2,73 mM de glutamina 2,5 µM de BAP e 5 µM de ANA, e de calos iniciados a partir de cotilédone e folha cultivados em meio de cultura MS, semi-sólido, suplementado com 118 mM de frutose, 2,73 mM de glutamina 2,5 µM de BAP e 5 µM de ANA.....88

**Figura 10:** Exemplo do perfil cromatográfico de carotenoides (450 nm) do extrato organossolvente de calos de *Cedrela fissilis* provenientes de epicótilo cultivados em meio MS suplementado com 118 mM de glucose.....96

**Figura 11:** Diferentes morfologias de calos de *Cedrela fissilis* crescidas na presença ou ausência de luz cultivados durante 8 semanas em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de glucose, 2,73 mM de glutamina, 2,5



$\mu\text{M}$  de BAP e  $5 \mu\text{M}$  de ANA. A: Calos oriundos de raiz, na luz; B: Calos oriundos de hipocótilo, na luz; C: Calos oriundos de nó cotiledonar, na luz; D: Calos oriundos de folha, na luz; E: Calos oriundos de epicótilo, na luz; F: Calos oriundos de nó foliar, na luz; G: Calos oriundos de cotilédone, na luz; H: Calos oriundos de raiz, no escuro; I: Calos oriundos de hipocótilo, no escuro; J: Calos oriundos de nó cotiledonar, no escuro; K: Calos oriundos de folha, no escuro; L: Calos oriundos de epicótilo, no escuro; M: Calos oriundos de nó foliar, no escuro; N: Calos oriundos de cotilédone, no escuro.....108

**Figura 12:** Secções transversais de estruturas de calos de *Cedrela fissilis* crescidas na presença ou ausência de luz em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de glucose, 2,73 mM de glutamina, 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA. Após 8 semanas de cultivo, submetidos ao teste histoquímico Azul de Toluidina. Note a reação metacromática nas paredes celulares e grânulos ortocromáticos (em azul). A: Calos oriundos de raiz, na luz; B: Calos oriundos de hipocótilo, na luz; C: Calos oriundos de nó cotiledonar, na luz; D: Calos oriundos de folha, na luz; E: Calos oriundos de epicótilo, na luz; F: Calos oriundos de nó foliar, na luz; G: Calos oriundos de cotilédone, na luz; H: Calos oriundos de raiz, no escuro; I: Calos oriundos de hipocótilo, no escuro; J: Calos oriundos de nó cotiledonar, no escuro; K: Calos oriundos de folha, no escuro; L: Calos oriundos de epicótilo, no escuro; M: Calos oriundos de nó foliar, no escuro; N: Calos oriundos de cotilédone, no escuro.....109

**Figura 13:** Secções transversais de estruturas de calos de *Cedrela fissilis* crescidas na presença ou ausência de luz em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de glucose, 2,73 mM de glutamina, 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA. Após 8 semanas de cultivo, submetidos ao teste histoquímico de PAS + CBB. Observe a reação nas paredes celulares, a presença de grãos de amido (em rosa) e estruturas celulares ricas em material proteico (em azul). A: Calos oriundos de raiz, na luz; B: Calos oriundos de hipocótilo, na luz; C: Calos oriundos de nó cotiledonar, na luz; D: Calos oriundos de folha, na luz; E: Calos oriundos de epicótilo, na luz; F: Calos oriundos de nó foliar, na luz; G: Calos oriundos de cotilédone, na luz; H: Calos oriundos de raiz, no escuro; I: Calos oriundos de hipocótilo, no escuro; J: Calos oriundos de nó

cotiledonar, no escuro; K: Calos oriundos de folha, no escuro; L: Calos oriundos de epicótilo, no escuro; M: Calos oriundos de nó foliar, no escuro; N: Calos oriundos de cotilédone, no escuro.....110

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Efeito de concentrações de sacarose e glutamina sobre a indução e morfogênese de calos de *Cedrela fissilis* cultivados, durante 8 semanas, a partir de nós cotiledonares em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA.....36

**Tabela 2:** Efeito de fontes de carbono e de combinações de BAP e ANA sobre a indução e morfogênese de calos de *Cedrela fissilis* cultivados, durante 8 semanas, a partir de nós cotiledonares em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 2,73 mM de glutamina.....37

**Tabela 3:** Efeito da sacarose, luz, escuro, tipo de explante e glutamina sobre a indução e morfogênese de calos de *Cedrela fissilis* cultivados durante 8 semanas em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de sacarose, 0 ou 2,73 mM de glutamina, 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA.....39

**Tabela 4:** Efeito da frutose, luz, escuro, tipo de explante e glutamina sobre a indução e morfogênese de calos de *Cedrela fissilis* cultivados durante 8 semanas em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de sacarose, 0 ou 2,73 mM de glutamina, 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA.....41

**Tabela 5:** Efeito da glicose, luz, escuro, tipo de explante e glutamina sobre a indução e morfogênese de calos de *Cedrela fissilis* cultivados durante 8 semanas em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de sacarose, 0 ou 2,73 mM de glutamina, 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA.....43

**Tabela 6:** Efeito de concentrações de sacarose e glutamina sobre o conteúdo de proteínas totais, açúcares solúveis totais e amido de calos de *Cedrela fissilis* cultivados, durante 8 semanas, a partir de

nós cotiledonares em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA. Em negrito os melhores tratamentos.....45

**Tabela 7:** Efeito de fontes de carbono e de combinações de BAP e ANA sobre conteúdo de proteínas totais, açúcares solúveis totais e amido de calos de *Cedrela fissilis* cultivados, durante 8 semanas, a partir de nós cotiledonares em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de sacarose, frutose ou glucose e 2,73 mM de glutamina. Em negrito os melhores tratamentos.....46

**Tabela 8:** Efeito da sacarose, luz, escuro, tipo de explante e glutamina sobre a concentração de proteínas totais, açúcares solúveis totais e amido de calos de *Cedrela fissilis* cultivados durante 8 semanas em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de sacarose, 0 ou 2,73 mM de glutamina, 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA. Em negrito os melhores tratamentos.....48

**Tabela 9:** Efeito da frutose, luz, escuro, tipo de explante e glutamina sobre a concentração de proteínas totais, açúcares solúveis totais e amido de calos de *Cedrela fissilis* cultivados durante 8 semanas em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de frutose, 0 ou 2,73 mM de glutamina, 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA. Em negrito os melhores tratamentos.....51

**Tabela 10:** Efeito da glucose, luz, escuro, tipo de explante e glutamina sobre a concentração de proteínas totais, açúcares solúveis totais e amido de calos de *Cedrela fissilis* cultivados durante 8 semanas em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de frutose, 0 ou 2,73 mM de glutamina, 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA. Em negrito os melhores tratamentos.....54

**Tabela 11:** Compilação dos melhores tratamentos (tipo de

explante, presença/ausência de glutamina, presença/ausência de luz) que produziram as maiores concentrações de proteínas totais, açúcares solúveis totais e amido em calos de *Cedrela fissilis* cultivados durante 8 semanas, em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de sacarose, glucose ou frutose, 0 ou 2,73 mM de glutamina, 2,5 µM de BAP e 5 µM de ANA..... 57

**Tabela 12:** Compilação dos maiores valores de concentração de proteínas totais, açúcares solúveis totais e amido em calos de *Cedrela fissilis* cultivados durante 8 semanas, em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de sacarose, glucose ou frutose, 0 ou 2,73 mM de glutamina, 2,5 µM de BAP e 5 µM de ANA.....58

**Tabela 13:** Efeito de concentrações de sacarose e glutamina sobre o conteúdo de fenólicos totais, flavonoides totais e carotenoides de calos de *Cedrela fissilis* cultivados, durante 8 semanas, a partir de nós cotiledonares em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 2,5 µM de BAP e 5 µM de ANA. Em negrito os melhores tratamentos. Em negrito os melhores tratamentos.....59

**Tabela 14:** Efeito de concentrações de sacarose e glutamina sobre os conteúdos de clorofilas *a* e *b* de calos de *Cedrela fissilis* cultivados, durante 8 semanas, a partir de nós cotiledonares em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 2,5 µM de BAP e 5 µM de ANA. Em negrito os melhores tratamentos.....60

**Tabela 15:** Concentrações de sacarose e de glutamina que produziram as maiores concentrações de fenólicos totais, flavonoides totais e carotenoides em calos de *Cedrela fissilis* cultivados durante 8 semanas, a partir de nós cotiledonares em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 2,5 µM de BAP e 5 µM de ANA. Em negrito os melhores tratamentos.....61

**Tabela 16:** Efeito de fontes de carbono e de combinações de BAP e ANA sobre o conteúdo de fenólicos totais, flavonoides totais e carotenoides de calos de *Cedrela fissilis* cultivados, durante 8

semanas, a partir de nós cotiledonares em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de sacarose, frutose ou glucose e 2,73 mM de glutamina. Em negrito os melhores tratamentos.....62

**Tabela 17:** Efeito de fontes de carbono e de combinações de BAP e ANA sobre os conteúdos de clorofilas *a* e *b* de calos de *Cedrela fissilis* cultivados, durante 8 semanas, a partir de nós cotiledonares em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de sacarose, frutose ou glucose e 2,73 mM de glutamina. Em negrito os melhores tratamentos.....63

**Tabela 18:** Concentrações de BAP e ANA que produziram as maiores concentrações de fenólicos totais, flavonoides totais e carotenoides em calos de *Cedrela fissilis* cultivados, durante 8 semanas, a partir de nós cotiledonares em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de sacarose, frutose ou glucose e 2,73 mM de glutamina.....64

**Tabela 19:** Efeito da sacarose, luz, escuro, tipo de explante e glutamina sobre a concentração de fenólicos totais, flavonoides totais e carotenoides de calos de *Cedrela fissilis* cultivados durante 8 semanas em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de sacarose, 0 ou 2,73 mM de glutamina, 2,5 µM de BAP e 5 µM de ANA. Em negrito os melhores tratamentos.....66

**Tabela 20:** Efeito da sacarose, tipo de explante e glutamina sobre os conteúdos de clorofilas *a* e *b* de calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de diferentes tipos de explantes cultivados na luz, durante 8 semanas, em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de sacarose, 0 ou 2,73 mM de glutamina, 2,5 µM de BAP e 5 µM de ANA.....70

**Tabela 21:** Efeito da frutose, luz, escuro, tipo de explante e glutamina sobre a concentração de fenólicos totais, flavonoides totais e carotenoides de calos de *Cedrela fissilis* cultivados durante 8 semanas em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-

sólido, suplementado com 118 mM de frutose, 0 ou 2,73 mM de glutamina, 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA.....72

**Tabela 22:** Efeito da frutose, tipo de explante e glutamina sobre os conteúdos de clorofilas *a* e *b* de calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de diferentes tipos de explantes cultivados na luz, durante 8 semanas, em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de frutose, 0 ou 2,73 mM de glutamina, 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA.....75

**Tabela 23:** Efeito da glicose, luz, escuro, tipo de explante e glutamina sobre a concentração de fenólicos totais, flavonoides totais e carotenoides de calos de *Cedrela fissilis* cultivados durante 8 semanas em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de glicose, 0 ou 2,73 mM de glutamina, 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA.....77

**Tabela 24:** Efeito da glicose, tipo de explante e glutamina sobre os conteúdos de clorofilas *a* e *b* de calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de diferentes tipos de explantes cultivados na luz, durante 8 semanas, em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de glicose, 0 ou 2,73 mM de glutamina, 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA.....79

**Tabela 25:** Compilação dos melhores tratamentos (tipo de explante, presença/ausência de glutamina, presença/ausência de luz) que produziram as maiores concentrações de fenólicos totais, flavonoides totais e carotenoides em calos de *Cedrela fissilis* cultivados durante 8 semanas, em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de sacarose, glicose ou frutose, 0 ou 2,73 mM de glutamina, 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA.....81

**Tabela 26:** Compilação dos melhores tratamentos (tipo de explante, presença/ausência de glutamina, presença/ausência de luz) que produziram as maiores concentrações de clorofilas *a* e *b*

em calos de *Cedrela fissilis* cultivados com cultivados durante 8 semanas, em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de sacarose, glucose ou frutose, 0 ou 2,73 mM de glutamina, 2,5 µM de BAP e 5 µM de ANA.....82

**Tabela 27:** Compilação dos maiores valores de concentração de fenólicos totais, flavonoides totais e carotenoides em calos de *Cedrela fissilis* cultivados durante 8 semanas, em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de sacarose, glucose ou frutose, 0 ou 2,73 mM de glutamina, 2,5 µM de BAP e 5 µM de ANA.....83

**Tabela 28:** Compilação dos maiores valores de concentração de clorofilas *a* e *b* em calos de *Cedrela fissilis* cultivados durante 8 semanas, em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de sacarose, glucose ou frutose, 0 ou 2,73 mM de glutamina, 2,5 µM de BAP e 5 µM de ANA.....84

**Tabela 29:** Efeito de sacarose, glutamina e tipos de explante sobre a concentração dos carotenoides (µg/g massa seca), determinada por CLAE para o extrato organossolvente (hexano:acetona:BHT), de calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de diferentes tipos de explantes cultivados na presença de luz, durante 8 semanas, em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de sacarose, 0 ou 2,73 mM de glutamina, 2,5 µM de BAP e 5 µM de ANA.....90

**Tabela 30:** Efeito de frutose, glutamina e tipos de explante sobre a concentração dos carotenoides (µg/g massa seca), determinada por CLAE para o extrato organossolvente (hexano: acetona: BHT), de calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de diferentes tipos de explantes cultivados na presença de luz, durante 8 semanas, em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de frutose, 0 ou 2,73 mM de glutamina, 2,5 µM de BAP e 5 µM de ANA.....92



**Tabela 31:** Efeito de glucose, glutamina e tipos de explante sobre a concentração dos carotenoides ( $\mu\text{g/g}$  massa seca), determinada por CLAE para o extrato organossolvente (hexano:acetona:BHT), de calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de diferentes tipos de explantes cultivados na presença de luz, durante 8 semanas, em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de glucose, 0 ou 2,73 mM de glutamina, 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA.....95

**Tabela 32:** Efeito de concentrações de sacarose e glutamina sobre a porcentagem de inibição do radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) de calos de *Cedrela fissilis* cultivados, durante 8 semanas, a partir de nós cotiledonares em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA.....97

**Tabela 33:** Efeito de fontes de carbono e de combinações de BAP e ANA sobre a porcentagem de inibição do radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) de calos de *Cedrela fissilis* cultivados, durante 8 semanas, a partir de nós cotiledonares em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de sacarose, frutose ou glucose e 2,73 mM de glutamina.....98

**Tabela 34:** Efeito da sacarose, luz, escuro, tipo de explante e glutamina sobre a porcentagem de inibição do radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) de calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de diferentes tipos de explantes cultivados durante 8 semanas em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de sacarose, 0 ou 2,73 mM de glutamina, 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA.....100

**Tabela 35:** Efeito da frutose, luz, escuro, tipo de explante e glutamina sobre a porcentagem de inibição do radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) de calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de diferentes tipos de explantes cultivados durante 8 semanas em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de frutose, 0 ou 2,73 mM de

glutamina, 2,5  $\mu$ M de BAP e 5  $\mu$ M de ANA.....102

**Tabela 36:** Efeito da glucose, luz, escuro, tipo de explante e glutamina sobre a porcentagem de inibição do radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) de calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de diferentes tipos de explantes cultivados durante 8 semanas em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de glucose, 0 ou 2,73 mM de glutamina, 2,5  $\mu$ M de BAP e 5  $\mu$ M de ANA.....104

**Tabela 37:** Compilação dos melhores tratamentos (tipo de explante, presença/ausência de glutamina, presença/ausência de luz) que produziram as maiores porcentagens de inibição do radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) de extratos de calos de *Cedrela fissilis* cultivados durante 8 semanas, em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de sacarose, glucose ou frutose, 0 ou 2,73 mM de glutamina, 2,5  $\mu$ M de BAP e 5  $\mu$ M de ANA.....106

## LISTA DE ABREVIATURAS

AIA	– Ácido indolil-3-acético
ANA	– Ácido $\alpha$ -naftalenoacético
AT-O	– Azul de toluidina
BAP	– 6-Benzilaminopurina
$\beta$ - car ( <i>cis</i> )	– cis- $\beta$ -caroteno
$\beta$ - car ( <i>trans</i> )	– trans- $\beta$ -caroteno
$\beta$ -Cr	– $\beta$ -criptoxantina
BHT	– Butil-hidroxi-tolueno
BSA	–Soro albumina bovina
CBB	– Azul brilhante de Coomassie
CG-EM	– Cromatografia Gasosa de Alta Resolução acoplada à Espectrometria de Massa
CLAE	- Cromatografia líquida de Alta eficiência
CIN	– cinetina (6-furfurilaminopurina)
DAP	– diâmetro à altura do peito
DMSO	– Dimetilsulfóxido
DPPH	– 1,1-difenil-2-picrilhidrazil
FT- IR	– Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
HCl	–Ácido clorídrico
MeOH 80%	– Metanol 80%
MS	– Meio de cultura Murashige & Skoog
NaOH	– Hidróxido de sódio
PAS	– Ácido Periódico de Schiff
PIC	– Picloram (ácido 4-amino 3,5,6 tricloro-2- piridinacarboxílico)
pH	– Potencial hidrogeniônico
PVP	– polivinilpirrolidona
SH	– meio de cultura Schenk & Hildebrandt
TDZ	– Thidiazuron (N-fenil-N'-1,2,3-thiadiazol-5- feniluréia)
UV-vis	– Espectrofotometria de absorção molecular no ultravioleta/visível
W	– meio de cultura White
WPM	– Woody Plant Medium
$\mu$ g/g MS	– Micrograma por grama de massa seca

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	x
<b>ABSTRACT</b> .....	xiii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xv
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xix
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	xxvii
<b>SUMÁRIO</b> .....	xxviii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	3
2.1. OBJETIVO GERAL .....	3
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	3
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	4
3.1 A FAMÍLIA MELIACEAE, COM ÊNFASE EM <i>Cedrela fissilis</i> VELL. ....	4
3.2 <i>Cedrela fissilis</i> : IMPORTÂNCIA ECONÔMICA, MEDICINAL E INDUSTRIAL .....	6
3.3 CULTURAS DE CÉLULAS E TECIDOS VEGETAIS IN VITRO E PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS .....	8
3.4 METABÓLITOS PRIMÁRIOS E SECUNDÁRIOS .....	13
<b>3.4.1 Metabólitos primários</b> .....	13
<b>3.4.2 Metabólitos secundários</b> .....	14
3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA FITOQUÍMICA .....	19
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	21
4.1. MATERIAL VEGETAL .....	21
4.2. DESINFECÇÃO DAS SEMENTES .....	21
4.3. PREPARAÇÃO DO MEIO DE CULTURA .....	21
4.4. ESTABELECIMENTO DE PLÂNTULAS E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO DAS CULTURAS .....	21
4.5 INDUÇÃO E MORFOGÊNESE DE CALOS DE <i>C. fissilis</i> EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTURA .....	22
4.6 ANÁLISES QUANTITATIVAS DE PROTEÍNAS TOTAIS, AÇÚCARES SOLÚVEIS TOTAIS E AMIDO EM CALOS DE <i>Cedrela fissilis</i> .....	23
<b>4.6.1 Efeito de diferentes concentrações de sacarose e de glutamina em relação ao conteúdo de metabólitos primários e secundários de calos de <i>Cedrela fissilis</i></b> .....	23

4.6.2	Efeito de diferentes fontes de carbono e das concentrações de BAP e ANA em relação ao conteúdo de metabólitos primários e secundários de calos de <i>Cedrela fissilis</i> .....	24
4.6.3	Efeito de diferentes explantes, fontes de carbono, presença e ausência de luz e da glutamina sobre o crescimento e acúmulo de metabólitos primários e secundários em calos de <i>Cedrela fissilis</i> .....	24
4.6.4	Preparo das amostras e relação massa fresca/ massa seca .....	25
4.7	ANÁLISES QUANTITATIVAS DE FENÓLICOS TOTAIS, FLAVONOIDES TOTAIS, CAROTENOIDES E CLOROFILA EM CALOS DE <i>Cedrela fissilis</i> .....	26
4.7.1	Compostos fenólicos totais.....	26
4.7.2	Flavonoides .....	27
4.7.3	Carotenoides.....	27
4.7.4	Dosagem de Clorofilas .....	28
4.8	PERFIL METABÓLICO POR ESPECTROFOTOMETRIA DE VARREDURA UV-VIS DE CALOS DE <i>C. fissilis</i> .....	28
4.8.1	Efeito de diferentes combinações de concentrações de sacarose e de glutamina sobre os perfis metabólicos de extratos de calos de <i>Cedrela fissilis</i> .....	28
4.8.2	Efeito de diferentes fontes de carbono e de combinações de concentrações de BAP e ANA sobre os perfis metabólicos de extratos de calos de <i>Cedrela fissilis</i> .....	29
4.8.3	Efeito de fontes de carbono, tipos de explantes, glutamina e presença e ausência de luz sobre os perfis metabólicos de extratos de calos de <i>Cedrela fissilis</i> .....	29
4.9	ANÁLISES QUALITATIVAS POR CLAE DE CAROTENOIDES DE CALOS DE <i>Cedrela fissilis</i> .....	30
5.	ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE CALOS DE <i>Cedrela fissilis</i> .....	31
5.1	INIBIÇÃO DO RADICAL DPPH (1,1-DIFENIL-2-PICRILHIDRAZIL) .....	31
5.2	ANÁLISES HISTOQUÍMICA DE CALOS DE <i>Cedrela fissilis</i> .....	31
5.2.1	Análise em microscopia de luz (ML) .....	32
6.	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	33
7.	RESULTADOS.....	34
7.1	INDUÇÃO E MORFOGÊNESE DE CALOS DE <i>C. fissilis</i> EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTURA .....	35

7.1.1. Efeito de diferentes combinações de concentrações de sacarose e de glutamina sobre a indução de calos originados a partir de nós cotiledonares de plântulas de <i>Cedrela fissilis</i> ....	35
7.1.2. Efeito de diferentes fontes de carbono e de combinações de concentrações de BAP e ANA sobre a indução de calos originados a partir de nós cotiledonares de plântulas <i>Cedrela fissilis</i> .....	36
7.1.3. Efeito de fontes de carbono, tipos de explantes, glutamina e presença e ausência de luz sobre a indução de calos de <i>Cedrela fissilis</i> .....	37
7.2 ANÁLISES QUANTITATIVAS DE PROTEÍNAS TOTAIS, AÇÚCARES SOLÚVEIS TOTAIS E AMIDO EM CALOS DE <i>Cedrela fissilis</i> .....	44
7.2.1. Efeito de diferentes combinações de concentrações de sacarose e de glutamina sobre os teores de proteínas totais, açúcares solúveis totais e amido em calos de <i>Cedrela fissilis</i> ..	44
7.2.2 Efeito de diferentes fontes de carbono e de combinações de concentrações de BAP e ANA sobre os teores de proteínas totais, açúcares solúveis totais e amido em calos de <i>Cedrela fissilis</i> .....	45
7.2.3. Efeito de fontes de carbono, tipos de explantes, glutamina e presença e ausência de luz sobre os teores de proteínas totais, açúcares solúveis totais e amido em calos de <i>Cedrela fissilis</i> ..	47
7.3 ANÁLISES QUANTITATIVAS DE FENÓLICOS TOTAIS, FLAVONOIDES TOTAIS, CAROTENOIDES E CLOROFILA EM CALOS DE <i>Cedrela fissilis</i> .....	58
7.3.1. Efeito de diferentes combinações de concentrações de sacarose e de glutamina sobre os teores de fenólicos totais, flavonoides, carotenoides e clorofilas <i>a</i> e <i>b</i> de calos de <i>Cedrela fissilis</i> .....	58
7.3.2. Efeito de diferentes fontes de carbono e de combinações de concentrações de BAP e ANA sobre os teores de fenólicos totais, flavonoides, carotenoides e clorofilas <i>a</i> e <i>b</i> de calos de <i>Cedrela fissilis</i> .....	61
7.3.3 Efeito de fontes de carbono, tipos de explantes, glutamina e presença e ausência de luz sobre os teores de fenólicos totais, flavonoides, carotenoides e clorofilas <i>a</i> e <i>b</i> em calos de <i>Cedrela fissilis</i> .....	64
7.4 PERFIL METABÓLICO POR ESPECTROFOTOMETRIA DE VARREDURA UV-VIS DE CALOS DE <i>C. FISSILIS</i> .....	84

7.4.1. Efeito de diferentes combinações de concentrações de sacarose e de glutamina sobre os perfis metabólicos de extratos de calos de <i>Cedrela fissilis</i> .....	84
7.4.2. Efeito de diferentes fontes de carbono e de combinações de concentrações de BAP e ANA sobre os perfis metabólicos de extratos de calos de <i>Cedrela fissilis</i> .....	85
7.4.3. Efeito de fontes de carbono, tipos de explantes, glutamina e presença e ausência de luz sobre os perfis metabólicos de extratos de calos de <i>Cedrela fissilis</i> .....	86
7.5 ANÁLISES QUALITATIVAS POR CLAE DE CAROTENOIDES DE CALOS DE <i>Cedrela fissilis</i> .....	88
7.5.1. Detecção de carotenoides por CLAE de calos de <i>Cedrela fissilis</i> cultivados com sacarose .....	89
7.5.2. Detecção de carotenoides por CLAE de calos de <i>Cedrela fissilis</i> cultivados com frutose .....	91
7.5.3. Detecção de carotenoides por CLAE de calos de <i>Cedrela fissilis</i> cultivados com glucose .....	93
7.6 ANÁLISES DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE CALOS DE <i>Cedrela fissilis</i> .....	96
7.6.1 Efeito de diferentes combinações de concentrações de sacarose e de glutamina sobre os teores de proteínas totais, açúcares solúveis totais e amido em calos de <i>Cedrela fissilis</i> ..	96
7.6.2 Efeito de diferentes fontes de carbono e de combinações de concentrações de BAP e ANA sobre os teores de proteínas totais, açúcares solúveis totais e amido em calos de <i>Cedrela fissilis</i> .....	97
7.6.3 Efeito de fontes de carbono, tipos de explantes, glutamina e presença e ausência de luz sobre os teores de proteínas totais, açúcares solúveis totais e amido em calos de <i>Cedrela fissilis</i> ..	99
7.7 ANÁLISES HISTOQUÍMICA DE CALOS DE <i>CECRELA FISSILIS</i> .....	106
7.7.1 Teste histoquímico do azul de toluidina (AT-O) .....	106
7.7.2 Teste histoquímico do PAS e Coumassie Brilliant Blue (CBB).....	109
8. DISCUSSÃO .....	111
9. CONCLUSÕES .....	142
10. REFERÊNCIAS .....	144





## 1. INTRODUÇÃO

*Cedrela fissilis* (Meliaceae) é uma espécie arbórea, nativa da Mata Atlântica, que ocorre no Brasil desde Minas Gerais até o Rio Grande do Sul, sendo também encontrada no Norte da Argentina, ao Panamá e Costa Rica, onde vêm sendo dizimada pela exploração extrativista e pela demanda de mercado por madeiras nobres. Destaca-se, também, pelo seu valor medicinal, ecológico e por possuir potencialidades de exploração biotecnológica (TISSERAT *et al.*, 1979; CARVALHO, 1994; MUELLNER *et al.*, 2003; SOUZA & LORENZI, 2005). É utilizada na medicina popular e apresenta atividade antiviral, anti-helmíntica, antirreumática, anti-inflamatória e anticancerígena (LORENZI, 1998; MARZALINA & KRISHNAPILLAY, 1999).

A família Meliaceae é caracterizada pela grande produção de limonóides. Estudos realizados com raízes de *C. fissilis* identificaram um limonóide, 3- $\beta$ -acetoxicarapina, que é provavelmente, o maior representante da classe dos terpenos, juntamente com os triterpenos: ácido oleanólico e ácido oleanônico, que apresentaram atividade inseticida contra as formigas cortadeiras *Atta sexdens rubropilosa* (LEITE *et al.*, 2005). Segundo Lago *et al.*, (2004), dos extratos de folhas de *C. fissilis* foram extraídos óleos voláteis por cromatografia gasosa (CG-EM), que continham em sua composição o  $\beta$ -longipineno e biciclogermacreno, que foram capazes de inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Outro estudo evidenciou que o extrato de folhas e raízes desta espécie apresentou atividade antimicobacteriana contra *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium kansasii* (RAMOS *et al.*, 2008).

Nas últimas décadas, a cultura de tecidos e células vegetais *in vitro*, em grande escala, vêm sendo empregada para a produção de metabólitos secundários de interesse e estudos realizados com diferentes espécies, têm demonstrado que vários fatores influenciam a produção de metabólitos secundários por culturas *in vitro*, como os fatores biológicos (tipos e condição fisiológica dos explantes, características genéticas), fatores químicos (composição salina do meio de cultura, fontes de carbono, fontes de nitrogênio, pH, composição, reguladores de crescimento) e fatores físicos (temperatura, luminosidade, fotoperíodo) (ANDRADE, 1998). Assim sendo, viabilizar a produção de compostos de importância medicinal das espécies arbóreas brasileiras, como *C. fissilis*, por culturas *in vitro* de células, é uma abordagem que

minimizará a exploração extrativista *in situ*, contribuirá para a conservação.

Em geral, poucos estudos têm sido realizados em relação à cultura *in vitro* visando à produção de metabólitos secundários e a conservação das espécies de árvores nativas brasileiras (VIANA *et al.*, 1999; NUNES *et al.*, 2003). Sistemas de cultura *in vitro* de *Cedrela fissilis* foram desenvolvidos visando a micropropagação (NUNES *et al.*, 2007), conservação *in vitro* (NUNES *et al.*, 2002) e a otimização da produção de calos (NUNES *et al.*, 2001; LAUDANO, 2005; PILATTI, 2011).

Entre os estudos realizados, visando o potencial da produção de metabólitos secundários em Meliáceas, destaca-se o trabalho de Wewetzer (1998), que identificou o teor de azadiractina, um limonóide com capacidade inseticida, através da cultura de calos derivados de linhagens celulares de *Azadirachta indica*. Laudano (2005) analisou os compostos voláteis de calos de *C. fissilis* cultivados *in vitro*, em diferentes condições de cultura e observou diferenças na composição fitoquímica destas culturas. Observou ainda, que os compostos obtidos a partir destas culturas eram diferentes dos produzidos pelas plantas. Em um estudo posterior, realizado por Pilatti (2011), a espectroscopia por FTIR permitiu comparar, de forma preliminar, o perfil metabólico primário e secundário de calos de *C. fissilis* crescidos em diferentes condições de cultivo, evidenciando diferenças quali-quantitativas a nível molecular, determinadas pela variação nas fontes de carbono e presença de glutamina.

Portanto, os sistemas de culturas de calos desenvolvidos para *C. fissilis* têm demonstrado grande potencial a ser explorado e justificam a necessidade da realização de estudos complementares, que permitam a compreensão de como variam os metabolismos primários e secundários de células cultivadas *in vitro* sob diferentes condições de cultivo. Esses estudos são fundamentais para viabilizar a utilização dos sistemas de cultura *in vitro* como ferramentas para a realização de estudos sobre a regulação da biossíntese, o isolamento e a otimização da produção de eventuais compostos biologicamente ativos, sintetizados *in vitro*.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo descrever os efeitos de diferentes condições de cultivo *in vitro* sobre os perfis metabólicos, conteúdos de metabólitos primários, secundários, atividade antioxidante e morfologia de calos de *Cedrela fissilis*, com o intuito de avaliar o potencial de aplicação de estratégias biotecnológicas para a produção de compostos de interesse, através de culturas de células.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1. Avaliar, em calos de *Cedrela fissilis*, os efeitos de fontes de carbono (sacarose, glicose, frutose), glutamina, tipos de explantes, reguladores de crescimento (BAP e ANA) e presença e ausência de luz sobre:

- os conteúdos de proteínas totais, açúcares solúveis totais e amido;
- os conteúdos de compostos fenólicos totais, flavonoides, carotenoides e clorofilas *a* e *b*;
- os perfis metabólicos dos calos, através de espectrofotometria de varredura em UV-vis;
- os níveis de atividade antioxidante, através de inibição do radical livre DPPH•;

2.2.2 Verificar, em calos de *Cedrela fissilis*, os efeitos de fontes de carbono, tipos de explantes, presença e ausência de glutamina sobre os tipos e conteúdos de carotenoides, através de análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

2.2.3 Detectar os efeitos de glicose e tipos de explante sobre a morfologia e histoquímica de calos de *Cedrela fissilis*

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 A FAMÍLIA MELIACEAE, COM ÊNFASE EM *Cedrela fissilis* VELL.

Os mais altos níveis de diversidade de plantas no mundo se encontram nos biomas brasileiros, dentre eles se destacam a Amazônia, Mata Atlântica, Cerrado, Caatinga, Pantanal e Pampa. O uso contínuo de práticas de uso não-sustentável, desmatamento e uso da terra, acabam por fragmentar a vegetação nativa, promovendo principalmente a extinção de espécies arbóreas, além de causar perdas significativas na natureza (PILATTI *et al.*, 2010).

Os biomas que apresentam maior grau de conservação, com 82 – 83% de suas áreas são a Amazônia e o Pantanal, seguidos pelo Cerrado, Caatinga, e Pampas com 41 – 45% de remanescentes conservados. Já o bioma da Mata Atlântica apresenta 7,26% de sua área original (VIANA *et al.*, 1999), mas, por possuir a maior biodiversidade no Planeta, a Mata Atlântica apresenta a maior variedade de madeira, com árvores medindo até 50 m de altura, sendo 50% endêmicas, ou seja, não encontrada em nenhum outro local (SATO, 1995).

A família Meliaceae está localizada nos trópicos e subtropicais, ocorrendo em uma variedade de habitats de florestas tropicais, manguezais e em semi-desertos. É caracterizada por fornecer as mais valiosas madeiras como o mogno (*Swietenia*) e o cedro (*Cedrela*), sendo constituintes da Ordem Sapindales, que compreende 5 gêneros e 120 espécies, distribuídos na região Neotropical (MUELLNER *et al.*, 2003; MAIA, *et al.*, 2000; LORENZI, 1992). A família Meliaceae, abrange 16 espécies, agrupadas em 4 gêneros e são nativas da região Sul do Brasil (LORENZI, 1992). De acordo com Klein (1984), as meliáceas são encontradas em florestas Estacionais Decíduas e Semidecíduas, ocorrendo também na floresta Ombrófila Densa da encosta Atlântica, mesmo em elevadas altitudes. Dentre os gêneros da família Meliaceae, destacam-se o gênero *Cedrela*, popular cedro, que se caracteriza por apresentar madeira avermelhada, como *Carapa*, *Trichila* e a *Guarea* (JOLY, 1985). No Brasil, ocorrem 8 espécies deste gênero, sendo *C. odorata*, *C. angustifolia* e *C. fissilis* mais conhecidas (RIZZINI, 1971). Todas recebem as denominações vernaculares de cedro-vermelho, cedro-rosa, cedro-branco, cedro-amarelo, cedro-batata, cedro-cetim e

cedro da várzea e suas diferenciações são estabelecidas pela morfologia, pois cada espécie tem sua adaptação característica (LORENZI, 1998).

Produtora de madeira de alta qualidade, *C. fissilis* ocorre no Brasil desde o Rio Grande do Sul até Minas Gerais. Sua floração ocorre de setembro a dezembro e seus frutos amadurecem, após a queda de suas folhas, entre julho e agosto (REITZ *et al.*, 1983; CARVALHO, 1994). Esta espécie desenvolve-se no interior de floresta primária, é peculiar às matas mais secas, aparecendo em descampados e até no cerrado. Conhecido por cedro dos pinheirais no Brasil meridional prefere capoeirões e regenera-se em clareiras ou bordas de mata. Com crescimento rápido, *C. fissilis* é heliófita ou de luz difusa e se desenvolve em solos úmidos e profundos com frequência de uma a três árvores por hectare (REITZ *et al.*, 1979; LORENZI, 1992; CARVALHO, 1994).

Os frutos apresentam muitas sementes com alta viabilidade, que se prolonga por períodos superiores a 4 meses (LORENZI, 1992). Pode produzir 1.500 frutos, com mais de 60.000 sementes férteis (RIZZINI, 1981). A dispersão das sementes ocorre pela queda, quando os frutos caem e se fixam no solo, ou pela ação dispersante do vento, possuindo germinação abundante a partir de 12 a 18 dias (LORENZI, 1992; CARVALHO, 1994). Suas folhas são de 10 – 15 pares de folíolos agudamente acuminados, firmes, sem domácias e pubescentes (RIZZINI, 1978). Suas árvores são caducifólias com 10 – 25 m de altura e 40 a 80 cm de DAP (Diâmetro à Altura do Peito), chegando a 40 m de altura e 200 cm de DAP, quando adulta. Seu tronco é reto ou pouco tortuoso, cilíndrico e apresenta tolerância ao frio, e aos ataques do agente causador da morte de muitas destas espécies de cedro, conhecido como broca-do-cedro (*Hypsipyla grandella*), que faz com que seus troncos fiquem tortuosos, além de atacar as gemas apicais, desenvolvendo um arbustiforme. Por isso, é um desafio, manter a cultura de cedros, principalmente em regeneração natural (LORENZI, 1992; CARVALHO, 1994). Porém, se a tecnologia de controle da praga for aprimorada, pela manipulação adequada da frequência relativa dessa espécie, em povoamentos mistos e também pela ampliação dos estudos sobre o melhoramento genético, o cedro poderá se manter no elenco de espécies florestais cultiváveis de nosso país (LORENZI, 1998; INOUE *et al.*, 1984).

O cedro é também uma espécie pioneira, de crescimento rápido, de importância ecológica, demonstrando experimentalmente a capacidade elástica de adaptação fisiológica às condições luminosas do ambiente, e grande potencial de regeneração natural, podendo ser

utilizada, através do uso racional, para a produção sustentável da madeira (INOUE *et al.*, 1984).



**Figura 1:** Aspecto de uma ramificação de *Cedrela fissilis* :Em destaque, o fruto imaturo da espécie (Fonte: URBANETZ *et al.*, 2010).

### 3.2 *Cedrela fissilis* : IMPORTÂNCIA ECONÔMICA, MEDICINAL E INDUSTRIAL

*C. fissilis* apresenta madeira mais mole e com textura grossa, quando comparada ao mogno (*Swietenia macrophylla*). Dentre as madeiras leves, o cedro é o que apresenta a maior diversificação, superado somente pela madeira do pinheiro-do-paraná (*Araucaria angustifolia*). A madeira desta espécie é amplamente utilizada em compensados, contra placados, esculturas e obras de talhas, modelos e molduras, esquadrias, móveis em geral, marcenaria, construção civil, naval e aeronáutica, confecção de lápis, caixas e instrumentos musicais. Sua ampla utilização se deve pela boa retenção de pregos e parafusos e grande absorção de pigmentos e polimento (CARVALHO, 1994; LORENZI, 1998).

A árvore, por ser muito bonita, é largamente empregada em trabalhos de paisagismo em parques e jardins. *C. fissilis* é utilizada na recuperação de áreas degradadas, bem como na composição de

reflorestamentos heterogêneos de preservação permanente. É uma espécie de grande plasticidade silvicultural, embora o seu cultivo em larga escala seja inibido pelo ataque de *Hypsipyla grandella*.

A família Meliaceae tem sido muito estudada e tem grande importância na medicina, fitoquímica e no controle de insetos. As espécies desta família são utilizadas na medicina natural, apresentando propriedades terapêuticas como: ação anti-helmíntica, antiviral, antirreumática, anticancerígena e anti-inflamatória (NUNES, 2000). Lago *et al.* (2004) verificou que o óleo essencial obtido a partir de folhas de *Cedrela fissilis* apresentou atividade antibacteriana capaz de inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Outro estudo evidenciou a atividade antimicobacteriana contra *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium kansasii* de extratos de folhas e raízes de *C. fissilis* (RAMOS *et al.*, 2008). Segundo Carvalho (1998), na medicina popular, a casca do cedro é utilizada na forma de chá como adstringente e no combate da febre. Também, sua decocção serve para lavar feridas e úlceras. Ambrozin *et al.*, (2006), analisando extratos de raízes e de folhas de *Cedrela fissilis*, isolaram nove limonóides, onde destes, seis apresentaram ação inseticida sobre a formiga *Atta sexdens rubropilosa*. Goulart *et al.* (2004) encontraram terpenos como o nerolidol limoneno, linalol e famesol em extratos de *C. fissilis*, que possuem atividade antimalárica nos estágios intraeritrocíticos do *Plasmodium falciparum*. Os terpenos abrangem uma variedade de substâncias de origem vegetal, constituindo uma classe de metabólitos secundários, formados pelo metabolismo primário do carbono. A unidade ativa básica na formação dos terpenos é o isopentenil difosfato (IPP), formado a partir da acetil CoA, rota do ácido mevalônico, ou através de intermediários glicolíticos pela rota do metileritritol fosfato (MEP) (TAIZ & ZEIGER, 2009).

A família Meliaceae é caracterizada pela grande produção de limonóides, que podem ser considerados os maiores representantes da classe dos terpenos com atividade inseticida. Extratos de *C. fissilis* também têm sido estudados quanto à atividade inseticida. Assim, de raízes de *C. fissilis* foi isolado o limonóide 3- $\beta$ -acetoxicarapina, juntamente com os triterpenos ácido oleanólico e ácido oleanônico, que apresentaram atividade inseticida contra as formigas cortadeiras *Atta sexdens rubropilosa*. Técnicas de cultivo *in vitro* e a aplicação da biotecnologia podem ser alternativas importantes e viáveis para a síntese destes compostos (LEITE *et al.*, 2005; ROY & SARAF, 2006). Pesquisas realizadas sobre as análises de extratos de calos de *C. fissilis* permitiram a identificação de 8 monoterpenos e 3 sesquiterpenos

(Laudano, 2005). O principal constituinte foi o linalol, seguido de cânfora, 1,8-cineol e o 3-careno, sendo que estes compostos, não foram detectados em extratos de folhas e cascas de plantas crescidas ao meio natural, indicando que foram induzidos pelas técnicas de cultivo *in vitro*. Esse autor observou ainda, que alguns compostos voláteis podem ou não estarem presentes em calos, dependendo se são produzidos na presença de luz ou no escuro, como por exemplo, a produção do sesquiterpeno germacreno, que ocorreu em calos produzidos na luz, mas que não foi identificado em calos produzidos no escuro (LAUDANO, 2005).

### **3.3 CULTURAS DE CÉLULAS E TECIDOS VEGETAIS *IN VITRO* E PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS**

O cultivo de células é uma tecnologia viável para a produção de compostos de interesse econômico (PLETSCH, 1998; VERPOORTE & MARASCHIN, 2001). Kossel (1981) foi o primeiro autor a definir os metabólitos secundários como opostos aos metabólitos primários. Os metabólitos secundários foram definidos como compostos pouco abundantes, com frequência inferior a 1% do carbono total, ou por ocorrer em órgãos ou células específicas. Os produtos secundários têm papel importante na adaptação das plantas ao ambiente; essas moléculas contribuem para que as mesmas possam ter uma boa interação com os diferentes ecossistemas (HARBORNE, 1988). Os produtos secundários aumentam a probabilidade de sobrevivência de uma espécie, pois são responsáveis por diversas atividades biológicas relacionadas com a defesa, por exemplo, podem atuar como antibióticos, antifúngicos e antivirais para proteger as plantas dos patógenos, apresentando também, atividades antigerminativas ou tóxicas para outras plantas. Além disso, alguns destes metabólitos constituem importantes compostos que absorvem a luz ultravioleta, evitando que as folhas sejam danificadas (LI *et al.*, 1993).

Algumas espécies de plantas comuns não podem ser cultivadas em larga escala, devido à sua susceptibilidade a patógenos (ex. antracnose para *Hypericum* ou *Arnica montana*), o que tem estimulado os cientistas e biotecnologistas a considerar as culturas de células, tecidos e órgãos como uma maneira alternativa para produzir os correspondentes metabólitos secundários *in vitro*.

As plantas que produzem compostos bioativos são obtidas, frequentemente, a partir de coleta predatória e indiscriminada



(VILLAREAL *et al.*, 1997), por este motivo as pesquisas visando a produção destes metabólitos secundários por cultura *in vitro* de células são vantajosas, tanto do ponto de vista ecológico como econômico. Como um sistema experimental, a cultura de células de plantas fornece uma série de vantagens sobre os estudos conduzidos com as plantas íntegras, incluindo a produção contínua, durante o ano, de material vegetal necessário para os estudos, células indiferenciadas, estado de desenvolvimento das células relativamente uniforme, ausência da interferência de microrganismos e da vulnerabilidade sazonal; e mais importante, o ciclo vegetativo reduzido (CROTEAU *et al.*, 2000). As culturas de células de plantas podem sintetizar grandes quantidades de metabólitos secundários, dentro de um período de cultivo de poucas semanas, o que é muito favorável em relação à produção pela planta *in situ*, em que o espaço de tempo para o acúmulo destes metabólitos pode variar de uma estação para a outra, em plantas anuais ou diversos anos, no caso da plantas perianuais, como por exemplo, as árvores. Nas culturas de células de plantas as taxas de biossíntese podem ser aumentadas, através da manipulação de fatores bióticos e abióticos, facilitando grandemente os estudos (CROTEAU *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2007).

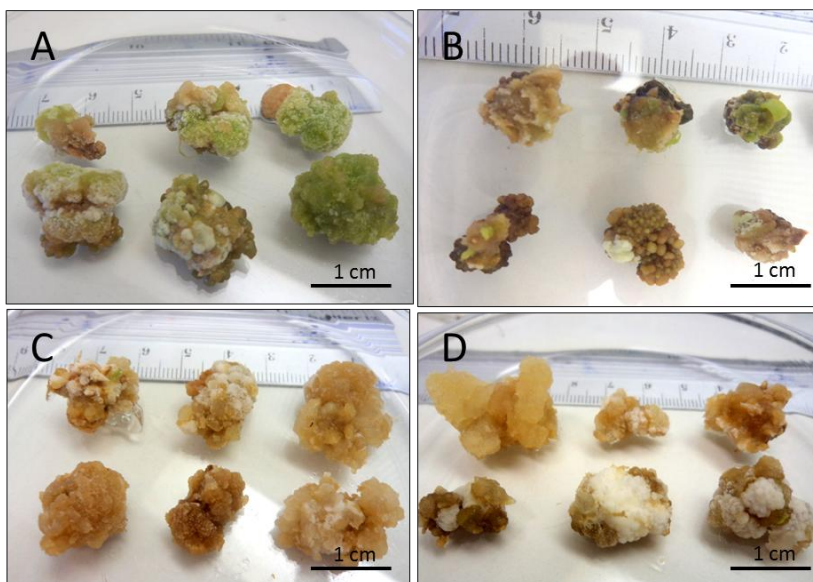
As técnicas de cultura de células, tecidos e órgãos de plantas, além de poderem ser aplicadas para viabilizar a produção de metabólitos secundários, também são amplamente utilizadas para a propagação de espécies florestais. Através desta técnica, pequenos fragmentos de tecido vivo, chamados de explantes, fragmentos de folha, raiz, caule ou qualquer tecido que respondam às condições de indução do meio de cultura, são isolados da plântula e cultivados assepticamente, por períodos indefinidos em um meio de cultura apropriado. A proliferação de células vegetais e a organização em tecidos e eventualmente em plantas completas pode ocorrer devido à totipotência. As técnicas de cultura de células e tecidos *in vitro* podem ser aplicadas à propagação clonal (micropropagação e embriogênese somática), eliminação viral, conservação genética, fertilização *in vitro*, cultura de protoplastos, transformação genética, hibridização somática, produção conservação de germoplasma entre outros (TORRES *et al.*, 2000; KERBAUY, 1997).

Para viabilizar sistemas de produção de metabólitos secundários de interesse econômico, utilizando-se as técnicas de cultura de células *in vitro*, são necessários, primeiramente, o estabelecimento de sistemas de cultura de calos/células, através da realização de experimentos, que visam estudar o efeito de diferentes condições de cultura sobre o crescimento dos calos, seguidos das análises fitoquímicas, para

selecionar as condições mais adequadas de crescimento e de produção dos compostos (ROBINS, 1994). Assim, com o cultivo de células, associado ao conhecimento de fisiologia, bioquímica e regulação metabólica de células vegetais, foram descobertos, o ácido rosmarínico (*Coleus blumei*), saponina (*Panax ginseng*), cafeína (*Coffea arabica*), diosgenina (*Dioscorea deltoidea*), capsaicina (*Capsicum frutescens*), sanguinarina (*Papaver somniferum*) e ajmalicina (*Catharanteus roseus*).

Os calos (figura 2), normalmente utilizados para os estudos dos metabólitos secundários e que podem ser utilizados para o desenvolvimento de suspensões celulares são agrupamentos de células, que podem ser heterogêneos, composto por células indiferenciadas ou não, em proliferação, de natureza parenquimatosa, capazes de armazenar nutrientes. Podem ser compactos ou friáveis e apresentar coloração variada, ou mesmo não ter pigmentação. A estrutura e o tipo de crescimento que o calo apresentará dependem de diversos fatores, tais como a composição do meio de cultura, condições ambientais (iluminação, temperatura), origem, idade e genótipo do tecido doador do explante, e até mesmo, o tamanho do inóculo (NARAYANASWAMY, 1994; CHAWLA, 2004; TERMIGNONI, 2005).

A formação do calo envolve três etapas: indução, divisão celular e diferenciação, sendo que, na fase da eventual diferenciação podem surgir centros com atividade meristemática, denominados meristemóides, com disposição concêntrica, onde poderão ser formados traqueídeos, elementos de tubo crivado e primórdios de raízes ou gemas. Embora o processo de calogênese seja dividido em três fases, definidas pelas características predominantes em cada uma delas, a formação da massa celular ocorre pela divisão celular e diferenciação concomitantes, na segunda e na terceira fase (AITCHINSON, 1977; NARAYANASWAMY, 1994; TERMIGNONI, 2005). É importante salientar, que a diferenciação, originando a formação de primórdios de meristemas apicais e radiculares não é comum a todos os sistemas e depende da espécie e das condições de cultivo.



**Figura 2:** Diferentes morfologias de calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de segmentos nodais cotilédonares e segmentos de epicótilo cultivados durante 8 semanas em meio de cultura MS semi-sólido, suplementados com 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5,0  $\mu\text{M}$  de ANA.

A) Amostra 1: calos de epicótilo crescidos em meio de cultura contendo 118 mM de sacarose;

B) Amostra 2: calos de nó cotilédonar crescidos em meio de cultura contendo 118 mM de sacarose, 2,73 mM de glutamina;

C) Amostra 3: calos de nó cotilédonar crescidos em meio de cultura contendo 118 mM de sacarose e na ausência de luz;

D) Amostra 4: calos de nó cotilédonar crescidos em meio de cultura contendo 118 mM de sacarose, 2,73 mM de glutamina e na ausência de luz.

Segundo Nunes *et al.* (2003), poucos estudos *in vitro* foram realizados para a conservação das espécies da Floresta Tropical Brasileira, como é o caso da espécie pertencentes a família Meliaceae. Sendo assim, ainda são escassos na literatura estudos de cultura e conservação *in vitro* para estas espécies. Foram estabelecidos alguns protocolos de micropropagação, para *Cedrela odorata* e *Cedrela fissilis* (NUNES *et al.*, 2002; NUNES *et al.*, 2007; SALDANHA, 2010;) e

sistemas de embriogênese somática foram desenvolvidos para *Swietenia macrophylla* e *Cedrela fissilis* (MARUYAMA & ISHII, 1999; VILA *et al.*, 2009).

A otimização da produção de calos de *C. fissilis*, em diferentes condições de cultura, foi estabelecida através dos estudos conduzidos por Nunes *et al.* (2002), Laudano (2005), Mioto (2007) e Pilatti (2011). Os estudos sobre o perfil metabólico de calos de *C. fissilis* foram avaliados por Laudano (2005) e Pilatti (2011), que utilizando espectrofotometria de varredura em UV-vis e espectroscopia de FT-IR identificou algumas das principais classes de metabólitos secundários presentes nos calos e comparou a ocorrência desses compostos, entre os calos cultivados em diferentes condições. Os estudos indicaram que o crescimento dos calos, assim como as classes dos compostos produzidos estão relacionados com as diferentes fontes de carbono e nitrogênio, reguladores de crescimento, tipos de explantes.

A concentração e o tipo de fonte de carbono podem ter efeito sobre o crescimento e a síntese de compostos pelas culturas *in vitro* de células vegetais. A fonte de carbono mais utilizada é a sacarose, embora outros mono e dissacarídeos possam ser empregados (GUERRA *et al.*, 1999). A influência de diversos açúcares, tais como sacarose, frutose ou glucose na produção de compostos é variável como, por exemplo, produção de polissacarídeos em calos cultivados com sacarose, foram maiores quando comparados com outras fontes de carbono (GÜNTHER & OVODOV, 2002). Os carboidratos são importantes fontes de energia e carbono estrutural para o metabolismo vegetal, regulando reações bioquímicas, para a manutenção do crescimento e desenvolvimento do vegetal (TAIZ & ZEIGER, 2009). Já a fonte de nitrogênio é um nutriente essencial em qualquer fase do desenvolvimento vegetal, pois participa da formação de compostos básicos do metabolismo vegetal como os aminoácidos, proteínas, ácidos nucléicos, entre outros (TEASDALE, 1987). Laukkanen *et al.*, (1997) estudaram o efeito de duas diferentes fontes de nitrogênio em culturas de calos de *Pinus sylvestris*. Tais autores demonstraram que o crescimento dos calos foi baixo no meio de cultura que continha o nitrato, mas observaram uma intensificação no metabolismo dos calos, principalmente em relação à síntese de proteínas e compostos fenólicos. Vários exemplos podem ser atribuídos na literatura sobre o efeito da luz e do escuro em culturas *in vitro*. Estudos com culturas de segmentos inter-nodais revelaram que a luz e o escuro interferem na produção de antocianinas, onde calos brancos apresentaram maior crescimento no escuro, enquanto que as

culturas de calos vermelhos, em luz, apresentaram maior conteúdo de antocianinas (MAKUNGA *et al.*, 1997).

Os estudos sobre o efeito de diferentes condições de cultivo sobre o crescimento dos calos e a produção dos metabólitos primários e secundários são necessários para selecionar as condições de cultura mais promissoras para o estabelecimento de culturas de suspensão celular visando à otimização da produção e extração de metabólitos de interesse.

### **3.4 METABÓLITOS PRIMÁRIOS E SECUNDÁRIOS**

#### **3.4.1 Metabólitos primários**

##### **3.4.1.1 Proteínas solúveis totais**

Os metabólitos primários são essenciais para o desenvolvimento de explantes *in vitro*, e o conhecimento dos níveis destes metabólitos durante o desenvolvimento dos calos é importante. Estudos relacionados com o metabolismo das proteínas são necessários para um melhor entendimento dos processos metabólicos e o conhecimento de mudanças bioquímicas e fisiológicas que ocorrem durante o crescimento *in vitro* de tecidos vegetais, como os calos produzidos *in vitro* de *Cedrela fissilis* em diferentes condições de cultivo (SANTOS *et al.*, 2010; PASSOS, 1996; MESQUITA *et al.*, 2002).

As proteínas são moléculas complexas, constituídas por seqüências de aminoácidos. Cada proteína é formada por uma seqüência única de aminoácidos, determinando a sua função dentro da célula. A síntese de proteínas é a função central de todas as células. As proteínas representam um fator limitante para a manutenção dos órgãos e para o crescimento das plantas, pois na sua ausência eles cessam. A síntese de proteínas requer demanda por aminoácidos, grande suprimento de energia e nutrientes (PORTER *et al.*, 1991). Desta forma, torna-se interessante quantificar os teores de proteínas totais em calos de *C.fissilis*, para avaliação do metabolismo protéico dos calos em diferentes condições de cultivo e a possível correlação com o crescimento, a produção de outros metabólitos primários e com os metabólitos secundários. Santos *et al.*, (2010), observaram que os níveis de proteínas em calos de pinhão-mansó foram inferiores até os 63 dias

de cultivo ( $0,0119 \text{ mg/g}^{-1} \text{ MF}$ ), diferentemente do observado aos 70 e 98 dias, onde os níveis foram superiores ( $0,0261 \text{ mg/g}^{-1} \text{ MF}$ ). Lima *et al.*, (2007), entretanto, observaram que espécies lenhosas apresentaram maiores teores de proteínas no início do cultivo do calo. Um aumento no teor de proteínas após 70 dias pode ser atribuído a mudanças no metabolismo celular, gerando a necessidade de proteínas específicas para garantir que suas funções sejam executadas (MULLER, 2008).

#### 3.4.1.2 Carboidratos

Os carboidratos são constituídos de açúcares simples e moléculas mais complexas, constituídas por subunidades de açúcares mais simples, cuja principal função é fornecer esqueletos de carbono para gerar energia química aos processos celulares, promovendo a biossíntese de compostos orgânicos envolvidos no metabolismo celular, além de desempenhar outras funções, como: fontes de reserva, sustentação (celulose e hemi-celulose) e defesa (glicoproteínas e imunoglobulinas) (BRUM *et al.*, 1994; VIEIRA *et al.*, 1991).

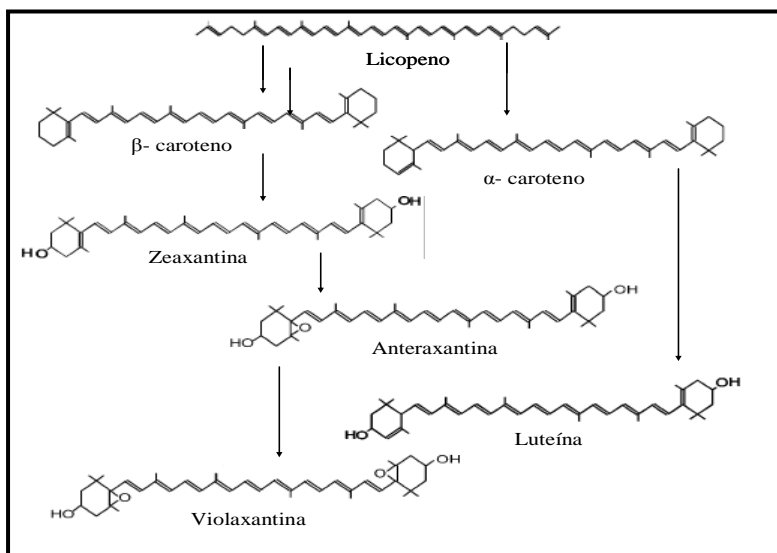
Estudos realizados com calos de pinhão-manso apresentaram teores significativos de açúcares solúveis totais a partir dos 77 dias na cultura, não sendo observados no início do período de cultivo (SANTOS *et al.*, 2010). Os carboidratos insolúveis, como o amido também apresentaram baixos teores no início do cultivo, sendo observados a partir de 91 dias. Segundo, Chagas *et al.*, (2003), provavelmente o calo utilizado era desprovido de reservas carboidratadas (açúcares). Como explantes cultivados *in vitro* são praticamente heterotróficos, o acúmulo de reservas não é a rota marcante em seu metabolismo.

#### 3.4.2 Metabólitos secundários

##### 3.4.2.1 Carotenoides

Os carotenoides são pigmentos naturais, derivados do isopreno sendo caracterizados estruturalmente por uma longa cadeia de dupla-ligações conjugadas, geralmente com 40 átomos de carbono (tetraterpenos), com uma ou duas estruturas cíclicas (anel  $\beta$ -ionona) que terminam em ligações conjugadas (CARDOZO *et al.*, 2007). Os carotenoides podem ser sintetizados por plantas, alguns microorganismos e algas, sendo que já foram descritos mais de 750 estruturas químicas diferentes, isoladas de fontes naturais (BRITTON *et*

*al.*, 2004). Estes compostos têm a função de proteger o aparato fotossintético de danos oxidativos, que podem ser causados pela radiação ultravioleta. São sintetizados pela conversão de difosfato de geranylgeranila (GGPP) em fitoeno através da enzima fitoeno-sintase (PSY). O fitoeno por processos de dessaturação é transformado em licopeno que é o substrato para as reações de ciclização. O processo de ciclização pode ocorrer em uma ou em ambas as extremidades da molécula. Os carotenoides, após o processo de ciclização, podem ser divididos em dois grupos, conforme a figura 02: os carotenos e as xantofilas, que são formadas através da oxigenação dos carotenos, pela adição de grupamentos hidroxila, carbonila, éter, acetato e epóxido.



**Figura 3:** Ciclização do licopeno à  $\alpha$  e  $\beta$ - caroteno e formação das xantofilas a partir do  $\alpha$  e  $\beta$ - caroteno (RAMLOV, 2010, adaptado de RÖMER *et al.* 2002).

### 3.4.2.2 Clorofila

A clorofila é o pigmento mais importante ligado a eficiência fotossintética das plantas, é responsável pelo crescimento e pela adaptação das plantas nos diferentes ambientes. A concentração de clorofila é dependente da intensidade luminosa, ou seja, a taxa fotossintética é dependente do nível de pigmentos nas folhas (HEATH, 1989).

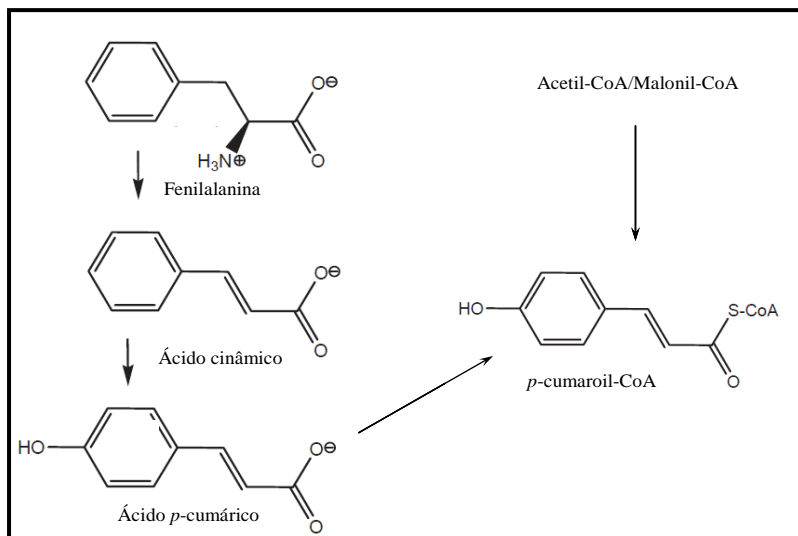
A partir de 1970 é que trabalhos com espécies arbóreas, contemplando a presença de clorofilas é que começaram a aparecer no Brasil, dentre eles, destacam-se estudo da concentração de clorofila em cedro-rosa (*Cedrela fissilis*) e cedro (*Cedrela odorata*), onde foi observada concentrações de clorofilas superiores em plantas cultivadas à sombra quando comparada as plantas de sol (INOUE, 1978). Em estudos com calos cultivados *in vitro* foram observadas diferenças na concentração de clorofila em calos de *Kalanchoë crenata* cultivados em diferentes meios de cultura (STOBART *et al.*, 1967). Bernet *et al.*, (1999), isolaram cloroplastos oriundos de calos de milho e compararam o teor de clorofilas *a* e *b* com o tempo de sub-cultivo e se as fases luz/escuro interferiam no aumento e na diminuição destas clorofilas, onde eles perceberam que, o conteúdo de clorofila *a* era muito maior, quando comparado com o teor de clorofila *b*. Além disso, eles observaram que, o conteúdo de clorofila *a* diminuía com 3 horas de sub-cultivo e após isso aumentava, ficando constante até as 16 h na fase de luz. Na fase de escuro, após as 16 horas, ocorria um declínio de clorofila *a*, aumentando novamente após as 22 h. A clorofila *b*, apresentava aumento na fase luz e declínio na fase escuro, sendo que após algum tempo nesta fase, o conteúdo de clorofila *b* aumentava novamente. Segundo os autores, a alta proporção de clorofilas *a/b* parece indicar que o complexo da antena coletora pode estar mal inserido na membrana dos tilacóides destes cloroplastos e possivelmente com baixa eficiência fotossintética.

#### 3.4.2.3 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos constituem um dos maiores grupos de metabólitos secundários das plantas com mais de 8000 estruturas conhecidas (RICE-EVANS *et al.*, 1997). São moléculas formadas por um ou mais anéis benzênicos, ligados a grupos hidroxilas, podendo apresentar como substituintes grupamentos metil, metoxil, amino e monossacarídeos (HARBORNE, 1999). Este grupo de compostos pode ser dividido em fenóis simples e polifenóis, dependendo do número de unidades de hidroxilas na molécula (CURVELIER *et al.*, 1992). Os compostos fenólicos são sintetizados pela via do ácido chiquímico, em que se origina o aminoácido aromático fenilalanina, intermediário inicial na via de síntese de fenilpropanóides. Pela ação da enzima fenilalanina amonialiase (PAL) a fenilalanina origina o ácido cinâmico, que é hidroxilado a ácido *p*-cumárico, sendo este convertido a *p*-cumaroil-

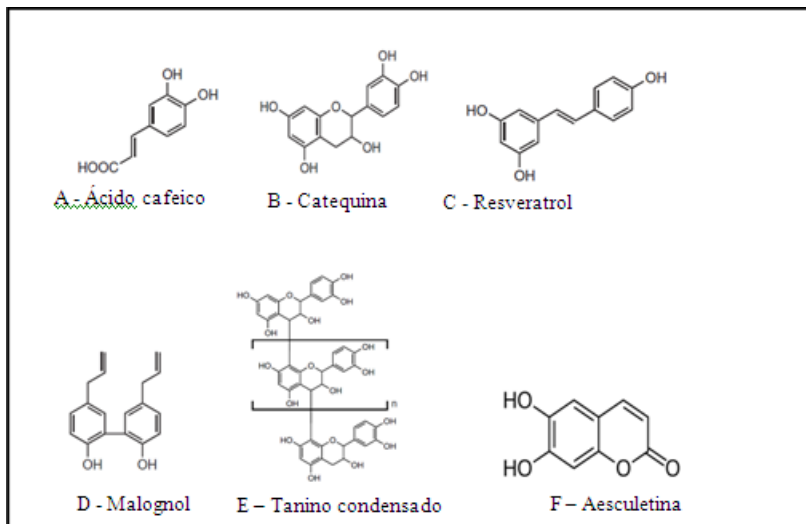


CoA, que é o substrato utilizado para a síntese das classes de compostos fenólicos. O *p*-cumaroil-CoA ainda pode ser sintetizado a partir da via do acetil-CoA/malonil-CoA (VERMERRIS & NICHOLSON 2008) (Figura 03).



**Figura 4:** Via de biossíntese de compostos fenólicos (RAMLOV, 2010, adaptado de VERMERRIS & NICHOLSON, 2008).

Os compostos fenólicos podem ser divididos em seis subclasses baseado na sua estrutura química, como representado na Figura 4: ácidos fenólicos (5A -  $\text{C}_6\text{-C}_1$ ), flavonoides (5B-  $\text{C}_6\text{-C}_3\text{-C}_1$ ), estilbenos (5C-  $\text{C}_6\text{-C}_2\text{-C}_6$ ), lignanas (5D-  $\text{C}_6\text{-C}_3$ )<sub>2</sub>, taninos (5E-  $\text{C}_6\text{-C}_3\text{-C}_6$ )<sub>n</sub> e cumarinas (5F-  $\text{C}_6\text{-C}_3$ ). Os flavonoides representam a maior classe de compostos fenólicos e podem ser divididos em outras subclasses de acordo com as variações que ocorrem no seu anel heterocíclico (ROSSI & KASUM 2002, TAPIERO *et al.* 2002).



**Figura 5:** Exemplos de estruturas químicas representativas das classes de compostos fenólicos (RAMLOV, 2010, adaptado de SHAHIDI & NACZK, 2006).

Devido à capacidade antioxidante os compostos fenólicos estão envolvidos na prevenção de inúmeras patologias humanas. Outras atividades biológicas têm sido relatadas, tais como antitumoral, anti-inflamatória e antiviral (RAO *et. al.*, 1993; MAGGI-CAPEYRON *et al.*, 2001). Em estudos *in vitro*, muitos compostos fenólicos naturais são melhores antioxidantes que as vitaminas E ou C. A sua capacidade de quelatar metais, especialmente cobre e ferro, faz com que atuem indiretamente como antioxidantes, já que inibem a ação catalisadora dos metais na formação dos radicais livres. A remoção de radicais livres e o potencial antioxidante dos compostos fenólicos dependem do arranjo dos grupos funcionais da estrutura nuclear do composto (CONNER & GRISHAM, 1996).

Em extratos de calos de barbatimão, da família Fabaceae, foram observadas presença de fenóis, principalmente em calos cultivados na ausência de luz (CASTRO *et al.*, 2009). Cultivo de calos de camomila (*Matricaria recutita* L. – Asteraceae) mostraram ser uma boa fonte de compostos fenólicos, principalmente com a adição de reguladores de crescimento BAP e ANA em maiores concentrações, sendo indicado para estudos mais aprofundados com o cultivo destes órgãos. Geralmente, o cultivo de calos tem sido utilizado como modelo para

estudos de desenvolvimento de plantas e facilitam a análise de mudanças metabólicas, tais como a atividade das enzimas, ação de reguladores e morfogênese (TAVANO *et al.*, 2009; ARNALDOS *et al.*, 2001). Vários trabalhos na literatura mostraram a produção de metabólitos secundários, tais como flavonoides, em plantas cultivadas *in vitro* (PASQUAL *et al.*, 2003; DIAS *et al.*, 1998) e indicaram que partes de plantas cultivadas em meio de cultura podem apresentar teores maiores que os encontrados em plantas cultivadas no campo, podendo ser utilizada como modelo para estudos fitoquímicos.

### 3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA FITOQUÍMICA

Para a determinação de substâncias ativas, a fitoquímica tem papel fundamental na detecção e análise de produtos do metabolismo vegetal, além disso, na cultura de tecidos *in vitro* tem se mostrado como uma ferramenta muito importante para a pesquisa e de grande interesse econômico. A fitoquímica estuda cada grupo da planta, desde a estrutura química molecular até as propriedades biológicas dos vegetais (VERPOORTE & MARASCHIN, 2001). Dentre os vários equipamentos utilizados na fitoquímica, a análise dos compostos por espectrofotometria de UV-vis e Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) fornecem grande número de informações. Como por exemplo, a avaliação de crescimento das culturas de calos de *Cedrela fissilis*, através das curvas de dissimilação, espectrofotometria de UV-vis, espectroscopia de FTIR, foi possível compreender melhor como os diferentes açúcares e a glutamina atuam sobre o crescimento de calos de *C. fissilis* (PILATTI, 2011).

A espectrofotometria de UV-Vis utiliza radiação eletromagnética, cujos comprimentos variam entre 200 a 780 nm. Quando estimulada com esse tipo de radiação, a molécula do composto pode sofrer transições eletrônicas por ocasião da absorção de energia quantizada. O espectro eletrônico de absorção é o registro gráfico da resposta do sistema ao estímulo. A absorção de energia UV-Vis modifica a estrutura eletrônica da molécula em consequência de transições eletrônicas envolvendo geralmente elétrons  $\pi$  e  $n$  (não ligantes) envolvidos em ligações. Isto requer que a molécula contenha pelos menos um grupo funcional insaturado (C=C, C=O, por exemplo) para fornecer os orbitais moleculares  $\pi$  e  $n$ . Tal centro de absorção é chamado de cromóforo, sendo responsável principalmente pelas transições  $\pi \rightarrow \pi^*$  e  $n \rightarrow \pi^*$ . Estas resultam da absorção de radiações eletromagnéticas que se

enquadram em uma região espectral experimentalmente conveniente, ao contrário das transições  $n \rightarrow \sigma^*$  e  $\sigma \rightarrow \sigma^*$   $\lambda$  que requerem geralmente radiações mais energéticas ( $< 200$  nm) (PEREIRA, 2009).

Os métodos cromatográficos de alta eficiência são um grupo de técnicas de separação de misturas, de modo que o mesmo instrumento faz a separação dos analitos contidos na amostra e sua quantificação. Esta técnica apresenta-se como uma alternativa bastante viável, eficiente e rápida, em comparação a métodos químicos e microbiológicos. Os métodos cromatográficos analíticos são responsáveis por mais da metade da demanda mundial de análises químicas. Muitas misturas complexas, especialmente de origem biológica, só podem ser quantificadas usando cromatografia líquida ou gasosa. O processo da quantificação funciona, basicamente, pela adsorção do analito de interesse na fase estacionária. O tempo de retenção permite a separação das várias substâncias que compõe a amostra: analito(s) e interferentes (SIMÕES *et al.*, 2009).

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. MATERIAL VEGETAL

Foram utilizadas sementes e plântulas axênicas de *Cedrela fissilis* como fontes de explantes para a realização dos experimentos. As sementes foram previamente adquiridas no Instituto Florestal de São Paulo e coletadas na Estação Experimental de Araraquara, São Paulo.

### 4.2. DESINFECÇÃO DAS SEMENTES

As sementes foram lavadas com água da torneira e detergente neutro, enxaguadas quatro vezes e, em fluxo laminar, foram imersas por 75 minutos em solução comercial de hipoclorito de sódio (Q-Boa) com 2,5% (v/v) de cloro ativo, acrescida de algumas gotas de detergente. Em seguida, foram enxaguadas por quatro vezes com água destilada esterilizada, para a remoção de resíduos de hipoclorito e detergente e inoculadas em meio de cultura (NUNES *et al.*, 2007).

### 4.3. PREPARAÇÃO DO MEIO DE CULTURA

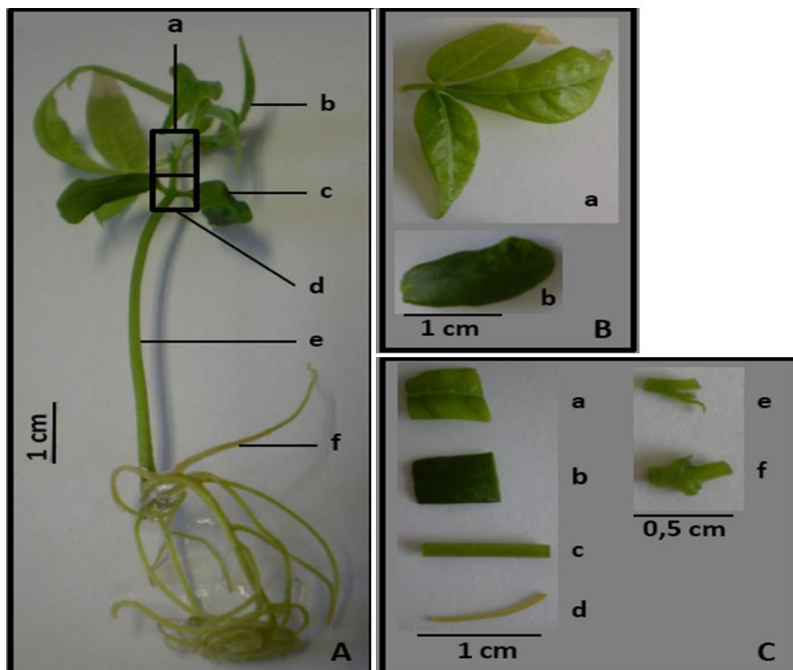
O meio de cultura utilizado para o estabelecimento de plântulas foi o meio de cultura Murashige & Skoog (MS) (MURASHIGE & SKOOG, 1962), uma mistura em pó preparada pela Sigma Chemical Co., na concentração de 4,4 g/L, suplementado com 59 mM de sacarose e 0,2% (m/V) de Phytigel. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8, antes da autoclavagem, utilizando-se solução de hidróxido de sódio 0,1 M ou de ácido clorídrico 0,1 N. O meio de cultura foi distribuído em tubos de ensaio de 20 x 150 mm (8 ml de meio por tubo). Todos os tubos foram fechados com tampas de polipropileno e autoclavados por 18 minutos a 1,1Kg/cm<sup>3</sup> e 121°C (NUNES *et al.*, 2007). Estes procedimentos foram utilizados em todos os experimentos descritos a seguir, com modificações na composição do meio de cultura quando necessário.

### 4.4. ESTABELECIMENTO DE PLÂNTULAS E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO DAS CULTURAS

As sementes desinfetadas foram inoculadas em meio de cultura MS, suplementado com sacarose e Phytigel nas concentrações citadas no item 4.3. Os tubos de ensaio foram cobertos com filme de polipropileno (76 mm x 76 mm), presos com elásticos de borracha. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura controlada de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , sob fotoperíodo de 16 horas, provido por lâmpadas fluorescentes Philips TDL ( $22.3 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) e umidade relativa de 70% (NUNES *et al.*, 2007). Estas condições foram utilizadas em todos os experimentos, exceto quando especificado.

#### 4.5 INDUÇÃO E MORFOGÊNESE DE CALOS DE *C. fissilis* EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTURA

Segmentos de raiz, hipocótilo, nó cotiledonar, nó foliar, cotilédone, folha e epicótilo medindo aproximadamente 5 mm de comprimento foram excisados de plântulas axênicas de *C. fissilis* com 8 semanas de idade obtidas conforme citado no item 4.4, e inoculados em meio de cultura preparado conforme descrito no item 4.3, suplementado com 118 mM de sacarose, frutose ou glucose, 0 ou 2,73  $\mu\text{M}$  de glutamina, presença ou ausência de luz em 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP, 5  $\mu\text{M}$  de ANA. Foram inoculados 2 segmentos por tubo de ensaio de raiz, hipocótilo, nó cotiledonar, nó foliar, cotilédone e folha e 1 segmento por tubo de ensaio de epicótilo, sendo que cada tratamento foi constituído de 25 repetições. As culturas foram mantidas nas condições descritas no item 4.4 e no tratamento de escuro os tubos de ensaio contendo os explantes foram envoltos em papel alumínio. Após 8 semanas do início dos experimentos, foi avaliada a porcentagem de indução de calos ( $n^\circ$  total de calos/ $n^\circ$  total de explantes x 100%). Os calos provenientes dos tratamentos foram cortados e homogeneizados, e posteriormente foram mantidos a  $-80^\circ\text{C}$  para análise de compostos do metabolismo primário e secundário.



**Figura 6:** A) Plântula de *C. fissilis* com 8 semanas de idade. A localização dos explantes está indicada pelas letras: a) ápice; b) folha; c) cotilédone; d) nó cotiledonar; e) hipocótilo; f) raiz. B) Detalhe dos explantes: a) folha; b) cotilédone. C) Detalhe dos explantes: a) segmento foliar; b) segmento cotiledonar; c) segmento de hipocótilo; d) segmento de raiz; e) segmento apical; f) segmento nodal cotiledonar (PILATTI, 2011).

#### 4.6 ANÁLISES QUANTITATIVAS DE PROTEÍNAS TOTAIS, AÇÚCARES SOLÚVEIS TOTAIS E AMIDO EM CALOS DE *Cedrela fissilis*

##### 4.6.1 Efeito de diferentes concentrações de sacarose e de glutamina em relação ao conteúdo de metabólitos primários e secundários de calos de *Cedrela fissilis*

Segmentos nodais cotiledonares medindo aproximadamente 5 mm de comprimento foram excisados de plântulas axênicas de *C. fissilis* com 8 semanas de idade [(Figura 6 –(A)-d)], obtidas conforme citado no item 4.4, e inoculados em meio de cultura preparado conforme descrito

no item 4.3, suplementado com 59 mM ou 118 mM de sacarose, com 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP, 5  $\mu\text{M}$  de ANA. Para testar os efeitos da glutamina foram observados através da suplementação do meio com 0, 2,73 mM ou 5,46 de glutamina. As culturas foram mantidas nas condições descritas no item 4.4. Após 8 semanas do início dos experimentos os calos foram coletados para as análises dos metabólitos primários e secundários e para a análise da porcentagem de calogênese. Foram utilizadas no mínimo 20 repetições por tratamento para as análises, totalizando 6 tratamentos.

#### **4.6.2 Efeito de diferentes fontes de carbono e das concentrações de BAP e ANA em relação ao conteúdo de metabólitos primários e secundários de calos de *Cedrela fissilis***

Segmentos nodais cotiledonares medindo aproximadamente 5 mm de comprimento foram excisados de plântulas axênicas de *C. fissilis* com 8 semanas de idade, obtidas conforme citado no item 4.4. Os nós cotiledonares, contendo duas gemas axilares cada, foram inoculados no meio de cultura descrito em 4.3, suplementado com 118 mM de sacarose, frutose ou glucose, 2,73 mM de glutamina e os reguladores de crescimento BAP nas concentrações de 2,5 e 5,0  $\mu\text{M}$  em combinação com concentrações de 2,5 e 5,0  $\mu\text{M}$  de ANA. As culturas foram mantidas nas condições descritas no item 4.4. Após 8 semanas do início dos experimentos os calos foram coletados para as análises dos metabólitos primários e secundários e para a análise da porcentagem de calogênese. Foram utilizadas no mínimo 20 repetições por tratamento para as análises, totalizando 12 tratamentos.

#### **4.6.3 Efeito de diferentes explantes, fontes de carbono, presença e ausência de luz e da glutamina sobre o crescimento e acúmulo de metabólitos primários e secundários em calos de *Cedrela fissilis***

Segmentos de raiz, hipocótilo, nó cotiledonar, nó foliar, cotilédone, folha e epicótilo medindo aproximadamente 5 mm de comprimento foram excisados de plântulas axênicas de *C. fissilis* com 8 semanas de idade obtidas conforme citado no item 4.4, e inoculados em meio de cultura preparado conforme descrito no item 4.3, suplementado com 118 mM de sacarose, frutose ou glucose, 0 ou 2,73  $\mu\text{M}$  de glutamina, presença ou ausência de luz em 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP, 5  $\mu\text{M}$  de ANA. Foram inoculados 2 segmentos por tubo de ensaio de raiz, hipocótilo, nó cotiledonar, nó foliar, cotilédone e folha e 1 segmento por



tubo de ensaio de epicótilo, sendo que cada tratamento foi constituído de 25 repetições por tratamento, totalizando 84 tratamentos. As culturas foram mantidas nas condições descritas no item 4.4 e no tratamento de escuro os tubos de ensaio contendo os explantes foram envoltos em papel alumínio. Após 8 semanas do início dos experimentos, foi avaliada a porcentagem de indução de calos ( $n^\circ$  total de calos/ $n^\circ$  total de explantes x 100%). Os calos provenientes dos tratamentos foram cortados e homogeneizados, e posteriormente foram mantidos a  $-80^\circ\text{C}$  para análise de compostos do metabolismo primário e secundário.

#### 4.6.4 Preparo das amostras e relação massa fresca/ massa seca

O extrato para a quantificação dos compostos foi preparado a partir de 1 g (massa fresca) para 8 mL de solvente extrator (metabólitos primários) e 10 mL de solvente extrator (metabólitos secundários). A concentração do extrato corresponde a 100 mg de extrato fresco (equivale a 10 mg de extrato seco). As análises dos conteúdos de proteínas solúveis totais, açúcares solúveis totais, amido, carotenoides, compostos fenólicos, flavonoides, clorofila e a atividade antioxidante pela inibição do radical (DPPH) foram realizadas a partir de  $n=5$ .

Para a obtenção da relação massa fresca/massa seca (MF/MS), o teor de água dos calos foi expresso em porcentagem da massa fresca e em mg de água por mg de massa seca, determinados através da seguinte fórmula (LAUDANO, 2005):

Teor de água (% da massa fresca) =  $(\text{massa fresca} - \text{massa seca}) / \text{massa fresca} \times 100$ .

##### 4.6.4.1 Proteínas Solúveis totais:

Os extratos foram preparadas segundo Santos *et al.*, (2010), com modificações. Os calos crescidos conforme descrito nos itens 4.6.1; 4.6.2; 4.6.3 foram maceradas em 8 mL de água, permanecendo em repouso por 30 minutos. Em seguida, o macerado foi aquecido em banho-maria a  $40^\circ\text{C}$  por 30 minutos, sendo transferidos para tubos Falcon, onde foram centrifugadas por 20 minutos, a 4.000 g. Para a quantificação das proteínas solúveis totais, alíquotas de 0,02 mL deste extrato, foram adicionadas a 0,2 mL do reagente de Bradford (1976). Após 20 min, procedeu-se a leitura das amostras a 595 nm em leitor de microplacas. A quantificação das proteínas solúveis totais foi feita a partir da curva padrão de albumina de soro bovino (BSA) (10 a 250 mg.

$L^{-1}$ -  $r^2 = 0,99$ ;  $y = 0,0027x$ ). Os resultados foram expressos em mg de BSA por g de massa seca.

#### 4.6.4.2 Açúcares solúveis totais (AST)

A metodologia descrita por Yemm & Willis (1954) foi utilizada para determinar o teor de açúcares solúveis totais (AST). Dos extratos de calos que foram preparados no item 4.6.4.1 (4.6.1; 4.6.2; 4.6.3) foram retiradas alíquotas de 0,02 mL, sendo adicionados a 0,98 mL de água destilada e 2 mL do reagente antrona ( 20 mg de antrona, 0,5 mL de água destilada e 10 mL de ácido sulfúrico concentrado) em tubos de ensaio, sendo agitados em vórtex e aquecidos em banho-maria a 100° C por 5 minutos. Após, procedeu-se a leitura das amostras a 620 nm em leitor de microplacas. A quantificação dos AST foi feita a partir da curva padrão de glucose (1 a 10 mg.  $mL^{-1}$ -  $r^2 = 0,99$ ;  $y = 0,340x$ ). Os resultados foram expressos em mg de glucose por g de massa seca.

#### 4.6.4.3 Amido

A metodologia descrita por Yemm & Willis (1954), foi utilizada para determinar o teor de amido. Ao resíduo da centrifugação do extrato bruto estabelecido conforme o item 4.6.4.1 (4.6.1; 4.6.2; 4.6.3), foram adicionados 2 mL de ácido perclórico 30 % (v/v), que permaneceu em repouso por 1 hora. Deste extrato, foi coletado 0,02 mL, sendo acrescido 0,98 mL de água destilada e 2 mL do reagente antrona. Coletou-se 0,02 mL deste resíduo, sendo adicionados 0,98 mL de água destilada e 2 mL do reagente antrona. Esta solução foi agitada em vórtex e aquecida em banho-maria a 100 ° C por 5 minutos. Após, procedeu-se a leitura das amostras a 620 nm em leitor de microplacas. A quantificação do teor de amido foi feita a partir da curva padrão de glucose (1 a 10 mg.  $mL^{-1}$ -  $r^2 = 0,99$ ;  $y = 0,340x$ ). Os resultados foram expressos em mg de glucose por g de massa seca.

### 4.7 ANÁLISES QUANTITATIVAS DE FENÓLICOS TOTAIS, FLAVONOIDES TOTAIS, CAROTENOIDES E CLOROFILA EM CALOS DE *Cedrela fissilis*

#### 4.7.1 Compostos fenólicos totais

As amostras de calos crescidos conforme itens 4.6.1; 4.6.2; 4.6.3, foram maceradas com 10 mL de metanol 80% (MeOH 80%). Após a

maceração, as amostras foram mantidas em repouso no escuro por 1 hora. Em seguida, as amostras foram filtradas sob vácuo.

A determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais foi feita de acordo com a metodologia descrita por Rhandir *et al.* (2002). Em um tubo de ensaio, foi adicionado 1 mL do extrato metanólico (metanol 80%) de cada amostra e 5 mL de metanol 95%, seguido de agitação no vórtex. Dessa solução, foi retirado 1 mL e a este adicionaram-se 5 mL de água ultrapura, 1 mL de etanol 95% e 0,5 mL do reativo de Folin- Ciocalteu, seguido de agitação e repouso de 5 minutos. Após, foi adicionado 1 mL de carbonato de sódio 5% (p/v), seguido de agitação e repouso de 1 hora em câmara escura. Em seguida procedeu-se a leitura das amostras a 725 nm em espectrofotômetro UV-Vis. A quantificação dos compostos fenólicos totais foi feita a partir da curva padrão de ácido gálico ( $50$  a  $800 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  –  $r^2 = 0,99$ ;  $y = 1,254x$ ). Os resultados foram expressos em  $\mu\text{g}$  de ácido gálico por g de massa seca.

#### 4.7.2 Flavonoides

A determinação do conteúdo de flavonoides totais foi feita de acordo com Zacarias *et al.*, (2007), com modificações. As amostras de calos estabelecidos nos itens 4.6.1; 4.6.2; 4.6.3 foram maceradas em 10 mL de metanol 80% (MeOH 80%) e foram mantidas em repouso (1 hora) em câmara escura. Os extratos foram filtrados sob vácuo. Uma alíquota de 0,5 mL de cada extrato foi utilizada para a determinação do conteúdo de flavonoides totais, na presença de 0,5 mL de solução de cloreto de alumínio (2% em metanol) e 2,5 mL de etanol. Após repouso de 1 hora, fez-se a leitura a 420 nm em espectrofotômetro UV-Vis. A quantificação dos flavonoides foi feita a partir da curva padrão de quercetina ( $0,5$  a  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  –  $r^2 = 0,99$ ;  $y = 0,009x$ ). Os resultados foram expressos em  $\mu\text{g}$  de quercetina por g de massa seca.

#### 4.7.3 Carotenoides

As amostras de calos crescidos conforme itens 4.6.1; 4.6.2; 4.6.3 foram maceradas em 10 mL de solução hexano:acetona (50:50, v/v), contendo  $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de BHT (butil-hidroxi-tolueno). Após a maceração, as amostras foram mantidas em repouso (1 hora) em câmara escura, filtradas sob vácuo e o solvente evaporado sob fluxo de  $\text{N}_2$  gasoso. O extrato recuperado foi ressuspenso em 3 mL de metanol PA e posteriormente, submetido à espectrofotometria UV-Vis (Hiatchi U-

1800) para determinação do teor de carotenoides totais ( $\lambda = 450$  nm). A quantificação dos carotenoides totais utilizou de curva padrão-externa de  $\beta$ -caroteno (Sigma, 0,5 a 10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  -  $r^2 = 0,99$ ;  $y = 0,167x$ ). Os resultados foram expressos em  $\mu\text{g}$   $\beta$  - caroteno por g de massa seca.

#### 4.7.4 Dosagem de Clorofilas

A clorofila dos calos foi dosada conforme metodologia descrita por Hiscox & Israelstam (1979), com modificações. Calos crescidos conforme descrito nos itens 4.6.1; 4.6.2; 4.6.3, foram macerados com 10 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e mantidos em estufa a 45°C durante 45 minutos. Após a incubação, o extrato foi centrifugado a 3.000 rpm e em seguida, a absorbância foi lida em espectrofotômetro UV-vis, em 645 e 663 nm. Para a quantificação das clorofilas foi utilizada a Fórmula de Arnon (1949):

$$\text{mg}\cdot\text{mL de clorofila } a = 0,0127\cdot D_{663} - 0,00269\cdot D_{645}$$

$$\text{mg}\cdot\text{mL de clorofila } b = 0,0229\cdot D_{645} - 0,00468\cdot D_{663}$$

Os resultados foram expressos em  $\mu\text{g}$  de clorofila por mL de extrato.

### 4.8 PERFIL METABÓLICO POR ESPECTROFOTOMETRIA DE VARREDURA UV-VIS DE CALOS DE *C. fissilis*

#### 4.8.1 Efeito de diferentes combinações de concentrações de sacarose e de glutamina sobre os perfis metabólicos de extratos de calos de *Cedrela fissilis*

Calos crescidos conforme item 4.6.1, em meio de cultura MS, semi-sólido, suplementado com 59 mM ou 118 mM de sacarose, com 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP, 5  $\mu\text{M}$  de ANA e a suplementação de 0; 2,73 ou 5,46 mM de glutamina foram preparados para posteriores análises.

Para a espectrofotometria de varredura UV-Vis, 1 g de massa fresca foram maceradas em 10 mL de solução hexano:acetona (50:50, v/v), contendo 100  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de BHT (butil-hidroxi-tolueno). Após a maceração, as amostras foram mantidas em repouso (1 hora) em câmara escura, filtradas sob vácuo e o solvente evaporado sob fluxo de  $\text{N}_2$  gasoso. O extrato recuperado foi ressuspensão em 3 mL de metanol (PA) e posteriormente, submetido à varredura por espectrofotometria UV-Vis (Hiatachi U-1800). Em cubeta de vidro, 3 mL de cada amostra foram submetidos a 5 varreduras em espectrofotômetro UV-vis (200 – 800 nm). Os valores de absorbância obtidos foram plotados em planilha do

Microsoft Office Excel 2007 e um gráfico foi gerado a partir da média dos valores obtidos nas varreduras.

#### **4.8.2 Efeito de diferentes fontes de carbono e de combinações de concentrações de BAP e ANA sobre os perfis metabólicos de extratos de calos de *Cedrela fissilis***

Calos crescidos conforme item 4.6.2, em meio de cultura, suplementado com 118 mM de sacarose, frutose ou glicose, 2,73 mM de glutamina e os reguladores de crescimento BAP nas concentrações de 2,5 e 5,0  $\mu\text{M}$  em combinação com concentrações de 2,5 e 5,0  $\mu\text{M}$  de ANA foram preparados para posteriores análises.

Para a espectrofotometria de varredura UV-Vis, 1 g de massa fresca foram maceradas em 10 mL de solução hexano:acetona (50:50, v/v), contendo 100  $\text{mg.L}^{-1}$  de BHT (butil-hidroxi-tolueno). Após a maceração, as amostras foram mantidas em repouso (1 hora) em câmara escura, filtradas sob vácuo e o solvente evaporado sob fluxo de  $\text{N}_2$  gasoso. O extrato recuperado foi ressuspense em 3 mL de metanol (PA) e posteriormente, submetido à varredura por espectrofotometria UV-Vis (Hiatachi U-1800). Em cubeta de vidro, 3 mL de cada amostra foram submetidos a 5 varreduras em espectrofotômetro UV-vis (200 – 800 nm). Os valores de absorbância obtidos foram plotados em planilha do Microsoft Office Excel 2007 e um gráfico foi gerado a partir da média dos valores obtidos nas varreduras.

#### **4.8.3 Efeito de fontes de carbono, tipos de explantes, glutamina e presença e ausência de luz sobre os perfis metabólicos de extratos de calos de *Cedrela fissilis***

Calos crescidos conforme item 4.6.3, em meio de cultura MS, semi-sólido, suplementado com 118 mM de sacarose, frutose ou glicose, 0 ou 2,73 mM de glutamina na luz com 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA, foram selecionados e mantidos em nitrogênio líquido até o momento do preparo das amostras.

Para a espectrofotometria de varredura UV-Vis, 1 g de massa fresca foram maceradas em 10 mL de solução hexano:acetona (50:50, v/v), contendo 100  $\text{mg.L}^{-1}$  de BHT (butil-hidroxi-tolueno). Após a maceração, as amostras foram mantidas em repouso (1 hora) em câmara escura, filtradas sob vácuo e o solvente evaporado sob fluxo de  $\text{N}_2$  gasoso. O extrato recuperado foi ressuspense em 3 mL de metanol (PA) e posteriormente, submetido à varredura por espectrofotometria UV-Vis

(Hiatachi U-1800). Em cubeta de vidro, 3 mL de cada amostra foram submetidos a 5 varreduras em espectrofotômetro UV-vis (200 – 800 nm). Os valores de absorvância obtidos foram plotados em planilha do Microsoft Office Excel 2007 e um gráfico foi gerado a partir da média dos valores obtidos nas varreduras.

#### 4.9 ANÁLISES QUALITATIVAS POR CLAE DE CAROTENOIDES DE CALOS DE *Cedrela fissilis*

Os extratos provenientes dos tratamentos: raiz, hipocótilo, nó cotiledonar, nó foliar, cotilédone, folha e epicótilo cultivados em concentração de 118 mM de sacarose, frutose ou glicose, 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP, 5  $\mu\text{M}$  de ANA, 0 ou 2,73 mM de glutamina, sendo todos os tratamentos cultivados na presença de luz, foram selecionados para determinação do perfil carotenóidico via Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

A saponificação dos extratos selecionados para CLAE foram realizados através da adição de 100  $\mu\text{L}$  da solução metanólica de hidróxido de potássio 10% a 1 mL de extrato carotenóidico, durante três horas, a temperatura ambiente e em local protegido da luz. Após este período, as amostras foram lavadas em funil de separação (por quatro vezes com água ultrapura). A fração remanescente foi transferida para frasco âmbar, seguido da remoção do solvente sob fluxo de  $\text{N}_2$  gasoso e ressuspensão em 200  $\mu\text{L}$  de hexano.

Alíquotas de 10  $\mu\text{L}$  de cada amostra foram analisadas em cromatógrafo líquido (Shimzadu LC – 10A), equipado com coluna de fase reversa  $\text{C}_{18}$  (Vydac 201TP54, 25 cm x 4,6 mm $\varnothing$  interno) e pré-coluna (Vydac 218GK54, 5  $\mu\text{m}$ ) e detector espectrofotométrico UV-Vis operando em 450 nm. A eluição utilizou metanol: acetonitrila (90:10, v/v) como fase móvel, fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>. A identificação dos compostos de interesse foi realizada através de comparação com os tempos de retenção dos compostos padrões (luteína, zeaxantina,  $\beta$  e  $\alpha$  – caroteno, Sigma), sob as mesmas condições experimentais. A quantificação dos carotenoides foi feita utilizando-se curva padrão externa de luteína (2,5 a 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  -  $r^2 = 0,99$ ;  $y = 7044x$ ) e  $\beta$  – caroteno (0,01 a 5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  -  $r^2 = 0,99$ ;  $y = 1019x$ ) e considerou a área dos picos de interesse para efeito dos cálculos de concentração, sendo que os valores apresentados correspondem à média de 3 injeções por amostra. A concentração de carotenoides foi expressa em  $\mu\text{g}$  por g de massa seca.

## 5. ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE CALOS DE *Cedrela fissilis*

### 5.1 INIBIÇÃO DO RADICAL DPPH (1,1-DIFENIL-2-PICRILHIDRAZIL)

A fim de avaliar a capacidade antioxidante, extratos metanólicos de calos obtidos conforme descrito nos itens 4.6.1; 4.6.2; 4.6.3 (extrato equivalente a 10 mg de extrato seco), foram submetidos ao teste do DPPH<sup>•</sup>. Este modelo é baseado na capacidade do radical livre estável 1,1-difenil-2-picrilhidrazil em reagir com substâncias doadoras de hidrogênio ( $\text{DPPH}^{\bullet} + \text{AH} \rightarrow \text{DPPH-H} + \text{A}^{\bullet}$ ), incluindo compostos fenólicos (ROGINSKY & LISSI, 2005), sendo um método amplamente utilizado e relativamente rápido quando comparado a outras técnicas (SÁNCHEZ-MORENO *et al.* 1998; MENSOR *et al.* 2001). O consumo de DPPH<sup>•</sup> é, portanto, um índice para estimar a capacidade antioxidante na captura de radicais livres presentes no meio. No ensaio espectrofotométrico, a absorvância diminui como resultado de uma alteração na coloração, de violeta para amarelo, uma vez que o radical é capturado por antioxidantes presentes no extrato através da doação de um átomo de H para formar a molécula estável DPPH-H (ESPÍN *et al.*, 2000).

A metodologia utilizada foi descrita por Kim *et al.* (2002). Uma alíquota de 290  $\mu\text{L}$  da solução metanólica do radical DPPH (Sigma, 0,1 mM em metanol 80%) foi acrescida de 10  $\mu\text{L}$  da amostra (em metanol 80%). O decréscimo da absorvância em 530 nm foi medido em leitora de microplacas após 30 minutos de incubação da amostra. O BHT foi utilizado como padrão.

A atividade de seqüestro do radical DPPH foi calculada pela equação abaixo:

$$\% \text{ de inibição: } \frac{[\text{Abs controle} - \text{Abs final da amostra}]/ \text{Abs controle}] \times 100}{}$$

### 5.2 ANÁLISES HISTOQUÍMICA DE CALOS DE *Cedrela fissilis*

Segmentos de raiz, hipocótilo, nó cotiledonar, nó foliar, cotilédone, folha e epicótilo medindo aproximadamente 5 mm de comprimento foram excisados de plântulas axênicas de *C. fissilis* com 8 semanas de idade obtidas conforme citado no item 4.4, e inoculados em meio de cultura preparado conforme descrito no item 4.3, suplementado com 118 mM de glucose, 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP, 5  $\mu\text{M}$  de ANA. No

tratamento de escuro os tubos de ensaio contendo os explantes foram envoltos em papel alumínio. Os efeitos da glutamina foram observados através da suplementação do meio com glutamina na concentração de 2,73 mM. Foram inoculados 2 segmentos por tubo de ensaio de raiz, hipocótilo, nó cotiledonar, nó foliar, cotilédone e folha e 1 segmento por tubo de ensaio de epicótilo, sendo que cada tratamento foi constituído de 25 repetições. As culturas foram mantidas nas condições descritas no item 4.4. Após 8 semanas do início dos experimentos, os calos provenientes dos tratamentos, foram cortados e homogeneizados para a análise histoquímica.

### **5.2.1 Análise em microscopia de luz (ML)**

As amostras dos diferentes tratamentos foram processadas para análises histoquímica e morfológica em microscopia de luz e histoquímica. Fragmentos dos calos foram fixados em solução de paraformaldeído 2.5 % em tampão fosfato 0.1 M, pH 7.2, *overnight* (Schmidt *et al.*, 2009). Após a fixação, as amostras foram lavadas e desidratadas em séries crescentes de etanol. Após a desidratação, as amostras foram infiltradas em historesina (Leica Historesin, Heidelberg, Alemanha). Secções com 5 µm de espessura foram corados com diferentes testes citoquímicos e fotografados com o microscópio Epifluorescent (Olympus BX 41), equipado com o sistema de captura Image Q Capture Pro 5.1 Software (Qimaging Corporation, Austin, TX, Estados Unidos da América).

### **5.2.2 Testes citoquímicas**

As secções dos diferentes tratamentos foram coradas com os seguintes citoquímicas: a dupla marcação com Ácido Periódico de Schiff (PAS) utilizado para identificar a presença de polissacarídeos neutros (Schmidt *et al.*, 2012) e Azulbrilhante de Coomassie (CBB) para identificar a presença de proteínas totais (Schmidt *et al.*, 2012), e Azul de Toluidina (AT-O) para identificar polissacarídeos ácidos através da reação de metacromasia (Schmidt *et al.*, 2010).



## 6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os experimentos foram montados de acordo com o delineamento estatístico completamente casualizado. Os resultados foram analisados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA) simples ou multifatorial com separação de médias pelo teste de Tukey. As análises foram feitas considerando um intervalo de confiança de 95% e nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ). As análises de variância foram realizadas no programa STATISTICA 7.0 (StatSoft, Inc.).

## 7. RESULTADOS

Os resultados descritos a seguir referem-se aos experimentos conduzidos para verificar os efeitos de diferentes fatores como tipos e concentrações de fontes de carbono, concentrações de glutamina, combinações de diferentes concentrações de BAP e ANA, tipos de explantes, presença e ausência de luz sobre a indução e morfogênese dos calos, teores de metabólitos primários, teores de metabólitos secundários e atividade antioxidante de extratos de calos de *C. fissilis*.

Nos experimentos conduzidos por Pilatti (2011) ficou evidenciado que nós cotiledonares cultivados na presença de 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA produziam calos com biomassa considerável para as análises bioquímicas. Assim, no presente de trabalho, para cada parâmetro estudado e apresentado abaixo (indução e morfogênese de calos, análises de metabólitos primários, análises de metabólitos secundários e análises da atividade antioxidante dos calos) os resultados dos experimentos realizados serão apresentados na seguinte sequência: primeiramente, os experimentos com nós cotiledonares cultivados nas concentrações de 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA, para verificar o efeito das concentrações de sacarose e glutamina. Esses experimentos indicaram que a concentração de 118 mM de sacarose e 2,73 mM ou 5,46 mM de glutamina produziram os maiores níveis de metabólitos secundários. Assim sendo, em seguida, são apresentados os resultados dos experimentos, ainda com nós cotiledonares, em que foram manipulados os tipos de fontes de carbono, agora na concentração de 118 mM e com 2,73 mM de glutamina, e as diferentes concentrações de BAP e ANA. Como esses experimentos indicaram que as maiores concentrações de metabólitos secundários ocorria em outras combinações de BAP e ANA, que não a que propiciava o maior crescimento dos calos (2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA), o que poderia comprometer a disponibilidade de biomassa de calos para as análises posteriores, essa combinação de reguladores de crescimento, assim com a concentração de 2,73 mM de glutamina foram escolhidas para tentar otimizar a produção dos metabólitos secundários, agora através da manipulação dos tipos de explante, fontes de carbono, presença e ausência de luz e presença e ausência de glutamina. Por essa razão, para os itens apresentados em resultados indução e morfogênese, análises quantitativas de metabólitos primários, análises quantitativas de metabólitos secundários, atividade antioxidante de extratos de calos os

experimentos serão apresentados na seguinte sequência: efeito de concentrações de sacarose e glutamina, efeito de fontes de carbono e combinações de concentrações de BAP e ANA e efeito de fontes de carbono, tipos de explante, presença e ausência de luz e de glutamina. As análises quantitativas e qualitativas de carotenoides por CLAE foram realizadas apenas para os experimentos em que foram manipuladas fontes de carbono, tipos de explantes, presença e ausência de luz e de glutamina.

## 7.1 INDUÇÃO E MORFOGÊNESE DE CALOS DE *C. fissilis* EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTURA

### 7.1.1. Efeito de diferentes combinações de concentrações de sacarose e de glutamina sobre a indução de calos originados a partir de nós cotiledonares de plântulas de *Cedrela fissilis*

Os experimentos cujos resultados são apresentados na tabela 1 visaram analisar o efeito de diferentes concentrações de sacarose em combinação com diferentes concentrações de glutamina sobre a iniciação de calos, a partir de um tipo de explante, nós cotiledonares, que seriam utilizados, na sequência, nas análises dos metabólitos primários, secundários e atividade antioxidante em calos produzidos nessas condições de cultivo. Nesses experimentos foram mantidas as concentrações de 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA, condições essas que em experimentos preliminares, realizados com nós cotiledonares, garantiram altas taxas de indução e formação de biomassa significativa para as análises posteriores.

Os resultados da Tabela 1 indicam que, na concentração de 59 mM de sacarose e na presença de 5,46 mM de glutamina, apenas 45% dos nós cotiledonares formaram calos. Em todos os outros experimentos as porcentagens de indução variaram de 70% a 85%, sendo que apenas nos tratamentos de 58 mM e de 118 mM, sem glutamina, de 33,3% a 42,8% dos calos formaram raízes.

**Tabela 01:** Efeito de concentrações de sacarose e glutamina sobre a indução e morfogênese de calos de *Cedrela fissilis* cultivados, durante 8 semanas, a partir de nós cotiledonares em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 2,5  $\mu$ M de BAP e 5  $\mu$ M de ANA.

Sacarose (mM)	Glutamina (mM)	Número de explantes inoculados	Calogênese (%)	Calos com raízes (%)	Formação de raízes (%)
59	0	40	85	42,8	0
59	2,73	40	70	0	0
59	5,46	40	45	0	0
118	0	40	85	33,3	0
118	2,73	40	75	0	0
118	5,46	40	70	0	0

### 7.1.2. Efeito de diferentes fontes de carbono e de combinações de concentrações de BAP e ANA sobre a indução de calos originados a partir de nós cotiledonares de plântulas *Cedrela fissilis*

Os experimentos, cujos resultados são apresentados a seguir foram conduzidos com nós cotiledonares, com a concentração fixa de glutamina de 2,73 mM e foram manipuladas as fontes de carbono, na concentração de 118 mM e diferentes combinações de concentrações de BAP e ANA.

Os resultados da tabela 2 indicam que, em todas as combinações de BAP e ANA testadas, exceto para os tratamentos com sacarose, as taxas de indução de calos foram de 100%. Na presença de sacarose, contudo as porcentagens de indução variaram entre 65% e 95 %. Apenas nos tratamentos com sacarose foi observada a formação de raízes nos calos produzidos (entre 14,2% e 15% dos explantes inoculados), em todas as combinações de concentrações BAP e ANA testadas.

**Tabela 02:** Efeito de fontes de carbono e de combinações de BAP e ANA sobre a indução e morfogênese de calos de *Cedrela fissilis* cultivados, durante 8 semanas, a partir de nós cotiledonares em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com suplementado com 2,73 mM de glutamina.

Fontes de carbono	BAP (µM)	ANA (µM)	Número de explantes inoculados	Calogênese (%)	Calos com raízes (%)
Sacarose	2,5	5,0	40	85	14,2
	5,0	2,5	40	95	14,2
	2,5	2,5	40	85	14,2
	5,0	5,0	40	65	15
Frutose	2,5	5,0	40	100	0
	5,0	2,5	40	100	0
	2,5	2,5	40	100	0
	5,0	5,0	40	100	0
Glucose	2,5	5,0	40	100	0
	5,0	2,5	40	100	0
	2,5	2,5	40	100	0
	5,0	5,0	40	100	0

### 7.1.3. Efeito de fontes de carbono, tipos de explantes, glutamina e presença e ausência de luz sobre a indução de calos de *Cedrela fissilis*

Os experimentos, cujos resultados são descritos a seguir, foram realizados com o objetivo de verificar as porcentagens de indução e a morfogênese de calos produzidos, após 8 semanas de cultivo, a partir de diferentes tipos de explantes cultivados em meio de cultura MS, suplementado com 118 mM de sacarose, glucose ou frutose, 2,73 mM de glutamina, 2,5 µM de BAP, 5 µM de ANA e 0,2% de Phytigel (Sigma). As concentrações de fontes de carbono e de reguladores de crescimento utilizadas, assim como as concentrações de glutamina foram aquelas que propiciaram os maiores valores de indução de calos e de biomassa seca dos calos produzidos a partir de nós cotiledonares, de acordo com os resultados obtidos preliminarmente por Pilatti (2011). Tais condições foram selecionadas para verificar que efeitos as fontes de carbono, presença e ausência de glutamina, luz e escuro teriam sobre a indução de calos, agora em outros tipos de explantes, obtidos a partir da

folha, nó foliar, cotilédone, hipocótilo, raiz e epicótilo. Posteriormente, os calos produzidos foram utilizados para as análises dos metabólitos primários, secundários e atividade antioxidante.

#### 8.1.3.1. Efeito da sacarose sobre a indução de calos de *Cedrela fissilis*

Os resultados da tabela 3 indicam que porcentagens de indução de calos acima de 80% foram observadas para explantes de nó cotiledonar, nó foliar e hipocótilo, na luz e para nó cotiledonar, hipocótilo e epicótilo, no escuro, tanto na presença como na ausência de glutamina. Os menores valores de indução de calos  $\leq 50\%$  foram observados, tanto na luz como no escuro para explantes de folha e cotilédone. Para raiz, na luz, a ausência de glutamina promoveu a formação de calo (60%), enquanto que no escuro a presença de glutamina é que promoveu a indução (50%). No escuro, parece ter havido um efeito promotor da glutamina sobre a indução de calos de folha, cotilédone e de raiz. As menores porcentagens de indução com glucose ocorreram com explantes de cotilédone, em glutamina (22%) e com explantes de folha, sem glutamina (23,3%). No escuro, as menores porcentagens de indução foram observadas com explantes de folha, tanto na ausência (13,%) como na presença de glutamina (33%).

Quanto à morfogênese verifica-se pela tabela 3 que, na luz, apenas os explantes de nó foliar e epicótilo formaram raízes enquanto que no escuro a rizogênese ocorreu nos calos de nó cotiledonar, folha, nó foliar, cotilédone e epicótilo. Assim, a formação de raízes nos calos foi observada tanto na presença, quanto na ausência de luz, sendo que na luz, o tratamento que apresentou maior porcentagem de rizogênese foi o nó foliar com glutamina (24%).

**Tabela 03:** Efeito da sacarose, luz, escuro, tipo de explante e glutamina sobre a indução e morfogênese de calos de *Cedrela fissilis* cultivados durante 8 semanas em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de sacarose, 0 ou 2,73 mM de glutamina, 2,5  $\mu$ M de BAP e 5  $\mu$ M de ANA.

Condição de cultura	Tipo de explante	Glutamina (mM)	Número de explantes inoculados	Calogênese (%)	Calos com raízes (%)	
Luz	Nó cotiledonar	0	15	93,3	0	
		2,73	25	84	0	
	Folha	0	30	23,3	0	
		2,73	50	-	-	
	Nó foliar	0	15	100	6,6	
		2,73	25	80	24	
	Cotilédone	0	30	33,3	0	
		2,73	50	22	2	
	Hipocótilo	0	30	100	0	
		2,73	50	100	0	
	Raiz	0	30	60	0	
		2,73	50	46	0	
	Epicótilo	0	15	73,3	13,3	
		2,73	25	84	0	
	Escuro	Nó cotiledonar	0	15	93,3	0
			2,73	25	88	8
Folha		0	30	13,3	3,3	
		2,73	50	32	0	
Nó foliar		0	15	53,3	0	
		2,73	25	68	16	
Cotilédone		0	30	33,3	3,3	
		2,73	50	64	8	
Hipocótilo		0	30	90	0	
		2,73	50	88	0	
Raiz		0	30	36,6	0	
		2,73	50	50	0	
Epicótilo		0	15	100	13,3	
		2,73	25	92	0	

### 7.1.3.2. Efeito da frutose sobre a indução de calos de *Cedrela fissilis*

Os resultados da tabela 4 indicam que porcentagens de indução de calos acima de 92% ocorreram na maioria dos tratamentos, independente do tipo de explante, da presença ou ausência de luz ou de glutamina. Apenas explantes de folha, cotilédone, na luz, na presença de glutamina e de cotilédone, no escuro, também na presença de glutamina apresentaram as menores taxas de indução, que variaram entre 74 e 76%.

Quanto à morfogênese dos calos os resultados indicam que, na luz, foi observada a formação de raízes em alguns tratamentos, sendo que a maior porcentagem de calos com raízes (23%) ocorreu em explantes de folhas. No escuro, entretanto, calos oriundos de folhas e de cotilédones na ausência de glutamina apresentaram 100% e 56,6%, respectivamente, de rizogênese e calos de nó cotiledonar, folha, nó foliar e cotilédone formaram raízes na presença e na ausência de glutamina. Calos de epicótilo e raiz não apresentaram rizogênese, na luz ou no escuro.



**Tabela 04:** Efeito da frutose, luz, escuro, tipo de explante e glutamina sobre a indução e morfogênese de calos de *Cedrela fissilis* cultivados durante 8 semanas em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de sacarose, 0 ou 2,73 mM de glutamina, 2,5  $\mu$ M de BAP e 5  $\mu$ M de ANA.

Condição de cultura	Tipo de explante	Glutamina (mM)	Número de explantes inoculados	Calogênes e (%)	Calos com raízes (%)	
Luz	Nó cotiledonar	0	15	100	3,3	
		2,73	25	100	0	
	Folha	0	30	100	23,3	
		2,73	50	74	8	
	Nó foliar	0	15	100	0	
		2,73	25	100	4	
	Cotilédone	0	30	100	13,3	
		2,73	50	76	8	
	Hipocótilo	0	30	100	0	
		2,73	50	100	0	
	Raiz	0	30	93,3	0	
		2,73	50	100	0	
	Epicótilo	0	15	100	0	
		2,73	25	96	0	
	Escuro	Nó cotiledonar	0	15	100	13,3
			2,73	25	100	4
Folha		0	30	100	100	
		2,73	50	92	38	
Nó foliar		0	15	100	20	
		2,73	25	100	4	
Cotilédone		0	30	100	56,6	
		2,73	50	76	34	
Hipocótilo		0	30	100	3,3	
		2,73	50	100	0	
Raiz		0	30	100	0	
		2,73	50	100	0	
Epicótilo		0	15	100	0	
		2,73	25	100	0	

### 7.1.3.3. Efeito da glucose sobre a indução de calos de *Cedrela fissilis*

Os resultados da tabela 5 indicam que, na presença de glucose, as taxas de indução de calos na luz foram de 100%, na maioria dos tratamentos, exceto para explantes de folha, cotilédone, raiz e epicótilo, na presença de glutamina. No escuro, as porcentagens de indução abaixo de 100% (entre 76% e 92%) foram observadas para explantes de folha, cotilédones e raiz, com glutamina.

Quanto à morfogênese dos calos em glucose, os resultados indicam que, na luz, foi observada a formação de raízes em 42 a 50% dos calos produzidos a partir de explantes de folha e cotilédone, tanto na ausência como na presença de glutamina. No escuro, entre 66% e 86% dos calos originados de segmentos de folhas apresentaram rizogênese, independente da presença de glutamina, enquanto que os valores foram de 33,3% a 58% para os calos produzidos a partir de cotilédone. Calos de nó cotiledonar na luz, não apresentaram rizogênese na ausência ou presença de glutamina, enquanto que no escuro apenas 13,3% formou raízes, mas somente na ausência de glutamina. No escuro apenas os calos de nó cotiledonar, de hipocótilo e epicótilo, na ausência de glutamina, não formaram raízes.

**Tabela 05:** Efeito da glucose, luz, escuro, tipo de explante e glutamina sobre a indução e morfogênese de calos de *Cedrela fissilis* cultivados durante 8 semanas em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de sacarose, 0 ou 2,73 mM de glutamina, 2,5  $\mu$ M de BAP e 5  $\mu$ M de ANA.

Condição de cultura	Tipo de explante	Glutamina (mM)	Número de explantes inoculados	Calogênese (%)	Calos com raízes (%)	
Luz	Nó cotiledonar	0	15	100	0	
		2,73	25	100	0	
	Folha	0	30	100	50	
		2,73	50	74	42	
	Nó foliar	0	15	100	0	
		2,73	25	92	8	
	Cotilédone	0	30	100	50	
		2,73	50	60	50	
	Hipocótilo	0	30	100	0	
		2,73	50	100	2	
	Raiz	0	30	100	0	
		2,73	50	84	16	
	Epicótilo	0	15	100	0	
		2,73	25	100	0	
	Escuro	Nó cotiledonar	0	15	100	13,3
			2,73	25	92	0
Folha		0	30	100	86,6	
		2,73	50	86	66	
Nó foliar		0	15	100	20	
		2,73	25	100	4	
Cotilédone		0	30	100	33,3	
		2,73	50	76	58	
Hipocótilo		0	30	100	10	
		2,73	50	100	0	
Raiz		0	30	100	3,3	
		2,73	50	90	8	
Epicótilo		0	15	100	0	
		2,73	25	100	4	

## 7.2 ANÁLISES QUANTITATIVAS DE PROTEÍNAS TOTAIS, AÇÚCARES SOLÚVEIS TOTAIS E AMIDO EM CALOS DE *Cedrela fissilis*

Os experimentos, cujos resultados são apresentados a seguir foram realizados com o objetivo de estudar o metabolismo primário dos calos de *C. fissilis* produzidos em condições de cultivo em que foram manipuladas, combinações de concentrações de sacarose e de glutamina, combinações de fontes de carbono e de diferentes combinações de concentrações BAP e ANA, e de fontes de carbono, tipos de explantes, presença e ausência de luz.

Nos experimentos em que foram estudados os efeitos das fontes de carbono, devido à grande quantidade de dados obtidos, os resultados são apresentados, para cada fonte de carbono, na forma de tabelas, para melhor visualização dos valores precisos de concentrações obtidos e das diferenças estatísticas entre todos os tratamentos conduzidos.

### **7.2.1. Efeito de diferentes combinações de concentrações de sacarose e de glutamina sobre os teores de proteínas totais, açúcares solúveis totais e amido em calos de *Cedrela fissilis***

Nos experimentos descritos a seguir foram quantificadas as proteínas totais, açúcares solúveis totais e amido em calos de *C. fissilis*, produzidos a partir de nós cotiledonares, após 8 semanas de cultivo, em meio de cultura MS suplementado 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP, 5  $\mu\text{M}$  de ANA, 0,2% de Phytigel (Sigma) e com concentrações de sacarose de 59 mM e 118 mM, em combinação com concentrações de glutamina de 0, 2,73 mM e 5,46 mM.

Os resultados da tabela 6 indicam que o maior teor de proteínas totais (10,81  $\mu\text{g/g}$  MS) foi detectado em calos produzidos em meio de cultura contendo 59 mM de sacarose em combinação com 5,46 mM de glutamina, enquanto que os maiores níveis de açúcares solúveis totais e amido (245,80  $\mu\text{g/g}$  MS e 113,24  $\mu\text{g/g}$  MS, respectivamente) foram observados nos calos produzidos na presença de 118 mM de sacarose e de 5,46 mM de glutamina. A menor concentração de proteínas totais (5,44  $\mu\text{g/g}$  MS) foi observada em calos cultivados com 59 mM de sacarose e na ausência de glutamina, enquanto que as menores concentrações de açúcares solúveis totais (85,70  $\mu\text{g/g}$  MS) e amido (38,59  $\mu\text{g/g}$  MS) ocorreram nos calos crescidos na presença de 59 mM de sacarose e 5,46 mM de glutamina.

**Tabela 06:** Efeito de concentrações de sacarose e glutamina sobre o conteúdo de proteínas totais, açúcares solúveis totais e amido de calos de *Cedrela fissilis* cultivados, durante 8 semanas, a partir de nós cotiledonares em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA. Em negrito os melhores tratamentos.

Sacarose (mM)	Glutamina (mM)	Proteínas totais ( $\mu\text{g/g MS}$ ) <sup>a</sup>	Açúcares solúveis totais ( $\mu\text{g/g MS}$ ) <sup>a</sup>	Amido ( $\mu\text{g/g MS}$ ) <sup>a</sup>
59	0	5,44 $\pm$ 0,04 e	48,20 $\pm$ 0,20 f	24,82 $\pm$ 0,16 f
59	2,73	6,57 $\pm$ 0,03 d	108,40 $\pm$ 0,30 d	42,47 $\pm$ 0,74 d
59	5,46	10,81 $\pm$ 0,03 a	85,70 $\pm$ 0,20 e	38,59 $\pm$ 0,38 e
118	0	7,49 $\pm$ 0,06 c	135,40 $\pm$ 0,30 c	77,65 $\pm$ 0,42 b
118	2,73	9,33 $\pm$ 1,05 b	152,50 $\pm$ 0,20 b	67,82 $\pm$ 0,26 c
118	5,46	8,13 $\pm$ 0,03 c	245,80 $\pm$ 0,10 a	113,24 $\pm$ 0,21 a

<sup>a</sup>Médias de no mínimo cinco repetições seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). MS= massa seca.

### 7.2.2 Efeito de diferentes fontes de carbono e de combinações de concentrações de BAP e ANA sobre os teores de proteínas totais, açúcares solúveis totais e amido em calos de *Cedrela fissilis*

Nesses experimentos foram quantificadas as proteínas totais, açúcares solúveis totais e amido em calos de *C. fissilis*, produzidos a partir de nós cotiledonares, após 8 semanas de cultivo, em meio de cultura MS suplementado com 118 mM de sacarose, frutose ou glucose, 2,73 mM de glutamina, 0,2% de Phytigel (Sigma) e com diferentes combinações de concentrações de BAP e ANA.

Os resultados da tabela 7 indicam que os maiores teores de proteínas totais (10,99  $\mu\text{g/g MS}$  e 11,06  $\mu\text{g/g MS}$ ) foram detectados em calos cultivados com sacarose, 5  $\mu\text{M}$  de BAP, e 5  $\mu\text{M}$  de ANA) e em frutose, com 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA, enquanto que os maiores níveis de açúcares solúveis totais e amido (199,71  $\mu\text{g/g MS}$  e 92,18  $\mu\text{g/g MS}$ , respectivamente) foram observados nos calos produzidos na presença de 118 mM de sacarose, 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 2,5  $\mu\text{M}$  de ANA. As menores concentrações de proteínas totais (1,07  $\mu\text{g/g MS}$  e 1,17  $\mu\text{g/g MS}$ ) foram observadas em calos cultivados com frutose, 2,5  $\mu\text{M}$  BAP e 2,5  $\mu\text{M}$  de ANA e com glucose, 5  $\mu\text{M}$  BAP e 2,5  $\mu\text{M}$  de ANA. A menor concentração de açúcares solúveis totais (21,12  $\mu\text{g/g MS}$ ) ocorreu em

calos cultivados em frutose, 5  $\mu\text{M}$  BAP e 2,5  $\mu\text{M}$  de ANA e os menores teores de amido dos calos (7,65  $\mu\text{g/g}$  MS e 7,20  $\mu\text{g/g}$  MS) foram detectados nos tratamentos com glucose, 5  $\mu\text{M}$  BAP em combinação com 2,5  $\mu\text{M}$  ou 5  $\mu\text{M}$  de ANA.

Com glucose o maior valor de proteínas totais (3,17  $\mu\text{g/g}$  MS) foi obtido em calos cultivados com 2,5  $\mu\text{M}$  BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA. A maior concentração de açúcares solúveis totais (157,18  $\mu\text{g/g}$  MS) dos calos cultivados em frutose ocorreu com 2,5  $\mu\text{M}$  BAP e 2,5  $\mu\text{M}$  de ANA e com glucose (112,82  $\mu\text{g/g}$  MS), em 5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA. O maior teor de amido dos calos cultivados em frutose (29,94  $\mu\text{g/g}$  MS) ocorreu nas combinações de concentração de 5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA e em glucose (22,88  $\mu\text{g/g}$  MS), em 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 2,5  $\mu\text{M}$  de ANA.

**Tabela 07.** Efeito de fontes de carbono e de combinações de BAP e ANA sobre conteúdo de proteínas totais, açúcares solúveis totais e amido de calos de *Cedrela fissilis* cultivados, durante 8 semanas, a partir de nós cotiledonares em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de sacarose, frutose ou glucose e 2,73 mM de glutamina. Em negrito os melhores tratamentos.

Fonte de carbono	BAP ( $\mu\text{M}$ )	ANA ( $\mu\text{M}$ )	Proteínas totais ( $\mu\text{g/g}$ MS) <sup>a</sup>	Açúcares solúveis totais ( $\mu\text{g/g}$ MS) <sup>a</sup>	Amido ( $\mu\text{g/g}$ MS) <sup>a</sup>
Sacrose	2,5	5,0	10,02 $\pm$ 0,02 c	122,94 $\pm$ 0,21e	69,29 $\pm$ 0,16 b
	5,0	2,5	9,77 $\pm$ 0,02 d	142,59 $\pm$ 0,13 d	45,47 $\pm$ 0,34 d
	2,5	2,5	10,31 $\pm$ 0,04 b	199,71 $\pm$ 0,36 a	92,18 $\pm$ 0,79 a
	5,0	5,0	11,06 $\pm$ 0,04 a	150,71 $\pm$ 0,26 c	61,06 $\pm$ 0,45 c
Frutose	2,5	5,0	10,99 $\pm$ 0,04 a	40,41 $\pm$ 0,49 i	25,06 $\pm$ 0,25 f
	5,0	2,5	9,53 $\pm$ 0,03 e	21,12 $\pm$ 0,48 j	11,41 $\pm$ 0,38 i
	2,5	2,5	1,07 $\pm$ 0,03 j	157,18 $\pm$ 0,34 b	24,00 $\pm$ 0,34 g
	5,0	5,0	2,07 $\pm$ 0,08 h	83,35 $\pm$ 0,61 h	29,94 $\pm$ 0,25 e
Glucose	2,5	5,0	3,17 $\pm$ 0,08 f <sup>d</sup>	83,94 $\pm$ 0,61 h	9,94 $\pm$ 0,25 j
	5,0	2,5	1,17 $\pm$ 0,02 j	85,00 $\pm$ 0,29 g	7,65 $\pm$ 0,29 k
	2,5	2,5	1,50 $\pm$ 0,08 i	83,47 $\pm$ 0,25 h	22,88 $\pm$ 0,25 h
	5,0	5,0	2,53 $\pm$ 0,02 g	112,82 $\pm$ 0,26 f	7,29 $\pm$ 0,44 k

<sup>a</sup>Médias de cinco repetições seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si de acordo, respectivamente, com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). MS= massa seca.

### **7.2.3. Efeito de fontes de carbono, tipos de explantes, glutamina e presença e ausência de luz sobre os teores de proteínas totais, açúcares solúveis totais e amido em calos de *Cedrela fissilis***

Nesses experimentos foram quantificadas as proteínas totais, açúcares solúveis totais e amido em calos de *C. fissilis*, produzidos, após 8 semanas de cultivo, a partir de diferentes tipos de explantes cultivados em meio de cultura MS, suplementado com 118 mM de sacarose, glucose ou frutose, 2,73 mM de glutamina, 2,5  $\mu$ M de BAP, 5  $\mu$ M de ANA e 0,2% de Phytigel (Sigma). Os resultados serão apresentados em tabelas para facilitar a visualização das diferenças estatísticas entre todos os tratamentos e para mostrar, com precisão os reais valores obtidos para cada parâmetro analisado.

#### **7.2.3.1 Efeito da sacarose sobre os teores de proteínas totais, açúcares solúveis totais e amido de calos de *Cedrela fissilis***

Os resultados da tabela 8 indicam que os maiores teores de proteínas e açúcares solúveis totais e amido foram observados na luz. Calos de cotilédone, na ausência de glutamina, apresentaram os maiores teores de proteínas totais (12,76  $\mu$ g/g MS) e açúcares solúveis totais (254,11  $\mu$ g/g MS, mas os maiores níveis de amido foram observados, na luz, em calos obtidos a partir de nó foliar (125,47  $\mu$ g/g MS de amido), também na ausência de glutamina. O teor de açúcares solúveis totais dos nós foliares (255,17  $\mu$ g/g MS de açúcares solúveis totais) não diferiu significativamente do valor obtido para os calos de cotilédone nas mesmas condições de cultura.

Na luz, em todos os tratamentos, exceto para raiz, a glutamina diminuiu os teores de proteínas totais e de açúcares solúveis totais, enquanto que no escuro, a glutamina aumentou os teores de proteínas totais em calos de folha, hipocótilo, raiz e epicótilo e aumentou os níveis de açúcares solúveis totais em calos de nó cotiledonar, folha, cotilédone e raiz. Os teores de amido nos calos diminuíram na presença de glutamina na maioria dos tratamentos exceto em calos de hipocótilo, na luz e em calos de raiz, no escuro, condições que promoveram o acúmulo de amido nos calos.

**Tabela 08:** Efeito da sacarose, luz, escuro, tipo de explante e glutamina sobre a concentração de proteínas totais, açúcares solúveis totais e amido de calos de *Cedrela fissilis* cultivados durante 8 semanas em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de sacarose, 0 ou 2,73 mM de glutamina, 2,5 µM de BAP e 5 µM de ANA. Em negrito os melhores tratamentos.

Condição de cultura	Tipo de explante	Glutamina (mM)	Proteínas totais (µg/g MS) <sup>a</sup>	Açúcares solúveis totais (µg/g MS) <sup>a</sup>	Amido (µg/g MS) <sup>a</sup>	
Luz	Nó cotiledonar	0	6,42 ± 0,07 h	194,47 ± 2,86 e	29,52 ± 0,26 s	
		2,73	3,93 ± 0,05 n	95,52 ± 0,73 p	6,17 ± 0,29 t	
	Folha	0	2,37 ± 0,00 s	230,41 ± 0,34 c	17,82 ± 0,26 b	
		2,73	-	-	-	
	Nó foliar	0	6,72 ± 0,04 f	255,17 ± 0,16 a	25,47 ± 0,45 a	
		2,73	2,72 ± 0,07 r	103,47 ± 0,13 o	8,52 ± 0,47 q	
	Cotilédone	0	12,76 ± 0,06a	254,11 ± 0,66 a	11,70 ± 0,13 c	
		2,73	6,57 ± 0,02 g	98,23 ± 0,21 p	9,00 ± 0,16 u	
	Hipocótilo	0	7,75 ± 0,03 d	236,94 ± 1,42 b	5,47 ± 0,16 o	
		2,73	4,98 ± 0,06 k	85,35 ± 0,38 q	0,17 ± 0,26 m	
	Raiz	0	1,65 ± 0,02 u	53,52 ± 0,21 t	6,35 ± 0,16 v	
		2,73	2,85 ± 0,03 q	77,64 ± 0,21 r	1,70 ± 0,13 w	
	Epicótilo	0	6,92 ± 0,09 e	198,11 ± 0,16 d	6,94 ± 0,45 f	
		2,73	4,17 ± 0,04m	22,94 ± 0,21 u	,17 ± 0,26 x	
	Escuro	Nó cotiledonar	0	3,34 ± 0,04 o	101,88 ± 0,45 o	4,11 ± 0,69 h
			2,73	2,96 ± 0,04 q	113,94 ± 0,39 n	2,94 ± 0,36 r
Folha		0	2,71 ± 0,02 r	131,76 ± 0,21 k	0,70 ± 0,16 d	
		2,73	6,21 ± 0,03 i	173,05 ± 0,61 g	3,00 ± 0,57 i	
Nó foliar		0	9,91 ± 0,08 b	112,64 ± 0,72 n	9,17 ± 0,25 n	
		2,73	4,71 ± 0,04 l	67,23 ± 0,97 s	6,00 ± 0,26 t	
Cotilédone		0	8,11 ± 0,06 c	141,52 ± 0,73 j	9,23 ± 0,16 e	
		2,73	1,71 ± 0,09 u	183,88 ± 0,60 f	3,52 ± 0,69 hi	
Hipocótilo		0	3,08 ± 0,04 p	140,47 ± 0,45 j	6,00 ± 0,26 k	
		2,73	3,88 ± 0,05 n	114,52 ± 0,34 n	3,05 ± 0,61 r	
Raiz		0	1,97 ± 0,02 t	126,00 ± 0,16 l	1,35 ± 0,26 l	
		2,73	2,92 ± 0,03 q	160,76 ± 0,34 h	7,70 ± 0,60 g	
Epicótilo		0	4,89 ± 0,03 k	152,94 ± 0,42 i	9,29 ± 0,26 j	
		2,73	5,66 ± 0,06 j	119,29 ± 0,49 m	4,35 ± 0,38 p	

<sup>a</sup>Médias de no mínimo cinco repetições seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). MS= massa seca. – Biomassa insuficiente.

Na luz e sem glutamina (tabela 8), os tratamentos de calos oriundos de cotilédone, hipocótilo, epicótilo e nó foliar apresentaram 12,76; 7,76; 6,73 µg/g MS de proteínas totais, respectivamente, enquanto que calos de cotilédone, hipocótilo e epicótilo, na luz, mas com glutamina apresentaram respectivamente (6,58; 4,99; 4,17 µg/g MS).



No escuro (Tabela 8), calos de nó foliar e cotilédone, na ausência de glutamina apresentaram os maiores níveis de proteínas totais (9,91 e 8,11  $\mu\text{g/g MS}$ , respectivamente), sendo que para nó foliar o valor foi superior ao obtido na luz e na presença de glutamina e o maior teor de proteínas totais foi observado em calos de folha (6,21  $\mu\text{g/g MS}$ ). No escuro os níveis de proteínas foram reduzidos, tanto na presença como na ausência de glutamina, nos calos de nó cotiledonar, cotilédone, hipocótilo. Porém, nos calos de folha, sem glutamina, e epicótilo, com glutamina os níveis de proteínas totais aumentaram no escuro. O menor conteúdo de proteínas totais ocorreu no tratamento de raiz, na luz, na ausência de glutamina ( $1,65 \pm 0,02 \mu\text{g/g MS}$ ). Calos oriundos de folha, cultivados com glutamina, não foram apresentados, por que não houve indução.

Na luz e sem glutamina (Tabela 8), os tratamentos de calos oriundos de nó cotiledonar, folha, nó foliar, cotilédone, hipocótilo e epicótilo apresentaram níveis de açúcares solúveis totais que variaram de 53,52  $\mu\text{g/g MS}$  a 255,17  $\mu\text{g/g MS}$ , enquanto que com glutamina os teores de açúcares solúveis totais variaram de 22,94  $\mu\text{g/g MS}$  a 103,47  $\mu\text{g/g MS}$ , para os mesmos tipos de calos. No escuro, sem glutamina os níveis de açúcares solúveis totais variaram de 101,88  $\mu\text{g/g MS}$  a 152,94  $\mu\text{g/g MS}$  enquanto que com glutamina os valores variaram de 67,23  $\mu\text{g/g MS}$  a 183,88  $\mu\text{g/g MS}$ . Apenas para calos de raiz, na luz, a presença de glutamina aumentou o nível de açúcares solúveis totais para 77,64  $\mu\text{g/g MS}$ .

Assim, na luz, sem glutamina (Tabela 8) os calos de cotilédone e nó foliar apresentaram os maiores teores de açúcares solúveis totais (254,11 e 255,17  $\mu\text{g/g MS}$ ), enquanto que com glutamina, os calos de nó foliar apresentaram o maior teor (103,47  $\mu\text{g/g MS}$ ). No escuro, sem glutamina, os calos de epicótilo foram os que apresentaram os maiores níveis de açúcares solúveis totais (152,94  $\mu\text{g/g MS}$ ) e, com glutamina, os calos de cotilédone apresentaram os maiores níveis de açúcares solúveis totais (183,88  $\mu\text{g/g MS}$ ).

Na maioria dos tratamentos a presença da glutamina, tanto na luz, como no escuro, reduziu o acúmulo de amido nos calos, com exceção de dois tratamentos: hipocótilo, na luz e raiz, no escuro, em que a presença de glutamina promoveu o acúmulo de amido (Tabela 8). Na luz e sem glutamina, os valores de teores de amido variaram de 16,35  $\mu\text{g/g MS}$ , em calos de raiz a 125,47  $\mu\text{g/g MS}$ , em calos de nó foliar e com glutamina os valores variaram de 5,17  $\mu\text{g/g MS}$ , em calos de raiz a 60,17  $\mu\text{g/g MS}$ , em calos de hipocótilo. No escuro, sem glutamina as variações foram de 59,17  $\mu\text{g/g MS}$ , em calos de nó foliar a 90,70  $\mu\text{g/g MS}$ .

MS, em calos de folha, enquanto que no escuro e com glutamina as variações foram de 26 µg/g MS, em calos de nó foliar a 77,70 µg/g MS, em calos de raiz.

Assim, na luz e na ausência de glutamina (Tabela 8), o maior teor de amido foi observado em calos de nó foliar (125,47 µg/g MS), enquanto que na presença de glutamina o maior teor foi detectado em calos de hipocótilo (60,17 µg/g MS). No escuro, sem glutamina o maior acúmulo de amido ocorreu em calos de folha (90,70 µg/g MS) e com glutamina, o maior teor de amido foi observado em calos de raiz (77,70 µg/g MS).

#### 7.2.3.2. Efeito da frutose sobre os teores de proteínas totais, açúcares solúveis totais e amido a indução de calos de *Cedrela fissilis*

Os resultados da tabela 9 indicam que os maiores teores de proteínas totais (8,80 µg/g MS, para calos de nó cotiledonar), açúcares solúveis totais (129,41 µg/g MS, para calos de raiz) foram observados nos tratamentos de escuro, enquanto que o maior teor de amido (64,88 µg/g MS, para calos de folha) foi observado na luz, todos na ausência de glutamina.

Na luz, na maioria dos tratamentos, exceto para hipocótilo, a glutamina aumentou os teores de proteínas totais, enquanto que no escuro, na maioria dos tratamentos a presença de glutamina reduziu os níveis de proteínas totais nos calos, exceto em calos originados de folha, hipocótilo e epicótilo, em que os níveis foram aumentados. Já para os açúcares solúveis totais observa-se que em todos os tratamentos, tanto na luz como no escuro, a presença de glutamina reduziu as concentrações e em apenas um caso, nó foliar, na luz, os valores permaneceram iguais. Tendência similar aos açúcares solúveis totais foi verificada para o amido, cujos teores foram reduzidos pela presença da glutamina, exceto em calos originados de nó foliar e cotilédone, em que os teores de amido aumentaram.

**Tabela 9:** Efeito da frutose, luz, escuro, tipo de explante e glutamina sobre a concentração de proteínas totais, açúcares solúveis totais e amido de calos de *Cedrela fissilis* cultivados durante 8 semanas em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de frutose, 0 ou 2,73 mM de glutamina, 2,5  $\mu$ M de BAP e 5  $\mu$ M de ANA. Em negrito os melhores tratamentos.

Condição de cultura	Tipo de explante	Glutamina (mM)	Proteínas totais ( $\mu$ g/g MS) <sup>a</sup>	Açúcares solúveis totais ( $\mu$ g/g MS) <sup>a</sup>	Amido ( $\mu$ g/g MS) <sup>a</sup>	
Luz	Nó cotiledonar	0	1,42 $\pm$ 0,03 q	64,11 $\pm$ 0,55 h	27,29 $\pm$ 0,38 g	
		2,73	3,22 $\pm$ 0,04 j	26,52 $\pm$ 0,44 q	15,05 $\pm$ 0,57 lm	
	Folha	0	2,94 $\pm$ 0,02 k	75,05 $\pm$ 1,52 e	64,88 $\pm$ 0,16 a	
		2,73	5,58 $\pm$ 0,03 e	33,35 $\pm$ 0,61 n	15,82 $\pm$ 0,25 kl	
	Nó foliar	0	1,04 $\pm$ 0,05 s	28,00 $\pm$ 0,60 p	17,58 $\pm$ 0,70 j	
		2,73	3,78 $\pm$ 0,05 h	28,29 $\pm$ 0,64 p	13,11 $\pm$ 0,53 n	
	Cotilédone	0	3,61 $\pm$ 0,04 i	81,94 $\pm$ 0,53 c	18,00 $\pm$ 0,25 j	
		2,73	5,02 $\pm$ 0,03 f	47,29 $\pm$ 0,38 k	24,58 $\pm$ 0,39 h	
	Hipocótilo	0	2,57 $\pm$ 0,02 l	30,41 $\pm$ 0,74 o	31,17 $\pm$ 0,21 f	
		2,73	2,09 $\pm$ 0,04 n	20,23 $\pm$ 0,32 s	10,76 $\pm$ 0,34 o	
	Raiz	0	1,77 $\pm$ 0,07 op	59,23 $\pm$ 0,45 i	21,23 $\pm$ 0,25 i	
		2,73	3,01 $\pm$ 0,03k	42,29 $\pm$ 0,38 l	13,41 $\pm$ 0,45 n	
	Epicótilo	0	3,18 $\pm$ 0,08 j	38,94 $\pm$ 0,92 m	16,00 $\pm$ 0,39 k	
		2,73	3,71 $\pm$ 0,05 hi	24,35 $\pm$ 0,48 r	2,58 $\pm$ 0,32 r	
	Escuro	Nó cotiledonar	0	8,80 $\pm$ 0,03 a	68,05 $\pm$ 0,34 g	27,82 $\pm$ 0,34 g
			2,73	2,29 $\pm$ 0,08 m	46,05 $\pm$ 0,26 k	14,94 $\pm$ 0,25 lm
Folha		0	1,88 $\pm$ 0,03 o	51,41 $\pm$ 0,53 j	27,29 $\pm$ 0,48 g	
		2,73	2,15 $\pm$ 0,05 n	41,23 $\pm$ 0,38 l	14,94 $\pm$ 0,32 lm	
Nó foliar		0	6,20 $\pm$ 0,03 d	77,05 $\pm$ 0,36 d	39,82 $\pm$ 0,45 e	
		2,73	4,08 $\pm$ 0,04 g	23,52 $\pm$ 0,42 r	5,05 $\pm$ 0,64 q	
Cotilédone		0	6,42 $\pm$ 0,03 c	64,29 $\pm$ 0,16 h	31,23 $\pm$ 0,25 f	
		2,73	2,39 $\pm$ 0,06 m	39,05 $\pm$ 0,38 m	14,70 $\pm$ 0,29 m	
Hipocótilo		0	1,37 $\pm$ 0,06 q	69,94 $\pm$ 0,25 f	42,11 $\pm$ 0,25 d	
		2,73	1,86 $\pm$ 0,03 o	27,11 $\pm$ 0,44 pq	10,47 $\pm$ 0,39 o	
Raiz		0	1,71 $\pm$ 0,05 p	129,41 $\pm$ 0,25 a	54,70 $\pm$ 0,29 b	
		2,73	1,22 $\pm$ 0,06 r	50,88 $\pm$ 0,47 j	17,70 $\pm$ 0,25 j	
Epicótilo		0	2,67 $\pm$ 0,07 l	93,58 $\pm$ 0,25 b	44,23 $\pm$ 0,34 c	
		2,73	7,94 $\pm$ 0,06 b	31,41 $\pm$ 0,25 o	7,70 $\pm$ 0,38p	

<sup>a</sup>Médias de no mínimo cinco repetições seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey (p $\leq$  0,05). MS= massa seca.

No escuro e sem glutamina (Tabela 9), os níveis de proteínas totais variaram de 1,37  $\mu$ g/g MS, em calos de hipocótilo a 8,80  $\mu$ g/g MS, em calos de nó cotiledonar, enquanto que na presença de glutamina variaram de 1,22  $\mu$ g/g MS, em calos de raiz a no máximo 7,94  $\mu$ g/g MS, em calos de epicótilo. Na luz, entretanto, os valores de proteínas totais em calos crescidos na ausência de glutamina variaram de 1,04  $\mu$ g/g MS,

em calos de nó foliar a 3,61  $\mu\text{g/g MS}$ , em calos de cotilédone. Os resultados apresentados na tabela 9 mostram que os tratamentos de calos cultivados com glutamina, na presença de luz apresentaram estatisticamente as maiores concentrações de proteínas totais (folha, 5,59; cotilédone, 5,02; nó foliar, 3,79; epicótilo 3,71  $\mu\text{g/g MS}$ ), do que os tratamentos sem a presença de glutamina (cotilédone, 3,61; epicótilo, 3,19; folha, 2,95; hipocótilo, 2,57; raiz, 1,77; nó cotiledonar, 1,42; nó foliar, 1,04  $\mu\text{g/g MS}$ ). Assim, no escuro e ausência de glutamina, os calos produzidos a partir de nó cotiledonar apresentaram os níveis máximos de proteínas totais, enquanto que o menor teor foi detectado em calos de nó foliar produzidos na luz, na ausência de glutamina.

Na luz, sem glutamina (Tabela 9) o menor teor de açúcares solúveis totais foi detectado em calos de nó foliar (28,8  $\mu\text{g/g MS}$ ) e o maior valor (81,94  $\mu\text{g/g MS}$ ), em calo de cotilédone, enquanto que, com glutamina, os valores foram no mínimo de 20,23  $\mu\text{g/g MS}$ , em calo de hipocótilo e no máximo de 47,29  $\mu\text{g/g MS}$ , em calo de cotilédone.

No escuro e sem glutamina (Tabela 9), os calos oriundos de segmentos de raiz apresentaram os maiores níveis de açúcares solúveis totais (129,41  $\mu\text{g/g MS}$ ). Nessas condições de cultivo os teores de açúcares solúveis totais variaram de 51,41  $\mu\text{g/g MS}$ , em calos de folha ao máximo de 129,41  $\mu\text{g/g MS}$ , em calos de raiz enquanto que com glutamina, os valores variaram de 23, 52  $\mu\text{g/g MS}$ , em calos de nó foliar a 50,88  $\mu\text{g/g MS}$ , em calos de raiz. Assim, no escuro e ausência de glutamina, os calos produzidos a partir de raiz apresentaram os níveis máximos de proteínas totais, enquanto que o menor teor foi detectado em calos de hipocótilo produzidos na luz, na presença de glutamina.

Na maioria dos tratamentos a presença da glutamina, tanto na luz, como no escuro, reduziu o acúmulo de amido nos calos, com exceção de dois tratamentos: nó foliar e cotilédone, na luz, em que a presença de glutamina promoveu o acúmulo de amido (Tabela 9). O maior teor de amido (64,88  $\mu\text{g/g MS}$ ) foi detectado em calos produzidos a partir de folha, na luz, sem glutamina, enquanto que o menor valor foi de 7,70  $\mu\text{g/g MS}$ , verificado em calos de epicótilo produzidos no escuro, na presença de glutamina.

Na luz e sem glutamina (Tabela 9) os valores de teores de amido variaram de 16,00  $\mu\text{g/g MS}$ , em calos de epicótilo a, no máximo, 64,88  $\mu\text{g/g MS}$ , em calos de folha e com glutamina os valores variaram de 2,58  $\mu\text{g/g MS}$ , em calos de epicótilo a 24,58  $\mu\text{g/g MS}$ , em calos de cotilédone. Observa-se na tabela 9 que o tratamento que apresentou maior conteúdo de amido foi calos de folha, cultivados sem a presença de glutamina na luz (64,88  $\mu\text{g/g MS}$ ), seguido de hipocótilo e nó

cotiledonar (31,18 e 27,29  $\mu\text{g/g MS}$ , respectivamente). Nota-se que, os tratamentos cultivados sem a presença de glutamina, foram superiores estatisticamente, que os cultivados com glutamina na luz.

No escuro, sem glutamina (Tabela 9) o menor valor de teor de amido ocorreu em calos de folha (27,29  $\mu\text{g/g MS}$ ) e o máximo valor em calos de raiz (54,70  $\mu\text{g/g MS}$ ), e com glutamina, os valores de concentrações de amido variaram de 5,05  $\mu\text{g/g MS}$ , em nó foliar a 14,94  $\mu\text{g/g MS}$ , em calos de nó cotiledonar e folha. Observa-se, na tabela 9, que os tratamentos de calos cultivados na ausência de glutamina, no escuro, também foram superiores estatisticamente aos tratamentos cultivados com glutamina no escuro. O tratamento que apresentou a maior concentração de amido foi o de calos de raiz, cultivados sem glutamina, no escuro (54,71  $\mu\text{g/g MS}$ ), seguido de epicótilo, hipocótilo, nó foliar e cotilédone (44,24; 42,12; 39,82; 31,24  $\mu\text{g/g MS}$  respectivamente). O tratamento que apresentou o menor conteúdo de amido foi o de calos de nó foliar, cultivados com glutamina, no escuro (5,06  $\mu\text{g/g MS}$ ).

#### 7.2.3.3. Efeito da glucose sobre os teores de proteínas totais, açúcares solúveis totais e amido a indução de calos de *Cedrela fissilis*

Os resultados da tabela 10 indicam que o maior teor de proteínas totais (6,17  $\mu\text{g/g MS}$ , para calos de cotilédone) foi observado na luz, na presença de glutamina, enquanto que os maiores níveis de açúcares solúveis totais e amido (114,17  $\mu\text{g/g MS}$  e 54,64  $\mu\text{g/g MS}$ , respectivamente) foram observados no escuro e na ausência de glutamina.

Na luz, na maioria dos tratamentos, exceto para hipocótilo, a glutamina aumentou os teores de proteínas totais. No escuro, contudo, a presença de glutamina diminuiu os níveis de proteínas na maioria dos tratamentos, exceto para nó cotiledonar e raiz, em que as concentrações de proteínas totais aumentaram com a presença de glutamina.

**Tabela 10:** Efeito da glucose, luz, escuro, tipo de explante e glutamina sobre a concentração de proteínas totais, açúcares solúveis totais e amido de calos de *Cedrela fissilis* cultivados durante 8 semanas em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de frutose, 0 ou 2,73 mM de glutamina, 2,5  $\mu$ M de BAP e 5  $\mu$ M de ANA. Em negrito os melhores tratamentos.

Condição de cultura	Tipo de explante	Glutamina (mM)	Proteínas totais ( $\mu$ g/g MS) <sup>a</sup>	Açúcares solúveis totais ( $\mu$ g/g MS) <sup>a</sup>	Amido ( $\mu$ g/g MS) <sup>a</sup>	
Luz	Nó cotiledonar	0	2,77 $\pm$ 0,09 j	14,88 $\pm$ 1,94 q	2,58 $\pm$ 0,32 t	
		2,73	3,12 $\pm$ 0,04 i	33,11 $\pm$ 0,34 k	15,17 $\pm$ 0,16 k	
	Folha	0	2,14 $\pm$ 0,06 k	22,94 $\pm$ 0,36 mn	14,05 $\pm$ 0,13 l	
		2,73	3,95 $\pm$ 0,06 f	53,64 $\pm$ 0,53 f	25,47 $\pm$ 0,49 f	
	Nó foliar	0	1,44 $\pm$ 0,06 m	31,00 $\pm$ 1,13 l	18,17 $\pm$ 0,25 ij	
		2,73	3,34 $\pm$ 0,06 h	21,70 $\pm$ 0,64 n	7,00 $\pm$ 0,76 p	
	Cotilédone	0	1,78 $\pm$ 0,03 l	38,94 $\pm$ 0,34 j	18,05 $\pm$ 0,16 ij	
		2,73	6,17 $\pm$ 0,05 a	38,47 $\pm$ 0,48 j	23,35 $\pm$ 0,26 g	
	Hipocótilo	0	2,82 $\pm$ 0,03 j	17,05 $\pm$ 0,66 p	4,94 $\pm$ 0,38 r	
		2,73	2,18 $\pm$ 0,06 k	5,29 $\pm$ 0,36 r	3,88 $\pm$ 0,53 s	
	Raiz	0	2,14 $\pm$ 0,08 k	49,05 $\pm$ 0,44 g	18,88 $\pm$ 0,13 i	
		2,73	4,11 $\pm$ 0,06 ef	23,23 $\pm$ 0,21 m	8,88 $\pm$ 0,38 o	
	Epicótilo	0	3,27 $\pm$ 0,03 hi	44,35 $\pm$ 0,64 h	24,76 $\pm$ 0,25 f	
		2,73	4,11 $\pm$ 0,04 ef	23,82 $\pm$ 0,51 m	12,47 $\pm$ 0,26 m	
	Escuro	Nó cotiledonar	0	3,21 $\pm$ 0,03 hi	62,35 $\pm$ 0,51 e	30,58 $\pm$ 0,21 e
			2,73	3,66 $\pm$ 0,05 g	40,58 $\pm$ 0,88 i	10,88 $\pm$ 0,62 n
		Folha	0	4,30 $\pm$ 0,02 d	43,58 $\pm$ 0,94 h	25,23 $\pm$ 0,38 f
			2,73	3,33 $\pm$ 0,05 h	39,94 $\pm$ 0,32 ij	25,47 $\pm$ 0,16 f
Nó foliar		0	5,08 $\pm$ 0,02 b	67,35 $\pm$ 0,21 c	33,00 $\pm$ 0,48 d	
		2,73	4,60 $\pm$ 0,03 c	33,35 $\pm$ 0,26 k	6,35 $\pm$ 0,45 pq	
Cotilédone		0	3,57 $\pm$ 0,04 g	65,41 $\pm$ 0,26 d	40,23 $\pm$ 0,38 b	
		2,73	2,14 $\pm$ 0,24 k	39,29 $\pm$ 0,26 ij	17,41 $\pm$ 0,38 j	
Hipocótilo		0	3,25 $\pm$ 0,05 hi	47,82 $\pm$ 0,26 g	21,47 $\pm$ 0,21 h	
		2,73	2,20 $\pm$ 0,03 k	19,82 $\pm$ 0,34 o	3,17 $\pm$ 0,53 st	
Raiz		0	3,54 $\pm$ 0,05 g	114,17 $\pm$ 0,64 a	54,64 $\pm$ 0,13 a	
		2,73	3,99 $\pm$ 0,07 f	78,23 $\pm$ 0,36 b	22,29 $\pm$ 0,38 h	
Epicótilo		0	4,25 $\pm$ 0,07 de	63,94 $\pm$ 0,16 d	35,05 $\pm$ 0,25 c	
		2,73	3,68 $\pm$ 0,06 g	30,58 $\pm$ 0,42l	5,88 $\pm$ 0,29 q	

<sup>a</sup>Médias de no mínimo cinco repetições seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). MS= massa seca.

Na luz (Tabela 10), os valores de proteínas totais em calos crescidos na ausência de glutamina variaram de 1,44  $\mu$ g/g MS, em calos de nó foliar a 3,27  $\mu$ g/g MS, em calos de hipocótilo e com glutamina, foram no mínimo de 2,18  $\mu$ g/g MS, em calos de hipocótilo e no máximo de 6,17  $\mu$ g/g MS, em calos de cotilédone.

No escuro e sem glutamina (Tabela 10), os níveis de proteínas totais variaram de 3,21  $\mu\text{g/g MS}$ , em calos de nó cotiledonar a 5,08  $\mu\text{g/g MS}$ , em calos de nó foliar, enquanto que na presença de glutamina variaram de 2,14  $\mu\text{g/g MS}$ , em calos de cotilédone a no máximo 4,60  $\mu\text{g/g MS}$ , em calos de nó foliar. Observa-se que o tratamento que apresentou maior concentração de proteínas totais foi nó foliar, sem a presença de glutamina (5,09  $\mu\text{g/g MS}$ ), enquanto que nos tratamentos cultivados na luz, o nó foliar sem glutamina, foi o que apresentou a menor concentração de 1,44  $\pm$  0,06  $\mu\text{g/g MS}$ . Assim, na luz e na presença de glutamina, os calos produzidos a partir de cotilédone apresentaram o nível máximo de proteínas totais, enquanto que o menor teor foi detectado em calos de nó foliar, produzidos na luz, na ausência de glutamina.

Na luz, sem glutamina (Tabela 10) o menor teor de açúcares solúveis totais foi detectado em calos de nó cotiledonar (14,88  $\mu\text{g/g MS}$ ) e o maior valor (49,05  $\mu\text{g/g MS}$ ), em calos de raiz, enquanto que, com glutamina, os valores foram no mínimo de 5,29  $\mu\text{g/g MS}$ , em calo de hipocótilo e no máximo de 53,64  $\mu\text{g/g MS}$ , em calo de folha.

No escuro e sem glutamina (Tabela 10), os calos oriundos de segmentos de raiz apresentaram os maiores níveis de açúcares solúveis totais (114,17  $\mu\text{g/g MS}$ ). Nessas condições de cultivo os teores de açúcares solúveis totais variaram de 47,82  $\mu\text{g/g MS}$ , em calos de hipocótilo ao máximo de 114,17  $\mu\text{g/g MS}$ , em calos de raiz enquanto que com glutamina, os valores variaram de 19,82  $\mu\text{g/g MS}$ , em calos de hipocótilo a 78,23  $\mu\text{g/g MS}$ , em calos de raiz. Assim, no escuro e ausência de glutamina, os calos produzidos a partir de raiz apresentaram os níveis máximos de açúcares solúveis totais, enquanto que o menor teor foi detectado em calos de hipocótilo produzidos no escuro, na presença de glutamina.

Quanto ao amido, na luz, a presença de glutamina (Tabela 10) aumentou os teores de amido dos calos produzidos a partir de nó cotiledonar, folha e cotilédone e reduziu o teor de amido em calos de nó foliar, hipocótilo, raiz e epicótilo. No escuro (Tabela 10), entretanto, na maioria dos tratamentos, exceto em calos de folha, a presença de glutamina diminuiu o teor de amido nos calos. O maior teor de amido (54,64  $\mu\text{g/g MS}$ ) foi detectado em calos produzidos a partir de raiz, no escuro, sem glutamina, enquanto que o menor valor foi de 3,88  $\mu\text{g/g MS}$ , verificado em calos de hipocótilo produzidos na luz, na presença de glutamina.

Na luz e sem glutamina (Tabela 10) os valores de teores de amido variaram de 2,58  $\mu\text{g/g MS}$ , em calos de nó cotiledonar a, no máximo,

24,76  $\mu\text{g/g}$  MS, em calos de epicótilo e com glutamina os valores variaram de 3,88  $\mu\text{g/g}$  MS, em calos de hipocótilo a 25,47  $\mu\text{g/g}$  MS, em calos de folha. No escuro, sem glutamina (Tabela 10) o menor valor de teor de amido ocorreu em calos de hipocótilo (21,47  $\mu\text{g/g}$  MS) e o máximo valor em calos de raiz (54,64  $\mu\text{g/g}$  MS), e com glutamina, os valores de concentrações de amido variaram de 3,17  $\mu\text{g/g}$  MS, em calos de segmentos de hipocótilo a 25,47  $\mu\text{g/g}$  MS em calos de folha.

Na luz, o tratamento que apresentou o menor teor de amido foram calos de nó cotiledonar, cultivados sem glutamina na luz (2,58  $\mu\text{g/g}$  MS). No escuro, o tratamento que apresentou o menor conteúdo de amido foram os calos de hipocótilo, cultivados com glutamina (3,18  $\pm$  0,53  $\mu\text{g/g}$  MS).

#### 7.2.3.4. Análise comparativa dos efeitos das fontes de carbono sobre a produção de metabólitos primários em calos de *Cedrela fissilis*

A tabela 11 abaixo apresenta a compilação dos tratamentos que apresentaram os melhores resultados para os metabólitos primários produzidos pelos calos, com a manipulação das diferentes fontes de carbono estudadas. Verificam-se, quanto aos tipos de explantes, que para proteínas totais, segmentos de cotilédone foram os melhores explantes, quando as fontes de carbono foram sacarose ou glucose, mas com frutose o melhor explante foi segmento de nó cotiledonar. Já para os açúcares solúveis totais segmentos de cotilédone foram melhores, quando a fonte de carbono foi a sacarose, mas para frutose e glucose, os melhores valores foram obtidos com calos de raiz. Para o amido, os maiores valores foram detectados em calos de nó foliar, com a sacarose, em calos de folha, com a frutose e em calos de raiz, com a glucose.

Quanto à eficiência da glutamina na produção dos metabólitos primários pelos calos, observa-se, na tabela 11 que, apenas quando a fonte de carbono foi a glucose, a glutamina apresentou um efeito promotor, mas apenas para a produção de proteínas totais. Quanto à necessidade de luz, verifica-se que, com sacarose, os maiores níveis de proteínas totais, açúcares solúveis totais e amido foram obtidos em calos cultivados na luz, enquanto que para a frutose a luz foi necessária para garantir a maior produção de amido e para glucose, apenas para garantir a maior produção de proteínas totais. Nota-se que, para frutose e glucose, os mesmos tipos de tratamentos apresentaram as maiores concentrações de açúcares solúveis totais.



**Tabela 11:** Compilação dos melhores tratamentos (tipo de explante, presença/ausência de glutamina, presença/ausência de luz) que produziram as maiores concentrações de proteínas totais, açúcares solúveis totais e amido em calos de *Cedrela fissilis* cultivados durante 8 semanas, em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de sacarose, glucose ou frutose, 0 ou 2,73 mM de glutamina, 2,5  $\mu$ M de BAP e 5  $\mu$ M de ANA.

Fontes de carbono	Proteínas totais	Açúcares solúveis totais	Amido
Sacarose	Cotilédone	Cotilédone, nó foliar	Nó foliar
	Sem glutamina	Sem glutamina	Sem glutamina
	Luz	Luz	Luz
Frutose	Nó cotiledonar	Raiz	Folha
	Sem glutamina, Escuro	Sem glutamina Escuro	Sem glutamina Luz
Glucose	Cotilédone	Raiz	Raiz
	Com glutamina	Sem glutamina	Sem glutamina
	Luz	Escuro	Escuro

Em termos quantitativos (tabela 12), apesar de não terem sido realizadas as análises estatísticas comparando as fontes de carbono, é possível observar que com a sacarose, as maiores concentrações de proteínas totais (12,76  $\mu$ g/g MS), açúcares solúveis totais (255,18  $\mu$ g/g MS) e amido (125,47  $\mu$ g/g MS) detectadas nos calos, nos melhores tratamentos, foram, pelo menos, duas vezes maior do que os valores obtidos para frutose e glucose. Apenas em relação à frutose, a concentração de proteínas totais nos calos cultivados com sacarose foi apenas, 1,45 vezes maior.

**Tabela 12:** Compilação dos maiores valores de concentração de proteínas totais, açúcares solúveis totais e amido em calos de *Cedrela fissilis* cultivados durante 8 semanas, em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de sacarose, glucose ou frutose, 0 ou 2,73 mM de glutamina, 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA.

Fontes de carbono	Proteínas totais ( $\mu\text{g/g MS}$ ) <sup>a</sup>	Açúcares solúveis ( $\mu\text{g/g MS}$ ) <sup>a</sup>	Amido ( $\mu\text{g/g MS}$ ) <sup>a</sup>
Sacarose	12,76	255,18	125,47
Frutose	8,80	129,41	64,88
Glucose	6,17	114,17	54,64

<sup>a</sup>Médias de no mínimo cinco repetições.

### 7.3 ANÁLISES QUANTITATIVAS DE FENÓLICOS TOTAIS, FLAVONOIDES TOTAIS, CAROTENOIDES E CLOROFILA EM CALOS DE *Cedrela fissilis*

Os experimentos, cujos resultados são apresentados a seguir foram realizados com o objetivo de estudar o metabolismo secundário dos calos de *C. fissilis* e as possibilidades de otimização da produção de fenólicos totais, flavonoides totais, carotenoides e clorofilas através da manipulação das fontes de carbono, concentrações de glutamina, combinações de concentrações de BAP e ANA, tipos de explantes, presença e ausência de luz.

Nos experimentos em que foram estudados os efeitos das fontes de carbono, devido à grande quantidade de dados obtidos, os resultados são apresentados, para cada fonte de carbono, na forma de tabelas, para melhor visualização dos valores precisos de concentrações obtidos e das diferenças estatísticas entre todos os tratamentos conduzidos.

#### 7.3.1. Efeito de diferentes combinações de concentrações de sacarose e de glutamina sobre os teores de fenólicos totais, flavonoides, carotenoides e clorofilas *a* e *b* de calos de *Cedrela fissilis*

Nos experimentos descritos a seguir foram quantificados os fenólicos totais, flavonoides totais e carotenoides em calos de *C. fissilis*, produzidos a partir de nós cotiledonares, após 8 semanas de cultivo, em meio de cultura MS suplementado 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP, 5  $\mu\text{M}$  de ANA,

0,2% de Phytigel (Sigma) e com concentrações de sacarose de 59 mM e 118 mM, em combinação com concentrações de glutamina de 0, 2,73 mM e 5,46 mM.

Observa-se, pelos resultados apresentados na tabela 13 que, na ausência de glutamina, os maiores níveis de fenólicos totais e flavonoides totais foram observados com sacarose 118 mM (22,84 µg/g MS), enquanto que os maiores níveis de carotenoides ocorreram com 59 mM de sacarose (0,70 µg/g MS). Porém, com 118 mM de sacarose e com 2,73 mM glutamina foram produzidas as maiores concentrações de fenólicos totais (26,27 µg/g MS) e de flavonoides totais (0,54 µg/g MS) e com 118 mM de sacarose e com 5,46 mM de glutamina foram produzidas as maiores concentrações de carotenoides (1,14 µg/g MS).

Verifica-se que a menor concentração de fenólicos totais (11,50 µg/g MS) foi observada em calos cultivados com 59 mM de sacarose e na ausência de glutamina, enquanto que as menores concentrações de flavonoides totais (0,09 µg/g MS) foram apresentadas pelos calos crescidos com 118 mM de sacarose, na ausência de glutamina. Os menores níveis de carotenoides (0,69 µg/g MS e 0,70 µg/g MS) ocorreram nos calos crescidos na presença de 59 mM de sacarose e na ausência ou presença de 2,73 mM de glutamina.

**Tabela 13:** Efeito de concentrações de sacarose e glutamina sobre o conteúdo de fenólicos totais, flavonoides totais e carotenoides de calos de *Cedrela fissilis* cultivados, durante 8 semanas, a partir de nós cotiledonares em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 2,5 µM de BAP e 5 µM de ANA. Em negrito os melhores tratamentos. Em negrito os melhores tratamentos.

Sacarose (mM)	Glutamina (mM)	Fenólicos totais (µg/g MS) <sup>a</sup>	Flavonoides totais (µg/g MS) <sup>a</sup>	Carotenoides (µg/g MS) <sup>a</sup>
59	0	11,50 ± 0,14 d	0,27 ± 0,01 c	0,70 ± 0,00 e
59	2,73	16,91 ± 0,09 c	0,14 ± 0,03 d	0,69 ± 0,00 e
59	5,46	16,45 ± 0,23 c	0,26 ± 0,05 c	1,03 ± 0,02 b
118	0	22,84 ± 1,39 b	0,09 ± 0,03 d	0,74 ± 0,01 d
118	2,73	26,27 ± 0,47 a	0,54 ± 0,07 a	0,78 ± 0,01 c
118	5,46	23,28 ± 1,03 b	0,43 ± 0,01 b	1,14 ± 0,01 a

<sup>a</sup>Médias de no mínimo cinco repetições seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey (p ≤ 0,05). MS= massa seca.

Observa-se, pelos resultados apresentados na tabela 14, que o maior teor de clorofila *a* (0,25 µg/g MS) ocorreu com 59 mM de sacarose e 5,46 mM de glutamina e os maiores níveis de clorofila *b* (0,11 µg/g MS e 0,12 µg/g MS) foram observados com 59 mM de sacarose e 5,46 mM de glutamina e com 118 mM de sacarose e 2,73 mM de glutamina. Com 118 mM de sacarose, a presença de 5,46 mM de glutamina promoveu a síntese de clorofila *a* em relação aos tratamentos com 2,73 mM ou ausência de glutamina, mas não houve efeito da glutamina sobre os níveis de clorofila *b*. As menores concentrações de clorofila *a* ocorreram com sacarose 59 mM, com 2,73 mM de glutamina e de clorofila *b* com 59 mM ou 112 mM de sacarose, na ausência de glutamina, com 59 mM de sacarose e 2,73 mM de glutamina e com 118 mM e 5,46 mM de glutamina.

**Tabela 14:** Efeito de concentrações de sacarose e glutamina sobre os conteúdos de clorofilas *a* e *b* de calos de *Cedrela fissilis* cultivados, durante 8 semanas, a partir de nós cotiledonares em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 2,5 µM de BAP e 5 µM de ANA. Em negrito os melhores tratamentos.

Sacarose (mM)	Glutamina (mM)	Clorofila <i>a</i> (µg/g MS) <sup>a</sup>	Clorofila <i>b</i> (µg/g MS) <sup>a</sup>
59	0	0,14 ± 0,00 d	0,08 ± 0,01 c
59	2,73	0,12 ± 0,00 e	0,09 ± 0,01 bc
59	5,46	0,25 ± 0,00 a	0,12 ± 0,00 a
118	0	0,15 ± 0,00 c	0,10 ± 0,01 bc
118	2,73	0,15 ± 0,01 c	0,11 ± 0,02 ab
118	5,46	0,17 ± 0,00 b	0,10 ± 0,00 bc

<sup>a</sup>Médias de no mínimo cinco repetições seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey (p< 0,05). MS= massa seca.

A tabela 15 abaixo sumariza os tratamentos que produziram os melhores resultados para a produção de fenólicos totais, flavonoides totais, carotenoides, clorofila *a* e clorofila *b* pelos calos de *C. fissilis*, através da manipulação das concentrações de sacarose e de glutamina. Os resultados indicam que, com 2,5 µM de BAP e 5 µM de ANA, 118 mM de sacarose combinada com concentrações específicas de glutamina foram eficientes para otimizar a produção de fenólicos totais, flavonoides e carotenoides.

**Tabela 15:** Concentrações de sacarose e de glutamina que produziram as maiores concentrações de fenólicos totais, flavonoides totais e carotenoides em calos de *Cedrela fissilis* cultivados durante 8 semanas, a partir de nós cotiledonares em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 2,5  $\mu$ M de BAP e 5  $\mu$ M de ANA. Em negrito os melhores tratamentos.

Parâmetros	Tratamentos
Fenólicos totais	118 mM sacarose + 2,73 mM glutamina
Flavonoides totais	118 mM sacarose + 2,73mM glutamina
Carotenoides	118 mM sacarose + 5,46 mM glutamina
Clorofila <i>a</i>	59 mM sacarose + 5,46 mM glutamina
Clorofila <i>b</i>	59 mM sacarose + 5,46 mM glutamina 118 mM sacarose + 2,73 mM glutamina

### 7.3.2. Efeito de diferentes fontes de carbono e de combinações de concentrações de BAP e ANA sobre os teores de fenólicos totais, flavonoides, carotenoides e clorofilas *a* e *b* de calos de *Cedrela fissilis*

Nesses experimentos foram quantificados os fenólicos totais, flavonoides totais, carotenoides e clorofilas *a* e *b* em calos de *C. fissilis*, produzidos a partir de nós cotiledonares, após 8 semanas de cultivo, em meio de cultura MS suplementado com 118 mM de sacarose, frutose ou glucose, 2,73 mM de glutamina, 0,2% de Phytigel (Sigma) e com diferentes combinações de concentrações de BAP e ANA.

Através dos resultados mostrados na tabela 16 observa-se que as maiores concentrações de fenólicos totais (23,61  $\mu$ g/g MS) e carotenoides (1,82  $\mu$ g/g MS) ocorreram em calos cultivados com sacarose, mas em combinações de 2,5  $\mu$ M de BAP e 2,5  $\mu$ M de ANA e de 5  $\mu$ M de BAP e 2,5  $\mu$ M de ANA, respectivamente. Contudo, os maiores níveis de flavonoides (0,70  $\mu$ g/g MS) foram detectados em calos cultivados com glucose, 2,5 de BAP e 2,5 de ANA.

Em calos cultivados com sacarose a maior concentração de flavonoides (0,59  $\mu$ g/g MS) foi observada nas concentrações de 5  $\mu$ M de BAP com 2,5  $\mu$ M de ANA. Com frutose, as maiores concentrações

fenólicos totais (13,56  $\mu\text{g/g MS}$ ), flavonoides (0,32 a 0,35  $\mu\text{g/g MS}$ ) e carotenoides (1,59  $\mu\text{g/g MS}$ ) ocorreram, respectivamente, nas combinações de 2,5  $\mu\text{M}$  e 5  $\mu\text{M}$  de BAP com 2,5  $\mu\text{M}$  de ANA, 5  $\mu\text{M}$  de BAP com 2,5  $\mu\text{M}$  e 5  $\mu\text{M}$  de ANA e com 5  $\mu\text{M}$  de BAP e 2,5  $\mu\text{M}$  de ANA. Com glucose, os maiores teores de carotenoides (0,87  $\mu\text{g/g MS}$ ) foram observados na combinação de 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 2,5  $\mu\text{M}$  de ANA (e 5  $\mu\text{M}$  de BAP e 2,5  $\mu\text{M}$  de ANA, para os fenólicos totais), nas mesmas concentrações em que foram detectados os maiores níveis de flavonoides totais (0,70  $\mu\text{g/g MS}$ ) e fenólicos totais (14,61  $\mu\text{g/g MS}$  e 15,19  $\mu\text{g/g MS}$ ).

Com sacarose, as menores concentrações de fenólicos totais (16,49  $\mu\text{g/g MS}$ ), flavonoides (0,16  $\mu\text{g/g MS}$ ) e carotenoides (0,72  $\mu\text{g/g MS}$ ) ocorreram com 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA. As menores concentrações de fenólicos totais (8,68  $\mu\text{g/g MS}$ ) e flavonoides totais (0,05  $\mu\text{g/g MS}$ ) foram verificadas com frutose, 2,5 de BAP e 5 de ANA e de carotenoides (0,49  $\mu\text{g/g MS}$ ), com glucose nas concentrações de 2,5 de BAP e 5 de ANA.

**Tabela 16:** Efeito de fontes de carbono e de combinações de BAP e ANA sobre o conteúdo de fenólicos totais, flavonoides totais e carotenoides de calos de *Cedrela fissilis* cultivados, durante 8 semanas, a partir de nós cotiledonares em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de sacarose, frutose ou glucose e 2,73 mM de glutamina. Em negrito os melhores tratamentos.

Fonte de carbono	BAP ( $\mu\text{M}$ )	ANA ( $\mu\text{M}$ )	Fenólicos Totais ( $\mu\text{g/g MS}$ ) <sup>a</sup>	Flavonoides totais ( $\mu\text{g/g MS}$ ) <sup>a</sup>	Carotenoides ( $\mu\text{g/g MS}$ ) <sup>a</sup>
Sacarose	2,5	5,0	16,49 $\pm$ 1,41 c	0,16 $\pm$ 0,02 f	0,72 $\pm$ 0,00 h
	5,0	2,5	20,08 $\pm$ 1,07 b	0,59 $\pm$ 0,02 b	1,82 $\pm$ 0,00 a
	2,5	2,5	23,61 $\pm$ 1,39 a	0,50 $\pm$ 0,02 c	1,24 $\pm$ 0,01 c
	5,0	5,0	21,74 $\pm$ 0,15 b	0,56 $\pm$ 0,04 bc	0,95 $\pm$ 0,00 e
Frutose	2,5	5,0	8,68 $\pm$ 0,31 f	0,05 $\pm$ 0,01 g	0,67 $\pm$ 0,00 j
	5,0	2,5	13,56 $\pm$ 1,07 de	0,35 $\pm$ 0,04 de	1,59 $\pm$ 0,01 b
	2,5	2,5	13,56 $\pm$ 1,07 de	0,32 $\pm$ 0,03 de	0,85 $\pm$ 0,00 g
	5,0	5,0	12,24 $\pm$ 0,04 e	0,33 $\pm$ 0,05 de	1,12 $\pm$ 0,00 d
Glucose	2,5	5,0	9,18 $\pm$ 0,44 f	0,27 $\pm$ 0,02 e	0,49 $\pm$ 0,00 l
	5,0	2,5	15,19 $\pm$ 1,05 cd	0,38 $\pm$ 0,07 d	0,69 $\pm$ 0,00 i
	2,5	2,5	14,61 $\pm$ 0,11 d	0,70 $\pm$ 0,03 a	0,87 $\pm$ 0,00 f
	5,0	5,0	9,34 $\pm$ 0,43 f	0,29 $\pm$ 0,09 de	0,65 $\pm$ 0,00 k

<sup>a</sup>Médias de cinco repetições seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si de acordo, respectivamente, com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). MS= massa seca.

Através dos resultados mostrados na tabela 17 observa-se que a maior concentração (0,40  $\mu\text{g/g MS}$ ) de clorofila *a* ocorreu em calos cultivados com glucose, na presença de 5  $\mu\text{M}$  de BAP e 2,5  $\mu\text{M}$  de ANA, enquanto que as maiores concentrações de clorofila *b* (0,14  $\mu\text{g/g MS}$ ) foram observadas, com sacarose e concentrações de 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 2,5  $\mu\text{M}$  de ANA, e com glucose, nas concentrações de 5  $\mu\text{M}$  de BAP e 2,5  $\mu\text{M}$  de ANA.

Com sacarose e frutose os maiores teores de clorofila *a* (0,31  $\mu\text{g/g MS}$  e 0,28  $\mu\text{g/g MS}$ ) ocorreram, respectivamente, com 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 2,5  $\mu\text{M}$  de ANA. Com frutose a maior concentração de clorofila *b* (0,11  $\mu\text{g/g MS}$ ) foi observada também nas concentrações de 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 2,5  $\mu\text{M}$  de ANA.

O tratamento que apresentou as menores concentrações de clorofilas *a* e *b* foi aquele em que os calos foram cultivados em glucose, nas concentrações de 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA. Com sacarose os menores teores de clorofilas *a* e *b* ocorreram com 5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA.

**Tabela 17.** Efeito de fontes de carbono e de combinações de BAP e ANA sobre os conteúdos de clorofilas *a* e *b* de calos de *Cedrela fissilis* cultivados, durante 8 semanas, a partir de nós cotiledonares em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de sacarose, frutose ou glucose e 2,73 mM de glutamina. Em negrito os melhores tratamentos.

Fonte de carbono	de BAP ( $\mu\text{M}$ )	ANA ( $\mu\text{M}$ )	Clorofila <i>a</i> ( $\mu\text{g/g MS}$ ) <sup>a</sup>	Clorofila <i>b</i> ( $\mu\text{g/g MS}$ ) <sup>a</sup>
Sacarose	2,5	5,0	0,18 $\pm$ 0,00 f	0,10 $\pm$ 0,00 de
	5,0	2,5	0,26 $\pm$ 0,00 d	0,12 $\pm$ 0,00 b
	2,5	2,5	0,31 $\pm$ 0,00 b	0,14 $\pm$ 0,00 a
	5,0	5,0	0,13 $\pm$ 0,00 h	0,09 $\pm$ 0,00 ef
Frutose	2,5	5,0	0,24 $\pm$ 0,01 e	0,08 $\pm$ 0,01 f
	5,0	2,5	0,24 $\pm$ 0,00 e	0,08 $\pm$ 0,00 f
	2,5	2,5	0,28 $\pm$ 0,00 c	0,11 $\pm$ 0,00 cd
	5,0	5,0	0,24 $\pm$ 0,00 e	0,09 $\pm$ 0,00 f
Glucose	2,5	5,0	0,08 $\pm$ 0,00 i	0,04 $\pm$ 0,00 g
	5,0	2,5	0,40 $\pm$ 0,00 a	0,14 $\pm$ 0,00 a
	2,5	2,5	0,28 $\pm$ 0,00 c	0,12 $\pm$ 0,00 bc
	5,0	5,0	0,14 $\pm$ 0,00 g	0,09 $\pm$ 0,00 f

<sup>a</sup>Médias de cinco repetições seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si de acordo, respectivamente, com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). MS= massa seca.

A tabela 18 abaixo sumariza os tratamentos que produziram os melhores resultados para a produção de fenólicos totais, flavonoides totais, carotenoides, clorofila *a* e clorofila *b* pelos calos de *C. fissilis*, através da manipulação das fontes de carbono e das concentrações de BAP e ANA. Os resultados indicam que, na presença de 118 mM da fonte de carbono e 2,73 mM de glutamina são requeridos tipos de fontes de carbono e concentrações de BAP e ANA específicas para otimizar a produção de cada um dos parâmetros estudados.

**Tabela 18:** Concentrações de BAP e ANA que produziram as maiores concentrações de fenólicos totais, flavonoides totais e carotenoides em calos de *Cedrela fissilis* cultivados, durante 8 semanas, a partir de nós cotiledonares em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de sacarose, frutose ou glucose e 2,73 mM de glutamina.

Parâmetros	Tratamentos
Fenólicos totais	Sacarose + 2,5 µM BAP + 2,5 µM ANA
Flavonoides totais	Glucose + 2,5 µM BAP + 2,5 µM ANA
Carotenoides	Sacarose + 5 µM BAP + 2,5 µM ANA
Clorofila <i>a</i>	Glucose + 5 µM BAP + 2,5 µM ANA
Clorofila <i>b</i>	Sacarose + 2,5 µM BAP + 2,5 µM ANA
	Glucose + 5 µM BAP + 2,5 µM ANA

### 7.3.3 Efeito de fontes de carbono, tipos de explantes, glutamina e presença e ausência de luz sobre os teores de fenólicos totais, flavonoides, carotenoides e clorofilas *a* e *b* em calos de *Cedrela fissilis*

Nesses experimentos foram quantificados os fenólicos totais, flavonoides totais, carotenoides, clorofilas *a* e *b* em calos de *C. fissilis*, produzidos, após 8 semanas de cultivo, a partir de diferentes tipos de explantes cultivados em meio de cultura MS, suplementado com 118 mM de sacarose, glucose ou frutose, 2,73 mM de glutamina, 2,5 µM de BAP, 5 µM de ANA e 0,2% de Phytigel (Sigma). Os carotenoides foram analisados apenas em calos cultivados na luz devido ao baixo teor verificado nos calos cultivados no escuro.



### 7.3.3.1 Efeito da sacarose sobre os teores de fenólicos totais, flavonoides, carotenoides e clorofilas a e b de calos de *Cedrela fissilis*

Os resultados da tabela 19 indicam que, com sacarose, os maiores teores de fenólicos totais e flavonoides totais foram observados na luz em calos de cotilédone cultivados na presença de glutamina, enquanto que o maior teor de carotenoides foi detectado na luz, em calos de folha, na ausência de glutamina. Assim, calos de cotilédone, na presença de glutamina, apresentaram os maiores teores de fenólicos totais (51,35 µg/g MS) e flavonoides totais (1,35 µg/g MS), mas o maior nível de carotenoides foi observado, na luz, em calos obtidos a partir de folha (2,22 µg/g MS), mas na ausência de glutamina. As análises não foram efetuadas para calos de folha na luz, pois com sacarose a biomassa de calos foi insuficiente para as análises.

**Tabela 19:** Efeito da sacarose, luz, escuro, tipo de explante e glutamina sobre a concentração de fenólicos totais, flavonoides totais e carotenoides de calos de *Cedrela fissilis* cultivados durante 8 semanas em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de sacarose, 0 ou 2,73 mM de glutamina, 2,5 µM de BAP e 5 µM de ANA. Em negrito os melhores tratamentos.

Condição de cultura	Tipo de explante	Glutamina (mM)	Fenólicos totais (µg/g MS) <sup>a</sup>	Flavonoides totais (µg/g MS) <sup>a</sup>	Carotenoides (µg/g MS) <sup>a</sup>	
Luz	Nó cotiledonar	0	18,22 ± 1,04 gh	0,97 ± 0,04 d	0,73 ± 0,01 j	
		2,73	17,47 ± 1,15 gh	1,16 ± 0,02 b	0,39 ± 0,00 k	
	Folha	0	26,75 ± 0,97 e	0,83 ± 0,03 ef	2,22 ± 0,01 a	
		2,73	-	-	-	
	Nó foliar	0	25,75 ± 1,17 e	0,69 ± 0,12 gh	1,37 ± 0,01 d	
		2,73	10,91 ± 1,67 kl	0,77 ± 0,01 fg	0,73 ± 0,00 j	
	Cotilédone	0	26,66 ± 2,14 e	0,83 ± 0,01 ef	1,21 ± 0,01 e	
		2,73	51,35 ± 1,74 a	1,35 ± 0,09 a	1,63 ± 0,00 b	
	Hipocótilo	0	21,96 ± 1,62 f	1,09 ± 0,12 bc	1,39 ± 0,00 c	
		2,73	12,50 ± 1,51 ijk	0,95 ± 0,04 d	0,78 ± 0,00 i	
	Raiz	0	31,86 ± 2,80 cd	0,37 ± 0,06 jk	0,86 ± 0,01 g	
		2,73	28,59 ± 1,46 de	0,30 ± 0,06 kl	-	
	Epicótilo	0	12,69 ± 2,31 ijk	0,23 ± 0,03 lm	0,80 ± 0,03 h	
		2,73	14,71 ± 2,15 hij	1,04 ± 0,04 cd	0,91 ± 0,00 f	
	Escuro	Nó cotiledonar	0	18,91 ± 0,95 fg	0,77 ± 0,02 fg	
			2,73	10,98 ± 0,87 kl	0,41 ± 0,02 ij	
		Folha	0	33,86 ± 3,16 bc	0,50 ± 0,01 i	
			2,73	36,36 ± 1,33 b	0,93 ± 0,01 de	
Nó foliar		0	12,96 ± 0,10 ijk	0,50 ± 0,04 i		
		2,73	12,45 ± 0,10 ijk	0,15 ± 0,04 m		
Cotilédone		0	19,54 ± 0,59 fg	1,03 ± 0,01 cd		
		2,73	16,04 ± 1,07 ghi	0,69 ± 0,05 gh		
Hipocótilo		0	11,16 ± 0,35 jkl	0,49 ± 0,04 i		
		2,73	7,66 ± 1,03 l	0,24 ± 0,00 lm		
Raiz		0	17,97 ± 1,12 gh	0,31 ± 0,01 jkl		
		2,73	10,89 ± 0,49 kl	0,52 ± 0,01 i		
Epicótilo		0	18,45 ± 0,82 fg	0,65 ± 0,05 h		
		2,73	18,52 ± 2,48 fg	0,37 ± 0,06 jk		

<sup>a</sup>Médias de no mínimo cinco repetições seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). MS= massa seca. - Biomassa insuficiente (não ocorreu formação de calos).

Na luz, na maioria dos tratamentos (Tabela 19), exceto para nó cotiledonar, cotilédone e epicótilo, a glutamina diminuiu os teores de fenólicos totais. O mesmo efeito inibidor da glutamina foi verificado no escuro, em que, apenas houve aumento dos fenólicos totais na presença de glutamina em calos originários do cultivo de segmentos de folha. Em alguns casos como, nos calos produzidos a partir de nó cotiledonar na

luz, nó foliar e epicótilo, no escuro a glutamina não influenciou a formação de fenólicos totais.

Na tabela 19, observa-se que o tratamento que apresentou maior conteúdo de fenólicos totais foi o de calos de cotilédone, cultivados com glutamina ( $51,35 \pm 1,74 \mu\text{g/g MS}$ ), sendo que os demais tratamentos que apresentaram teores significativos foram de calos cultivados sem glutamina (raiz=  $31,86 \pm 2,80$ ; folha=  $26,75 \pm 0,97$ ; cotilédone=  $26,66 \pm 2,14$ ; nó foliar=  $25,75 \pm 1,17$ ; hipocótilo=  $21,96 \pm 1,62 \mu\text{g/g MS}$ ). O tratamento que apresentou a menor concentração de fenólicos totais foi o de calos de nó foliar, cultivados com glutamina ( $10,91 \pm 1,67 \mu\text{g/g MS}$ ). No tratamento em que foram utilizados segmentos de folha cultivados com glutamina, não houve formação de calos.

Assim, na luz e sem glutamina, os níveis de fenólicos totais foram no mínimo de  $12,69 \mu\text{g/g MS}$ , em calos de epicótilo e no máximo de  $31,86 \mu\text{g/g MS}$ , em calos de raiz, enquanto que, com glutamina, o menor valor foi observado para os calos de nó foliar ( $10,91 \mu\text{g/g MS}$ ) e o maior valor ( $51,35 \mu\text{g/g MS}$ ) em calos de cotilédone.

A tabela 19 apresenta os níveis de fenólicos totais para os tratamentos cultivados no escuro. Observa-se que os tratamentos realizados com segmentos de folhas, cultivados com e sem glutamina apresentaram os maiores teores destes compostos ( $36,36 \pm 1,33$ ;  $33,86 \pm 1,00 \mu\text{g/g MS}$  respectivamente). A presença de glutamina no meio de cultura não alterou as concentrações dos compostos fenólicos totais, em calos de folha, nó foliar, cotilédone, hipocótilo e epicótilo cultivados no escuro. No escuro, o tratamento que apresentou a menor concentração de fenólicos totais, foi o de calos de hipocótilo, cultivados com glutamina ( $7,66 \pm 1,03 \mu\text{g/g MS}$ ).

Com relação aos flavonoides totais, por outro lado, observa-se que na luz, na maioria dos tratamentos a glutamina estimulou a síntese de flavonoides, exceto em calos de hipocótilo e raiz. No escuro, na presença de glutamina, houve diminuição na produção de flavonoides nos calos de nó cotiledonar, nó foliar e hipocótilo e promoção em calos de folha, cotilédone e raiz (Tabela 19).

Na tabela 19 observa-se que, na luz, o tratamento que apresentou significativamente o maior conteúdo de flavonoides foi o de calos de cotilédone, cultivados com glutamina ( $1,35 \pm 0,02 \mu\text{g/g MS}$ ). Já entre os tratamentos realizados na ausência de glutamina, o tratamento que apresentou maior teor deste composto foi o de calos de hipocótilo ( $1,09 \pm 0,02 \mu\text{g/g MS}$ ). Entre todos os tratamentos, o que apresentou menor conteúdo de flavonoides foi o de calos de epicótilo, cultivados sem

glutamina ( $0,23 \pm 0,03 \mu\text{g/g MS}$ ). No tratamento em que segmentos de folha foram cultivados com glutamina não ocorreu formação de calos.

Entre os tratamentos cultivados no escuro (Tabela 19), observa-se que para cada tipo de explante houve diferença significativa, quanto aos níveis de flavonoides, entre aqueles cultivados com glutamina e sem glutamina. O tratamento que significativamente apresentou maior concentração de flavonoides foi o realizado com calos de cotilédone, cultivados sem glutamina ( $1,03 \pm 0,01 \mu\text{g/g MS}$ ). O tratamento que apresentou o menor conteúdo de flavonoides foi o realizado com calos de hipocótilo, cultivados com glutamina ( $0,24 \pm 0,00 \mu\text{g/g MS}$ ).

Na ausência de glutamina, na luz, os teores de flavonoides variaram de  $0,23 \mu\text{g/g MS}$ , em calos de epicótilo, a  $1,09 \mu\text{g/g MS}$ , em calos de hipocótilo e no escuro, variaram de  $0,31 \mu\text{g/g MS}$ , em calos de raiz a  $1,03 \mu\text{g/g MS}$ , em calos de cotilédone. No escuro, o maior teor de fenólicos totais foi observado em calos de folha ( $33,86 \mu\text{g/g MS}$  e  $36,36 \mu\text{g/g MS}$ ), tanto na presença como na ausência de glutamina e o maior nível de flavonoides totais ( $0,93 \mu\text{g/g MS}$ ), também foi verificado em calos de folhas cultivados com glutamina.

Os teores de carotenoides aumentaram na presença de glutamina, em calos oriundos de cotilédone, e epicótilo, mas diminuíram em calos de nó cotiledonar, nó foliar e hipocótilo (Tabela 19). Observa-se ainda que, os teores de carotenoides diferiram significativamente entre os tipos de tratamentos estudados e que o tratamento de calos de folha, cultivados sem a glutamina, apresentou maior concentração de carotenoides ( $2,22 \pm 0,01 \mu\text{g/g MS}$ ), enquanto que o tratamento de nó cotiledonar, cultivado na presença de glutamina, na luz apresentou a menor concentração ( $0,39 \pm 0,00 \mu\text{g/g MS}$ ). As concentrações de carotenoides para os tratamentos cultivados sem a glutamina foram maiores estatisticamente (nó cotiledonar =  $0,73 \mu\text{g/g MS}$ ; hipocótilo =  $1,39 \pm 0,00$ ; nó foliar =  $1,37 \pm 0,01$ ; cotilédone =  $1,21 \pm 0,01 \mu\text{g/g MS}$ ) do que os tratamentos com glutamina. Para cotilédone e epicótilo, a presença de glutamina aumentou significativamente os teores de carotenoides (cotilédone =  $1,63 \pm 0,00$ ; epicótilo =  $0,91 \pm 0,00 \mu\text{g/g MS}$ ). No tratamento de segmentos de folha cultivados com glutamina e sacarose não houve a formação de calos.

Os resultados apresentados na tabela 20 indicam que os calos de cotilédone, cultivados com glutamina apresentaram significativamente a maior concentração de clorofila *a* e clorofila *b*, diferindo dos demais tratamentos analisados ( $1,06 \pm 0,00$ ;  $0,44 \pm 0,00 \mu\text{g/g MS}$  respectivamente), sendo que o tratamento de folha, cultivado sem glutamina apresentou significativamente a segunda maior concentração

para clorofila *a* e *b* ( $0,82 \pm 0,01$ ;  $0,33 \pm 0,01$   $\mu\text{g/g MS}$  respectivamente). Observa-se que, para os calos de nós foliares e cotilédone a presença de glutamina aumentou as concentrações de clorofila *a* e no caso da clorofila *b*, as concentrações foram aumentadas na presença de glutamina em calos de cotilédone, hipocótilo, raiz e epicótilo.

O tratamento que apresentou a menor concentração para a clorofila *a*, foi o de calos de raiz, cultivados com glutamina ( $0,06 \pm 0,00$   $\mu\text{g/g MS}$ ) e para a clorofila *b*, o tratamento que apresentou a menor concentração foi o de calos de cotilédone e epicótilo, cultivados sem glutamina ( $0,008 \pm 0,00$ ;  $0,01 \pm 0,00$   $\mu\text{g/g MS}$  respectivamente). Observa-se ainda que, as concentrações de clorofilas *a* e *b* se variaram entre os tipos de explante, sendo, em alguns tratamentos, significativamente iguais, como no caso da clorofila *a* para nó cotiledonar com glutamina e nó foliar sem glutamina.

**Tabela 20:** Efeito da sacarose, tipo de explante e glutamina sobre os conteúdos de clorofilas *a* e *b* de calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de diferentes tipos de explantes cultivados na luz, durante 8 semanas, em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de sacarose, 0 ou 2,73 mM de glutamina, 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA.

Tipo de explante	Glutamina (mM)	Clorofila <i>a</i> ( $\mu\text{g/g MS}$ ) <sup>a</sup>	Clorofila <i>b</i> ( $\mu\text{g/g MS}$ ) <sup>a</sup>
Nó cotiledonar	0	0,46 $\pm$ 0,01 e	0,15 $\pm$ 0,00 d
	2,73	0,30 $\pm$ 0,00 g	0,16 $\pm$ 0,00 d
Folha	0	0,82 $\pm$ 0,01 b	0,33 $\pm$ 0,01 b
	2,73	-	-
Nó foliar	0	0,30 $\pm$ 0,01 g	0,18 $\pm$ 0,00 c
	2,73	0,32 $\pm$ 0,00 f	0,17 $\pm$ 0,00 c
Cotilédone	0	0,66 $\pm$ 0,01 c	0,008 $\pm$ 0,00 j
	2,73	1,06 $\pm$ 0,00 a	0,44 $\pm$ 0,00 a
Hipocótilo	0	0,51 $\pm$ 0,01 d	0,01 $\pm$ 0,00 i
	2,73	0,21 $\pm$ 0,00 i	0,12 $\pm$ 0,00 f
Raiz	0	0,27 $\pm$ 0,01 h	0,03 $\pm$ 0,00 h
	2,73	0,06 $\pm$ 0,00 k	0,06 $\pm$ 0,00 g
Epicótilo	0	0,18 $\pm$ 0,00 j	0,007 $\pm$ 0,00 j
	2,73	0,17 $\pm$ 0,00 j	0,13 $\pm$ 0,00 e

<sup>a</sup>Médias de no mínimo cinco repetições seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si.

### 7.3.3.2 Efeito da frutose sobre os teores de fenólicos totais, flavonoides, carotenoides e clorofilas *a* e *b* de calos de *Cedrela fissilis*

Os resultados da tabela 21 indicam que, com frutose, os maiores teores de fenólicos totais (33,31  $\mu\text{g/g MS}$ ) foram observados em calos produzidos a partir de nó cotiledonar, na ausência de glutamina. Os maiores níveis de flavonoides e carotenoides, contudo foram detectados, na luz, em calos de folha, na ausência de glutamina (1,71  $\mu\text{g/g MS}$ ), e de folha, na presença de glutamina (5,39  $\mu\text{g/g MS}$ ), respectivamente.

Na luz, na maioria dos tratamentos, exceto em calos de raiz e epicótilo, e no escuro, exceto em calos de raiz, a glutamina reduziu os teores de fenólicos totais. O mesmo ocorreu para os flavonoides totais, com exceção de calos de nó foliar e epicótilo, na luz, e de hipocótilo e raiz, no escuro. Entretanto, as concentrações de carotenoides

aumentaram na presença de frutose e glutamina, em todos os tratamentos, com exceção dos calos de nó foliar, em que houve diminuição da concentração.

Os tratamentos que apresentaram os menores teores de fenólicos totais, flavonoides totais e carotenoides, na presença de frutose foram, respectivamente, os calos produzidos a partir de segmentos de hipocótilo, com glutamina, no escuro (2,34  $\mu\text{g/g MS}$ ), calos de epicótilo, com glutamina, no escuro (0,10  $\mu\text{g/g MS}$ ) e calos de epicótilo, sem glutamina na luz (0,64  $\mu\text{g/g MS}$ ).

**Tabela 21:** Efeito da frutose, luz, escuro, tipo de explante e glutamina sobre a concentração de fenólicos totais, flavonoides totais e carotenoides de calos de *Cedrela fissilis* cultivados durante 8 semanas em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de frutose, 0 ou 2,73 mM de glutamina, 2,5  $\mu$ M de BAP e 5  $\mu$ M de ANA.

Condição de cultura	Tipo de explante	de Glutamina (mM)	Fenólicos totais ( $\mu$ g/g MS) <sup>a</sup>	Flavonoides totais ( $\mu$ g/g MS) <sup>a</sup>	Carotenoides ( $\mu$ g/g MS) <sup>a</sup>	
Luz	Nó cotiledonar	0	7,02 $\pm$ 0,21 hi	0,83 $\pm$ 0,06 d	1,05 $\pm$ 0,10 g	
		2,73	5,88 $\pm$ 0,35 ijkl	0,71 $\pm$ 0,15 df	1,23 $\pm$ 0,04 g	
	Folha	0	14,81 $\pm$ 1,31 b	1,71 $\pm$ 0,06 a	3,17 $\pm$ 0,10 d	
		2,73	11,20 $\pm$ 0,33 cd	1,42 $\pm$ 0,02 b	5,39 $\pm$ 0,06 a	
	Nó foliar	0	8,64 $\pm$ 0,57 fg	0,19 $\pm$ 0,07 jk	1,21 $\pm$ 0,03 g	
		2,73	4,30 $\pm$ 0,24 mn	0,69 $\pm$ 0,03 df	1,19 $\pm$ 0,02 g	
	Cotilédone	0	15,41 $\pm$ 1,22 b	1,55 $\pm$ 0,06 b	3,57 $\pm$ 0,07 c	
		2,73	6,62 $\pm$ 0,61 hij	1,27 $\pm$ 0,07 c	4,91 $\pm$ 0,17 b	
	Hipocótilo	0	6,52 $\pm$ 0,30 hijk	0,80 $\pm$ 0,04 d	0,69 $\pm$ 0,02 h	
		2,73	4,50 $\pm$ 0,79 lmn	0,57 $\pm$ 0,07 efg	1,90 $\pm$ 0,06 e	
	Raiz	0	12,57 $\pm$ 0,82 c	0,20 $\pm$ 0,04 jk	1,04 $\pm$ 0,01 g	
		2,73	15,02 $\pm$ 0,14 b	0,19 $\pm$ 0,09 jk	1,65 $\pm$ 0,25 f	
	Epicótilo	0	4,83 $\pm$ 0,55 lmn	0,37 $\pm$ 0,03 hi	0,64 $\pm$ 0,05 h	
		2,73	6,59 $\pm$ 0,45 hij	0,64 $\pm$ 0,05 f	1,20 $\pm$ 0,11 g	
	Escuro	Nó cotiledonar	0	33,31 $\pm$ 0,43 a	0,37 $\pm$ 0,02 hi	
			2,73	7,24 $\pm$ 0,58 ghi	0,43 $\pm$ 0,08 ghi	
Folha		0	11,77 $\pm$ 1,43 cd	0,33 $\pm$ 0,05 ij		
		2,73	10,60 $\pm$ 0,14 de	0,48 $\pm$ 0,02 efg		
Nó foliar		0	6,84 $\pm$ 0,15 hij	0,48 $\pm$ 0,00 efghi		
		2,73	4,12 $\pm$ 0,56 mn	0,15 $\pm$ 0,03 k		
Cotilédone		0	7,49 $\pm$ 0,61 gh	0,68 $\pm$ 0,03 def		
		2,73	5,14 $\pm$ 0,03 klmn	0,48 $\pm$ 0,06 egh		
Hipocótilo		0	9,14 $\pm$ 0,16 f	0,24 $\pm$ 0,01 ijk		
		2,73	2,34 $\pm$ 0,22 o	0,32 $\pm$ 0,02 ij		
Raiz		0	5,42 $\pm$ 0,36 jklm	0,32 $\pm$ 0,05 ij		
		2,73	14,80 $\pm$ 0,13 b	0,39 $\pm$ 0,03 hi		
Epicótilo		0	9,60 $\pm$ 0,53 ef	0,26 $\pm$ 0,01hijk		
		2,73	3,79 $\pm$ 0,17 n	0,10 $\pm$ 0,01 k		

<sup>a</sup>Médias de no mínimo cinco repetições seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). MS= massa seca.

Na presença de frutose, os maiores níveis de fenólicos totais, na luz e na ausência de glutamina (Tabela 21), foram observados em calos de cotilédone (15,41  $\mu$ g/g MS), enquanto que com glutamina, em calos raiz (15,02  $\mu$ g/g MS). Na luz a presença de glutamina no meio de cultura aumentou a produção de fenólicos totais apenas em calos de raiz e epicótilo, diminuindo nos demais tratamentos (Tabela 21). Observa-se



também que o tratamento que apresentou a menor concentração foi aquele em que foram utilizados segmentos de nó foliar para indução de calos, cultivados com glutamina ( $4,30 \pm 0,24 \mu\text{g/g MS}$ ).

A tabela 21, que apresenta os níveis de fenólicos totais, em calos cultivados em frutose e no escuro mostra que, em todos os tratamentos, exceto com folha, os calos cultivados com glutamina apresentaram níveis de compostos fenólicos significativamente diferentes daqueles cultivados sem glutamina. O tratamento que apresentou maior valor foi o de calos produzidos a partir de nós cotiledonares cultivados sem glutamina ( $33,31 \pm 0,43 \mu\text{g/g MS}$ ), quando comparados com os outros tratamentos. Observa-se ainda que o tratamento que apresentou o menor conteúdo de fenólicos totais foi calos de hipocótilo, cultivados com glutamina ( $2,34 \pm 0,22 \mu\text{g/g MS}$ ).

Quanto aos flavonoides, com frutose e na luz (Tabela 21) os calos originários de folha, na ausência de glutamina produziram a maior concentração ( $1,71 \mu\text{g/g MS}$ ) e no escuro (Tabela 21), os maiores níveis de flavonoides foram detectados em calos de cotilédone ( $0,68 \mu\text{g/g MS}$ ), também na ausência de glutamina. Verifica-se que, na luz, apenas para os calos de nó cotiledonar e raiz a glutamina não afetou os níveis de flavonoides, sendo que em todos os outros tratamentos a presença de glutamina aumentou (nó foliar, epicótilo) ou diminuiu (folha, cotilédone, hipocótilo) as concentrações desses compostos.

Na tabela 21, observa-se que, na presença de frutose e no escuro, os calos apresentaram menores concentrações de flavonoides, do que quando comparados com calos cultivados na luz (Tabela 21). O tratamento que apresentou maior concentração de flavonoides foi o de calos produzidos a partir da cultura de segmentos de cotilédones cultivados sem glutamina ( $0,68 \pm 0,03 \mu\text{g/g MS}$ ). Já o tratamento que apresentou o menor conteúdo de flavonoides foi o de calos de epicótilo, cultivados com glutamina ( $0,10 \pm 0,01 \mu\text{g/g MS}$ ). Verifica-se que, no escuro, em todos os tratamentos, exceto folha e nó foliar, a presença de glutamina não afetou os níveis de flavonoides nos calos.

Os níveis de carotenoides, com frutose, na luz (Tabela 21) foram maiores em calos de folhas cultivados com glutamina ( $5,39 \pm 0,06 \mu\text{g/g MS}$ ). Os tratamentos de cotilédone cultivados com ou sem glutamina e de folha, cultivados sem glutamina também apresentaram níveis elevados de carotenoides variando de  $3,17 \pm 0,10$  a  $4,91 \pm 0,17 \mu\text{g/g MS}$ , respectivamente. Já os tratamentos que apresentaram os menores conteúdos de carotenoides foram os calos de hipocótilo e epicótilo ( $0,69 \pm 0,02$ ;  $0,64 \pm 0,05 \mu\text{g/g MS}$  respectivamente).

Através dos resultados apresentados na tabela 22 verifica-se que, com frutose, os maiores teores de clorofila *a* (1,06 e 1,04  $\mu\text{g/g MS}$ ) foram observados em calos produzidos a partir de segmentos de folha e cotilédone, na ausência de glutamina e a maior concentração de clorofila *b* (0,45  $\mu\text{g/g MS}$ ) ocorreu em calos provenientes do cultivo de segmentos de folha, também na ausência de glutamina. As menores concentrações de clorofilas *a* (0,22  $\mu\text{g/g MS}$ ) e *b* (0,01  $\mu\text{g/g MS}$ ) ocorreram em calos de hipocótilo, na ausência de glutamina e em calos de nó foliar, também na ausência de glutamina.

As concentrações de clorofila *a* diminuíram na presença de glutamina, na maioria dos tratamentos com frutose, exceto nos calos produzidos a partir de segmentos de hipocótilo. Por outro lado, as concentrações de clorofila *b* aumentaram, na presença de glutamina, na maioria dos tratamentos, sendo que diminuíram apenas em calos de folha. Em calos produzidos a partir de segmentos de hipocótilo a produção de clorofila *b* não foi afetada pela glutamina.

**Tabela 22:** Efeito da frutose, tipo de explante e glutamina sobre os conteúdos de clorofilas *a* e *b* de calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de diferentes tipos de explantes cultivados na luz, durante 8 semanas, em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de frutose, 0 ou 2,73 mM de glutamina, 2,5  $\mu$ M de BAP e 5  $\mu$ M de ANA.

Tipo de explante	Glutamina (mM)	Clorofila <i>a</i> ( $\mu$ g/g MS) <sup>a</sup>	Clorofila <i>b</i> ( $\mu$ g/g MS) <sup>a</sup>
Nó cotiledonar	0	0,43 $\pm$ 0,01 e	0,08 $\pm$ 0,00 h
	2,73	0,33 $\pm$ 0,00 f	0,11 $\pm$ 0,00 ef
Folha	0	1,05 $\pm$ 0,00 a	0,45 $\pm$ 0,00 a
	2,73	0,86 $\pm$ 0,00 b	0,27 $\pm$ 0,00 c
Nó foliar	0	0,55 $\pm$ 0,01 d	0,01 $\pm$ 0,00 j
	2,73	0,25 $\pm$ 0,00 g	0,10 $\pm$ 0,00 fg
Cotilédone	0	1,04 $\pm$ 0,00 a	0,42 $\pm$ 0,00 b
	2,73	0,76 $\pm$ 0,00 c	0,25 $\pm$ 0,00 d
Hipocótilo	0	0,22 $\pm$ 0,01 g	0,11 $\pm$ 0,00 ef
	2,73	0,32 $\pm$ 0,00 f	0,12 $\pm$ 0,00 e
Raiz	0	0,35 $\pm$ 0,02 f	0,04 $\pm$ 0,01 i
	2,73	0,23 $\pm$ 0,00 g	0,09 $\pm$ 0,00 gh
Epicótilo	0	0,36 $\pm$ 0,07 f	0,06 $\pm$ 0,03 i
	2,73	0,24 $\pm$ 0,00 g	0,08 $\pm$ 0,00 h

<sup>a</sup>Médias de no mínimo cinco repetições seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). MS= massa seca.

Observa-se na tabela 22 que, seguindo os tratamentos que apresentaram significativamente as maiores concentrações de clorofila *a* foram (calos de folha e cotilédone sem glutamina), os tratamentos que também apresentaram concentrações significativas de clorofila *a* foram calos de folha e cotilédone, cultivados com glutamina (0,86  $\pm$  0,00; 0,76  $\pm$  0,00  $\mu$ g/g MS respectivamente) e para a clorofila *b* (0,27  $\pm$  0,00; 0,25  $\pm$  0,00  $\mu$ g/g MS respectivamente). Nota-se que as menores concentrações de clorofila *a* foram detectadas em calos de raiz, cultivados com glutamina e em calos de hipocótilo, cultivados sem glutamina (0,23  $\pm$  0,00; 0,22  $\pm$  0,01  $\mu$ g/g MS respectivamente). Para a clorofila *b*, as menores concentrações foram encontradas em calos de nó foliar, cultivados sem glutamina (0,01  $\pm$  0,00  $\mu$ g/g MS).

### 7.3.3.3. Efeito da glucose sobre os teores de fenólicos totais, flavonoides, carotenoides e clorofilas a e b de calos de *Cedrela fissilis*

Os resultados da tabela 23 indicam que, com glucose, os maiores teores de fenólicos totais (18,82  $\mu\text{g/g MS}$  e 18,25  $\mu\text{g/g MS}$ ) foram observados em calos produzidos, no escuro, a partir de folha e de raiz, na ausência de glutamina. Os maiores níveis de flavonoides ocorreram na luz, em calos de folha e de cotilédone, na presença de glutamina (0,83  $\mu\text{g/g MS}$  e 0,89  $\mu\text{g/g MS}$ , respectivamente). Calos de folha cultivados na presença de glutamina também apresentaram a maior concentração de carotenoides (5,62  $\mu\text{g/g MS}$ ).

Com glucose, na luz, na maioria dos tratamentos, exceto em calos de nó cotiledonar e folha, e no escuro, exceto em calos de folha, cotilédone e raiz, a glutamina aumentou os teores de fenólicos totais. Para os flavonoides totais, com exceção de calos de nó cotiledonar, nó foliar e epicótilo, na luz e no escuro, com exceção de calos de cotilédone, hipocótilo, raiz e epicótilo, a presença de glutamina também promoveu a produção, o mesmo ocorrendo com os carotenoides, em todos os tratamentos.

**Tabela 23:** Efeito da glucose, luz, escuro, tipo de explante e glutamina sobre a concentração de fenólicos totais, flavonoides totais e carotenoides de calos de *Cedrela fissilis* cultivados durante 8 semanas em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de glucose, 0 ou 2,73 mM de glutamina, 2,5  $\mu$ M de BAP e 5  $\mu$ M de ANA.

Condição de cultura	Tipo de explante	Glutamina (mM)	Fenólicos totais ( $\mu$ g/g MS) <sup>a</sup>	Flavonoides totais ( $\mu$ g/g MS) <sup>a</sup>	Carotenoides ( $\mu$ g/g MS) <sup>a</sup>	
Luz	Nó cotiledonar	0	5,49 $\pm$ 1,70 jkl	0,29 $\pm$ 0,04 e f g h	0,77 $\pm$ 0,02 g	
		2,73	4,79 $\pm$ 0,08 k l m	0,26 $\pm$ 0,01 e f g h i j	1,14 $\pm$ 0,04 e f	
	Folha	0	16,36 $\pm$ 2,25 b	0,61 $\pm$ 0,07 b	2,93 $\pm$ 0,03 d	
		2,73	12,64 $\pm$ 0,25 c	0,83 $\pm$ 0,01 a	5,62 $\pm$ 0,29 a	
	Nó foliar	0	3,55 $\pm$ 0,21 m n	0,28 $\pm$ 0,03 e f g h i	1,29 $\pm$ 0,02 e f	
		2,73	6,11 $\pm$ 0,27 h i j k	0,19 $\pm$ 0,02 i j	1,36 $\pm$ 0,10 e	
	Cotilédone	0	5,57 $\pm$ 0,74 j k l	0,42 $\pm$ 0,07 c d	3,57 $\pm$ 0,07 c	
		2,73	6,66 $\pm$ 0,37 g h i j	0,89 $\pm$ 0,01 a	4,42 $\pm$ 0,17 b	
	Hipocótilo	0	1,72 $\pm$ 0,36 o	0,10 $\pm$ 0,01 k l	0,59 $\pm$ 0,04 g	
		2,73	4,16 $\pm$ 0,36 l m n	0,20 $\pm$ 0,04 i j	0,80 $\pm$ 0,10 g	
	Raiz	0	8,37 $\pm$ 0,69 f g	0,19 $\pm$ 0,03 i j	0,24 $\pm$ 0,00 h	
		2,73	11,42 $\pm$ 1,41 c d	0,33 $\pm$ 0,02 e f	1,34 $\pm$ 0,13 e f	
	Epicótilo	0	2,59 $\pm$ 0,24 n o	0,48 $\pm$ 0,08 c	0,75 $\pm$ 0,14 g	
		2,73	5,44 $\pm$ 0,11 j k l	0,18 $\pm$ 0,03 j k	1,09 $\pm$ 0,03 f	
	Escuro	Nó cotiledonar	0	5,83 $\pm$ 0,46 i j k l	0,07 $\pm$ 0,03 l	
			2,73	11,80 $\pm$ 1,73 c d	0,10 $\pm$ 0,01 k l	
Folha		0	18,82 $\pm$ 0,10 a	0,44 $\pm$ 0,01 c d		
		2,73	16,29 $\pm$ 0,51 b	0,68 $\pm$ 0,09 b		
Nó foliar		0	4,26 $\pm$ 0,19 l m n	0,20 $\pm$ 0,01 i j		
		2,73	8,98 $\pm$ 0,35 e f	0,29 $\pm$ 0,04 e f g		
Cotilédone		0	12,39 $\pm$ 0,22 c	0,63 $\pm$ 0,04 b		
		2,73	10,46 $\pm$ 0,21 d e	0,50 $\pm$ 0,02 c		
Hipocótilo		0	7,48 $\pm$ 0,37 f g h i	0,36 $\pm$ 0,03 d e		
		2,73	9,10 $\pm$ 0,30 e f	0,29 $\pm$ 0,03 e f g h		
Raiz		0	18,25 $\pm$ 0,14 a	0,37 $\pm$ 0,01 d e		
		2,73	15,37 $\pm$ 0,36 b	0,20 $\pm$ 0,02 h i j		
Epicótilo		0	5,90 $\pm$ 0,22 h i j k l	0,23 $\pm$ 0,04 g h i j		
		2,73	7,66 $\pm$ 0,11 f g h	0,18 $\pm$ 0,03 j k		

<sup>a</sup>Médias de no mínimo cinco repetições seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). MS= massa seca.

Na presença de glucose, os maiores níveis de fenólicos totais, na luz (Tabela 23), tanto na presença como na ausência de glutamina, foram observados em calos de folha (12,64  $\mu\text{g/g MS}$  e 16,36  $\mu\text{g/g MS}$ ). O tratamento que apresentou a menor concentração desses compostos foi calos de hipocótilo, cultivados sem glutamina (1,72  $\pm$  0,36  $\mu\text{g/g MS}^{-1}$ ).

No escuro, com glucose (Tabela 23) e sem glutamina os calos de folha e raiz apresentaram as maiores concentrações de fenólicos totais (18,25  $\mu\text{g/g MS}$  e 18,82  $\mu\text{g/g MS}$ , respectivamente). Também, para os tratamentos cultivados com glutamina, calos oriundos de raiz e folha apresentaram 15,37  $\pm$  0,36 e 16,29  $\pm$  0,51  $\mu\text{g/g MS}$ , respectivamente.

Quanto aos flavonoides, em glucose, na luz (Tabela 23), os calos originários de folha e de cotilédone, cultivados na presença de glutamina produziram as maiores concentrações (0,83  $\mu\text{g/g MS}$  e 0,89  $\mu\text{g/g MS}$ , respectivamente) e na ausência de glutamina, a maior concentração de flavonoides foi detectada em calos de folha (0,61  $\mu\text{g/g MS}$ ).

Com glucose, no escuro (Tabela 23) a maior produção de flavonoides ocorreu em calos de cotilédone (0,63  $\mu\text{g/g MS}$ ), na ausência de glutamina e em calos de folha, na presença de glutamina (0,68  $\mu\text{g/g MS}$ ). Os tratamentos que apresentaram os menores conteúdos de flavonoides foram os calos de nó cotiledonar, cultivados com ou sem glutamina (0,10  $\pm$  0,01; 0,07  $\pm$  0,01  $\mu\text{g/g MS}$ , respectivamente).

Os níveis de carotenoides (Tabela 23), com glucose, na luz e sem glutamina, foram maiores (3,57  $\mu\text{g/g MS}$ ) em calos de cotilédone e na presença de glutamina, em calos de folha (5,62  $\mu\text{g/g MS}$ ). Calos de nó cotiledonar com glutamina apresentaram concentrações de carotenoides similares a calos de nó foliar, sem glutamina e a calos de raiz e epicótilo com glutamina. Também, níveis semelhantes de carotenoides foram observados entre os calos de nó cotiledonar, sem glutamina e calos de hipocótilo, com ou sem glutamina, e de epicótilo, sem glutamina.

Os resultados da tabela 24 mostram que, com glucose, os maiores teores de clorofilas *a* (1,36  $\mu\text{g/g MS}$ ) e *b* (0,47  $\mu\text{g/g MS}$ ) foram observados em calos obtidos a partir de segmentos de folha cultivados com glutamina. Com glucose, as menores concentrações de clorofila *a* e *b* foram observadas, respectivamente, em calos de raiz e de nó cotiledonar, na ausência de glutamina.

Nos tratamentos com nó cotiledonar, nó foliar e epicótilo a glutamina reduziu as concentrações de clorofila *a*, mas, nos tratamentos com folha, cotilédone e raiz a glutamina promoveu a síntese. Quanto à clorofila *b*, entretanto, observa-se que a presença de glutamina estimulou a produção de clorofila na maioria dos tratamentos, sendo que

apenas em calos originados de nó foliar e epicótilo a síntese de clorofila foi reduzida.

**Tabela 24:** Efeito da glicose, tipo de explante e glutamina sobre os conteúdos de clorofilas *a* e *b* de calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de diferentes tipos de explantes cultivados na luz, durante 8 semanas, em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de glicose, 0 ou 2,73 mM de glutamina, 2,5  $\mu$ M de BAP e 5  $\mu$ M de ANA.

Tipo de explante	Glutamina (mM)	Clorofila <i>a</i> ( $\mu$ g/g MS) <sup>a</sup>	Clorofila <i>b</i> ( $\mu$ g/g MS) <sup>a</sup>
Nó cotiledonar	0	0,25 $\pm$ 0,01 f	0,009 $\pm$ 0,00 i
	2,73	0,23 $\pm$ 0,00 g	0,09 $\pm$ 0,00 f
Folha	0	0,72 $\pm$ 0,01 c	0,06 $\pm$ 0,00 h
	2,73	1,36 $\pm$ 0,00 a	0,47 $\pm$ 0,00 a
Nó foliar	0	0,28 $\pm$ 0,00 e	0,10 $\pm$ 0,00 e
	2,73	0,21 $\pm$ 0,00 h	0,08 $\pm$ 0,00 g
Cotilédone	0	0,42 $\pm$ 0,00 d	0,09 $\pm$ 0,00 f
	2,73	0,79 $\pm$ 0,01 b	0,26 $\pm$ 0,00 b
Hipocótilo	0	0,16 $\pm$ 0,00 i	0,006 $\pm$ 0,00 i
	2,73	0,16 $\pm$ 0,00 i	0,06 $\pm$ 0,00 h
Raiz	0	0,10 $\pm$ 0,00 j	0,08 $\pm$ 0,00 g
	2,73	0,23 $\pm$ 0,00 g	0,14 $\pm$ 0,00 c
Epicótilo	0	0,26 $\pm$ 0,00 f	0,11 $\pm$ 0,00 d
	2,73	0,22 $\pm$ 0,00 h	0,10 $\pm$ 0,00 e

<sup>a</sup>Médias de no mínimo cinco repetições seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). MS= massa seca.

Verifica-se na tabela 24 que, seguindo os tratamentos que apresentaram as maiores concentrações de clorofilas *a* e *b* encontram-se os tratamentos de calos de folha e cotilédone, produzidos sem glutamina (Clorofila *a*= 0,72  $\pm$  0,01; 0,42  $\pm$  0,00; Clorofila *b*= 0,06  $\pm$  0,00; 0,10  $\pm$  0,00  $\mu$ g/g MS). Para clorofila *a* os tratamentos que mostraram valores similares foram nó cotiledonar e raiz, com glutamina e nó cotiledonar e epicótilo, sem glutamina, sendo que houve diferença estatística entre os demais tratamentos. Para a clorofila *b* alguns dos tratamentos que mostraram valores semelhantes foram nó cotiledonar, com glutamina e cotilédone, sem glutamina.

Com relação aos tratamentos que apresentaram baixas concentrações de clorofilas *a* e *b*, calos de raiz, cultivados sem

glutamina apresentaram (Clorofila  $a = 0,10 \pm 0,00 \mu\text{g/g MS}$ ), já para a clorofila  $b$ , calos de nó cotiledonar e hipocótilo, cultivados sem glutamina apresentaram (Clorofila  $b = 0,01 \pm 0,00$ ;  $0,01 \pm 0,00 \mu\text{g/g MS}$ ).

#### 7.3.3.4. Análise comparativa dos efeitos das fontes de carbono sobre a produção de metabólitos secundários em calos de *Cedrela fissilis*

A tabela 25 abaixo apresenta a compilação dos tratamentos que apresentaram os melhores resultados para os metabólitos secundários, com a manipulação das diferentes fontes de carbono. Verifica-se, que para a maior produção de fenólicos totais, segmentos de cotilédone foram os melhores explantes para iniciar os calos, quando a fonte de carbono foi a sacarose. Porém, com frutose, nó cotiledonar foi o melhor explante e com a glicose, segmentos de folha e de raiz foram os explantes ideais.

Para a produção de flavonoides, segmentos de cotilédone foram os melhores explantes, quando a sacarose ou glicose foram utilizadas como fontes de carbono, enquanto que segmentos de folha foram mais eficientes quando a frutose ou glicose foram utilizadas. A maior produção de carotenoides, entretanto ocorreu em calos originados a partir da cultura de segmentos de folhas, em todas as fontes de carbono estudadas.

A tabela 26 mostra que, os calos que acumularam maior quantidade de clorofila  $a$  foram os iniciados a partir de cotilédone, quando foi utilizada a sacarose ou a frutose. Com glicose, apenas calos iniciados a partir de folhas foram eficientes na produção de clorofila  $a$ . Assim, com frutose os melhores explantes foram segmentos de folha e cotilédone. Com relação à produção de clorofila  $b$  observa-se que segmentos de cotilédone foram os melhores explantes, quando a sacarose foi utilizada como fonte de carbono e segmentos de folha foram os explantes ideais, quando as fontes de carbono foram a frutose ou glicose.

Quanto à eficiência da glutamina na produção dos metabólitos secundários pelos calos, observa-se na tabela 24 que, quando a fonte de carbono sacarose, a glutamina apresentou um efeito promotor, na produção de fenólicos totais e flavonoides totais, mas não na produção de carotenoides. Já com a frutose, as maiores concentrações desses compostos ocorreu na ausência de glutamina e com a glicose, a ausência de glutamina promoveu a produção de fenólicos totais e a presença



promoveu a biossíntese de flavonoides totais. Em relação aos carotenoides verifica-se que, na presença de glucose e frutose, a glutamina foi necessária para promover a produção, mas na presença de sacarose a maior produção ocorreu na ausência da glutamina.

Na tabela 26 nota-se que, quando a sacarose e glucose foram utilizadas como fontes de carbono, a glutamina promoveu a produção de clorofilas *a* e *b*, mas quando a frutose foi utilizada, as maiores concentrações de clorofilas ocorreram na ausência de glutamina.

Quanto à necessidade de luz, verifica-se na tabela 25 que, com sacarose, os maiores níveis de fenólicos totais e flavonoides ocorreram em calos crescidos na luz, enquanto que com frutose ou glucose ocorreram no escuro. Para a os flavonoides totais, em todas as fontes de carbono, a maior produção ocorreu na luz.

**Tabela 25:** Compilação dos melhores tratamentos (tipo de explante, presença/ausência de glutamina, presença/ausência de luz) que produziram as maiores concentrações de fenólicos totais, flavonoides totais e carotenoides em calos de *Cedrela fissilis* cultivados durante 8 semanas, em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de sacarose, glucose ou frutose, 0 ou 2,73 mM de glutamina, 2,5  $\mu$ M de BAP e 5  $\mu$ M de ANA.

Fontes de carbono	Fenólicos totais	Flavonoides	Carotenoides
Sacarose	Cotilédone	Cotilédone	Folha
	Com glutamina Luz	Com glutamina Luz	Sem glutamina Luz
Frutose	Nó cotiledonar	Folha	Folha
	Sem glutamina, Escuro	Sem glutamina Luz	Com glutamina Luz
Glucose	Folha, raiz	Folha, cotilédone	Folha
	Sem glutamina Escuro	Com glutamina Luz	Com glutamina Luz

**Tabela 26:** Compilação dos melhores tratamentos (tipo de explante, presença/ausência de glutamina, presença/ausência de luz) que produziram as maiores concentrações de clorofilas a e b em calos de *Cedrela fissilis* cultivados com cultivados durante 8 semanas, em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de sacarose, glucose ou frutose, 0 ou 2,73 mM de glutamina, 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA.

Fontes de carbono	Clorofila a	Clorofila b
Sacarose	Cotilédone	Cotilédone
	Com glutamina	Com glutamina
	Luz	Luz
Frutose	Folha, cotilédone	Folha
	Sem glutamina,	Sem glutamina
	Luz	Luz
Glucose	Folha	Folha
	Com glutamina	Com glutamina
	Luz	Luz

Em termos quantitativos (tabela 27), apesar de não terem sido realizadas as análises estatísticas comparando as fontes de carbono, é possível observar que com a sacarose, a maior concentração de fenólicos totais (51,35  $\mu\text{g/g}$  MS) foi 1,5 vezes maior do que observada com frutose e 2,72 vezes maior do que a obtida com glucose. As concentrações de flavonoides totais pareceram ser similares para sacarose (1,35  $\mu\text{g/g}$  MS) e frutose (1,71  $\mu\text{g/g}$  MS), mas essas concentrações foram, respectivamente, 1,5 e 1,9 vezes maior do que a observada para glucose (0,89  $\mu\text{g/g}$  MS). Quanto aos carotenoides, verifica-se que as concentrações obtidas para frutose (5,39  $\mu\text{g/g}$  MS) e glucose (5,72  $\mu\text{g/g}$  MS) pareceram ser similares e foram pelo menos 2,4 vezes maior do que com a observada com sacarose (2,22  $\mu\text{g/g}$  MS).

Quando se compara os valores da tabela 27 para fenólicos totais, flavonoides totais e carotenoides com os valores máximos obtidos nos itens 6.3.1 (tabela 13) e 6.3.2 (tabela 16) observa-se que, com a manipulação dos tipos de explante, glutamina e presença e ausência de luz a máxima produção de fenólicos totais de (51,35  $\mu\text{g/g}$  MS), por calos de cotilédone cultivados em sacarose, com glutamina na luz foi

1,95 vezes maior do que a máxima detectada em calos de nós cotiledonares cultivados nas mesmas concentrações de sacarose e glutamina, na luz (26,27  $\mu\text{g/g MS}$ ; tabela 22); a produção de flavonoides totais foi pelo menos 1,92 vezes maior em relação ao maior valor observado na tabela 16 (0,70  $\mu\text{g/g MS}$ , tabela 25) e a produção de carotenoides foi pelo menos 7,7 vezes maior do que a maior expressa, também na tabela 16 (1,82  $\mu\text{g/g MS}$ ), mesmo utilizando-se a combinação de concentrações de 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA.

**Tabela 27:** Compilação dos maiores valores de concentração de fenólicos totais, flavonoides totais e carotenoides em calos de *Cedrela fissilis* cultivados durante 8 semanas, em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de sacarose, glucose ou frutose, 0 ou 2,73 mM de glutamina, 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA.

Fontes de carbon	Fenólicos totais ( $\mu\text{g/g MS}$ ) <sup>a</sup>	Flavonoides totais ( $\mu\text{g/g MS}$ ) <sup>a</sup>	Carotenoides ( $\mu\text{g/g MS}$ ) <sup>a</sup>
Sacarose	51,35	1,35	2,22
Frutose	33,31	1,71	5,39
Glucose	18,82	0,89	5,62

<sup>a</sup>Médias de no mínimo cinco repetições.

Com relação às máximas concentrações obtidas para as clorofilas *a* e *b* verifica-se, na tabela 28 que os valores pareceram ser similares para as três fontes de carbono estudadas. Quando se compara esses valores com os máximos obtidos na tabela 17 do item 6.3.2 observa-se que, os valores de clorofila *a* obtidos através da manipulação dos tipos de explantes, fontes de carbono, presença e ausência de glutamina e de luz foram pelo menos 2,65 vezes maior e as de clorofila *b* foram 3,14 vezes maior do que as concentrações mostradas na tabela 17.

**Tabela 28:** Compilação dos maiores valores de concentração de clorofilas *a* e *b* em calos de *Cedrela fissilis* cultivados durante 8 semanas, em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de sacarose, glucose ou frutose, 0 ou 2,73 mM de glutamina, 2,5  $\mu$ M de BAP e 5  $\mu$ M de ANA.

Fontes de carbono	Clorofila <i>a</i> ( $\mu$ g/g MS) <sup>a</sup>	Clorofila <i>b</i> ( $\mu$ g/g MS) <sup>a</sup>
Sacarose	1,06	0,44
Frutose	1,05	0,45
Glucose	1,36	0,47

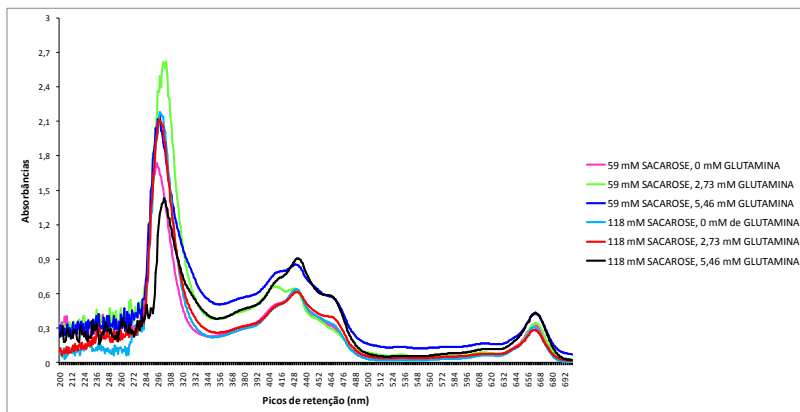
<sup>a</sup>Médias de no mínimo cinco repetições.

## 7.4 PERFIL METABÓLICO POR ESPECTROFOTOMETRIA DE VARREDURA UV-VIS DE CALOS DE *C. FISSILIS*

### 7.4.1. Efeito de diferentes combinações de concentrações de sacarose e de glutamina sobre os perfis metabólicos de extratos de calos de *Cedrela fissilis*

A espectrofotometria de varredura em UV-Vis, cujos resultados são mostrados na figura 7 foi realizada em extratos metanólicos de calos de *C. fissilis* iniciados a partir de segmentos de nós cotiledonares cultivados em meio de cultura MS, semi-sólido, suplementado com de sacarose (59 mM ou 118 mM), glutamina (0; 2,73 mM ou 5,46 mM), 2,5  $\mu$ M de BAP e 5  $\mu$ M de ANA.

Os resultados da figura 7 mostraram que calos de nós cotiledonares cultivados com 59 mM e 118 mM de sacarose e 5,46 mM de glutamina (linha azul marinho e preto) apresentaram as maiores absorvâncias nos intervalos entre 410 – 466 nm e 648 – 676 nm. Entretanto, maior absorvância no intervalo entre 270 – 326 nm (linha verde), região de absorção do UV, ocorreu no extrato dos calos crescidos com 59 mM de sacarose e 2,73 mM de glutamina. Nesse intervalo os extratos dos calos cultivados com 118 mM de sacarose e 5,46 mM de glutamina (linha preta) apresentaram a menor absorv

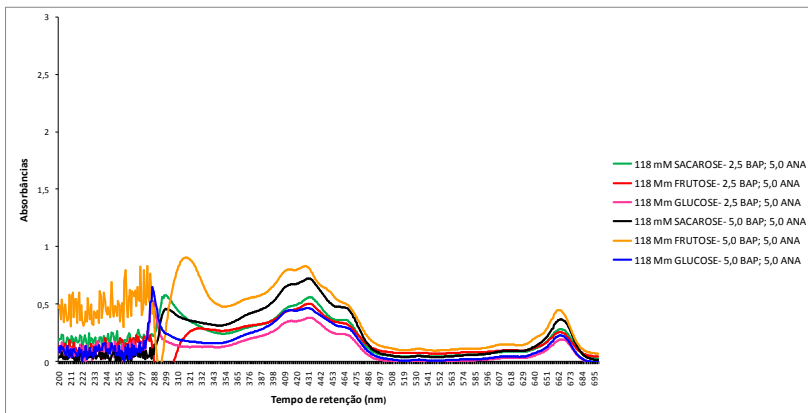


**Figura 7:** Espectrofotometria de varredura em UV-Vis de extratos metanólicos de calos de *C. fissilis* iniciados a partir de segmentos de nó cotiledonar cultivados em meio de cultura MS, semi-sólido, suplementado com 59 e/ou 118 mM de sacarose, 0; 2,73 e/ou 5,46 mM de glutamina 2,5  $\mu$ M de BAP e 5  $\mu$ M de ANA.

#### 7.4.2. Efeito de diferentes fontes de carbono e de combinações de concentrações de BAP e ANA sobre os perfis metabólicos de extratos de calos de *Cedrela fissilis*

A espectrofotometria de varredura em UV-Vis, cujos resultados são apresentados na figura 8, foi realizada em extratos metanólicos de calos de *C. fissilis* iniciados a partir de segmentos de nós cotiledonares cultivados em meio de cultura MS, semi-sólido, suplementado com 118 mM de sacarose, com diferentes combinações de concentrações de BAP e ANA (2,5  $\mu$ M e 5,0  $\mu$ M).

Os resultados indicam que os extratos de calos cultivados com 118 mM de frutose, 5,0  $\mu$ M de BAP e 5,0  $\mu$ M de ANA (figura 8) apresentaram as maiores absorvâncias nos intervalos entre 410 – 494 nm, 648 – 676 nm (linha laranja), seguido dos extratos de calos cultivados com 118 mM de sacarose, 5,0  $\mu$ M de BAP e 5,0  $\mu$ M de ANA (linha preta). Na região de absorção do UV, que compreende os comprimentos de onda de 280 até 400 nm, os extratos de calos cultivados com 118 mM de frutose, 5,0  $\mu$ M de BAP e 5,0  $\mu$ M de ANA também apresentaram as maiores absorvâncias enquanto que os extratos de calos cultivados com 118 mM de sacarose, 5,0  $\mu$ M de BAP e 5,0  $\mu$ M de ANA apresentaram as menores absorvâncias.



**Figura 8:** Espectrofotometria de varredura em UV-Vis de extratos metanólicos de calos de *C. fissilis* iniciados a partir de segmentos de nó cotiledonar cultivados em meio de cultura MS, semi-sólido, suplementado com 118 mM de sacarose, frutose e/ou glucose, 2,5 e/ou 5,0  $\mu\text{M}$  de BAP e 2,5 e/ou 5,0  $\mu\text{M}$  de ANA.

### 7.4.3. Efeito de fontes de carbono, tipos de explantes, glutamina e presença e ausência de luz sobre os perfis metabólicos de extratos de calos de *Cedrela fissilis*

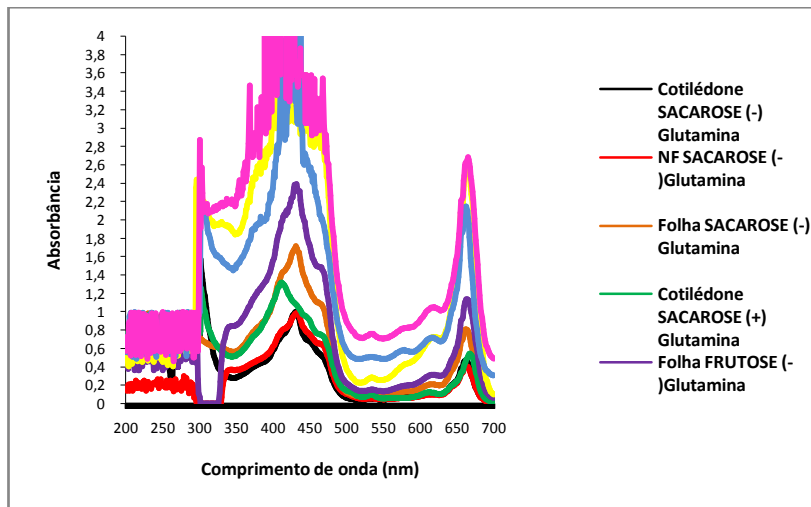
A espectrofotometria de varredura em UV-Vis, cujo resultado é mostrado na figura 9 foi realizada com extratos metanólicos de calos de *C. fissilis* iniciados a partir de segmentos de cotilédone, nó foliar e folha cultivados em meio de cultura MS, semi-sólido, suplementado com 118 mM de sacarose, 0 ou 2,73 mM de glutamina 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA; de calos iniciados a partir de segmentos de folha cultivados em meio de cultura MS, semi-sólido, suplementado com 118 mM de frutose, 0 ou 2,73 mM de glutamina 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA, e de calos iniciados a partir de cotilédone e folha cultivados em meio de cultura MS, semi-sólido, suplementado com 118 mM de frutose, 2,73 mM de glutamina 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA. Assim, foram escolhidos os melhores tratamentos, que apresentaram os maiores conteúdos de compostos primários e secundários, em que os calos foram cultivados na luz, para a determinação dos perfis metabólicos dos calos.

Através dos espectros apresentados na Figura 9 é possível observar que, de uma maneira geral, o espectro do extrato de calos de

folha, cultivados com glucose e com glutamina (linha rosa) apresentou valores maiores de absorvância, enquanto que o espectro do extrato de calos de cotilédone, cultivados com sacarose, sem glutamina (linha preta) apresentou os valores mais baixos de absorvância.

Os diferentes tratamentos apresentaram perfis de absorvância coincidentes quanto aos comprimentos de onda. Um pico de alta absorvância se formou na região de 659 – 670 nm, com a formação de um pequeno ombro mais próximo de 659 nm. Três regiões de maior absorvância também podem ser observadas nos intervalos entre 605 – 614 nm, 530 – 540 nm e 400 – 480 nm.

Na região de absorção do UV, que compreende os comprimentos de onda de 280 até 400 nm, onde começa a absorção da luz visível, ocorreu a fusão de vários picos de absorvância, levando à formação de “ombros”, que ficaram mais evidentes nos espectros dos calos de cotilédone, cultivados com sacarose, com e sem glutamina (linhas preta e verde) e de calos de cotilédone, cultivados com glucose e glutamina (linha azul). Nesta região de absorção, os valores de absorvância diferiram muito entre os tratamentos, evidenciando diferenças na constituição metabólica dos calos no que diz respeito aos compostos que absorvem nos comprimentos da luz UV.



**Figura 9:** Espectrofotometria de varredura em UV-Vis de extratos metanólicos de calos de *C. fissilis* iniciados a partir de segmentos de cotilédone, nó foliar e folha cultivados em meio de cultura MS, semi-sólido, suplementado com 118 mM de sacarose, 0 ou 2,73 mM de glutamina 2,5  $\mu$ M de BAP e 5  $\mu$ M de ANA, de calos iniciados a partir de segmentos de folha cultivados em meio de cultura MS, semi-sólido, suplementado com 118 mM de frutose, 0 ou 2,73 mM de glutamina 2,5  $\mu$ M de BAP e 5  $\mu$ M de ANA, e de calos iniciados a partir de cotilédone e folha cultivados em meio de cultura MS, semi-sólido, suplementado com 118 mM de frutose, 2,73 mM de glutamina 2,5  $\mu$ M de BAP e 5  $\mu$ M de ANA.

## 7.5 ANÁLISES QUALITATIVAS POR CLAE DE CAROTENOIDES DE CALOS DE *Cedrela fissilis*

Os experimentos, cujos resultados são apresentados a seguir foram realizados com o objetivo de analisar, por CLAE, os carotenoides produzidos por calos de *C. fissilis* em condições de cultivo em que foram manipuladas, fontes de carbono, tipos de explantes, presença e ausência de luz presença e ausência de glutamina.

Nesses experimentos foram feitas análises qualitativas e quantitativas dos carotenoides produzidos por calos de *C. fissilis*, cultivados após 8 semanas, a partir de diferentes tipos de explantes, na presença de luz, em meio de cultura MS, suplementado com 118 mM de sacarose, glucose ou frutose, 0 ou 2,73 mM de glutamina, 2,5  $\mu$ M de BAP, 5  $\mu$ M de ANA e 0,2% de Phytigel (Sigma).



### **7.5.1. Detecção de carotenoides por CLAE de calos de *Cedrela fissilis* cultivados com sacarose**

A análise cromatográfica dos extratos de calos, visando a identificação e quantificação dos carotenoides revelou ser a xantofila luteína o carotenóide predominante nos calos de *Cedrela fissilis* cultivados em sacarose, tendo sido possível também a detecção de outra xantofila, a zeaxantina livre. Além disso, observa-se a presença do isômero *cis* do  $\beta$ -caroteno (Tabela 29).

As concentrações de carotenoides obtidas através de calos de *Cedrela fissilis*, cultivados na presença e ausência de glutamina, com sacarose, variaram significativamente entre os tratamentos, como pode ser observado na tabela 29. Observa-se que, para cada tipo de carotenóide, calos de folha, cultivados sem a presença de glutamina, apresentou maiores quantidades de luteína, zeaxantina livre e o isômero *cis* do  $\beta$ -caroteno. Além disso, observa-se que entre os tipos de explantes, calos cultivados com glutamina apresentaram menores conteúdos de cada carotenóide, do que os cultivados sem a glutamina, com exceção do cotilédone, cultivado com glutamina, que apresentou teores significativos para as xantofilas luteína e zeaxantina livre ( $2,70 \pm 0,51$ ;  $0,44 \pm 0,05 \mu\text{g/g MS}$  respectivamente). Não foi observada presença de zeaxantina esterificada,  $\beta$ -criptoxantina e o isômero *trans* do  $\beta$ -caroteno entre os tratamentos. O tratamento em que segmentos de folha foram cultivados com glutamina não foi apresentado na tabela 38, pois não houve formação de calos.

**Tabela 29:** Efeito de sacarose, glutamina e tipos de explante sobre a concentração dos carotenoides ( $\mu\text{g/g}$  massa seca), determinada por CLAE para o extrato organossolvente (hexano:acetona:BHT), de calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de diferentes tipos de explantes cultivados na presença de luz, durante 8 semanas, em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de sacarose, 0 ou 2,73 mM de glutamina, 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA.

Tipo de explante	Glutamina (mM)	Carotenoides ( $\mu\text{g/g MS}$ ) <sup>a</sup>					
		Luteína Rt (min) = 3,8	Zeaxantina livre Rt (min) = 4,1	Zeaxantina esterificada Rt (min) = 4,4	$\beta$ -criptoxantina Rt (min) = 7,2	<i>trans</i> - $\beta$ -caroteno Rt (min) = 10,8	<i>cis</i> - $\beta$ -caroteno Rt (min) = 11,7
Raiz	0	1,11 $\pm$ 0,23 ef	0,14 $\pm$ 0,02 f	Ausente	Ausente	Ausente	0,40 $\pm$ 0,03 bc
	2,73	0,73 $\pm$ 0,02 fg	0,11 $\pm$ 0,01 f	Ausente	Ausente	Ausente	0,12 $\pm$ 0,00 de
Nó cotiledonar	0	1,35 $\pm$ 0,46 ef	0,18 $\pm$ 0,06 ef	Ausente	Ausente	Ausente	0,47 $\pm$ 0,04 bc
	2,73	0,73 $\pm$ 0,21 fg	0,11 $\pm$ 0,02 f	Ausente	Ausente	Ausente	0,12 $\pm$ 0,04 de
Folha	0	3,03 $\pm$ 0,62 a	0,45 $\pm$ 0,08 a	Ausente	Ausente	Ausente	0,97 $\pm$ 0,06 a
	2,73	-	-	-	-	-	-
Cotilédone	0	1,96 $\pm$ 0,35 bcde	0,31 $\pm$ 0,02 bc	Ausente	Ausente	Ausente	0,43 $\pm$ 0,03 bc
	2,73	2,70 $\pm$ 0,51 ab	0,44 $\pm$ 0,05 b	Ausente	Ausente	Ausente	0,28 $\pm$ 0,27 cd
Hipocótilo	0	2,53 $\pm$ 0,18 abc	0,36 $\pm$ 0,05 ab	Ausente	Ausente	Ausente	0,38 $\pm$ 0,01 c
	2,73	1,53 $\pm$ 0,25 def	0,19 $\pm$ 0,02 def	Ausente	Ausente	Ausente	0,41 $\pm$ 0,06 bc
Nó foliar	0	2,39 $\pm$ 0,29 abcd	0,29 $\pm$ 0,05 bcd	Ausente	Ausente	Ausente	0,63 $\pm$ 0,06 b
	2,73	1,69 $\pm$ 0,27 cdef	0,18 $\pm$ 0,03 ef	Ausente	Ausente	Ausente	0,28 $\pm$ 0,01 cd
Epicótilo	0	1,59 $\pm$ 0,22 cdef	0,25 $\pm$ 0,01 cde	Ausente	Ausente	Ausente	0,26 $\pm$ 0,01 cd
	2,73	1,78 $\pm$ 0,35 bcde	0,26 $\pm$ 0,04 bcde	Ausente	Ausente	Ausente	0,89 $\pm$ 0,03 a

<sup>a</sup>Médias de três injeções (10  $\mu\text{L}$ )  $\pm$  desvio padrão seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). MS= massa seca. - Biomassa insuficiente (não ocorreu formação de calos).

### 7.5.2. Detecção de carotenoides por CLAE de calos de *Cedrela fissilis* cultivados com frutose

Observa-se que, na tabela 30 a luteína foi o carotenóide majoritário em calos de *Cedrela fissilis* produzidos em meio de cultura contendo frutose, quando comparado com os demais carotenoides. Este fato também foi observado na tabela 29, mas nota-se que, os tratamentos cultivados com glutamina apresentaram maiores teores deste composto, diferentemente do que observado na tabela 29, em que os tratamentos cultivados com a fonte de carbono sacarose apresentaram maiores concentrações em calos cultivados sem a glutamina. Para as xantofilas, luteína e zeaxantina livre, além do isômero *cis* do  $\beta$ -caroteno, calos de cotilédone apresentaram maiores conteúdos destes carotenoides ( $9,97 \pm 0,38$ ;  $1,48 \pm 0,07$ ;  $6,44 \pm 0,18$   $\mu\text{g/g MS}$  respectivamente).

Analisando-se a identificação e a quantificação dos carotenoides (tabela 30), pode-se observar que ocorreu a detecção de zeaxantina esterificada somente nos tratamentos de calos de folha e cotilédone, cultivados sem glutamina ( $0,70 \pm 0,18$ ;  $0,56 \pm 0,01$   $\mu\text{g/g MS}$  respectivamente), sendo que, não ocorreu a presença de zeaxantina livre nestes tratamentos. Além disso, a análise cromatográfica revelou a presença de  $\beta$ -criptoxantina e o isômero *trans* do  $\beta$ -caroteno em calos, cultivados na presença de glutamina, com frutose. Calos de cotilédone apresentaram significativamente maiores teores de  $\beta$ -criptoxantina ( $0,22 \pm 0,04$   $\mu\text{g/g MS}$ ) e de nó foliar apresentaram maiores teores do isômero *trans* do  $\beta$ -caroteno ( $1,34 \pm 0,00$   $\mu\text{g/g MS}$ ). Já o isômero *cis* do  $\beta$ -caroteno, esteve presente em todos os tratamentos analisados, sendo que, foram observados os maiores teores deste carotenóide, em calos de cotilédone e folha, cultivados com glutamina ( $6,44 \pm 0,18$ ;  $4,26 \pm 0,12$   $\mu\text{g/g MS}$  respectivamente).

**Tabela 30:** Efeito de frutose, glutamina e tipos de explante sobre a concentração dos carotenoides ( $\mu\text{g/g}$  massa seca), determinada por CLAE para o extrato organossolvente (hexano: acetona: BHT), de calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de diferentes tipos de explantes cultivados na presença de luz, durante 8 semanas, em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de frutose, 0 ou 2,73 mM de glutamina, 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA.

Tipo de explante	Glutamina (mM)	Carotenoides ( $\mu\text{g/g}$ MS) <sup>a</sup>					
		Luteína Rt (min) = 3,8	Zeaxantina livre Rt (min)= 4,1	Zeaxantina esterificada Rt (min)= 4,4	$\beta$ -criptoxantina Rt (min)= 7,2	<i>trans</i> - $\beta$ -caroteno Rt (min)= 10,8	<i>cis</i> - $\beta$ -caroteno Rt (min)= 11,7
Raiz	0	1,79 $\pm$ 0,60 ef	0,27 $\pm$ 0,01 ef	Ausente	Ausente	Ausente	0,31 $\pm$ 0,05 fgh
	2,73	2,34 $\pm$ 0,27 de	0,37 $\pm$ 0,04 de	Ausente	0,04 $\pm$ 0,01 b	0,88 $\pm$ 0,04 b	0,88 $\pm$ 0,04 cdefg
Nó cotiledonar	0	0,61 $\pm$ 0,10 g	0,06 $\pm$ 0,01 gh	Ausente	Ausente	Ausente	0,17 $\pm$ 0,03 h
	2,73	3,03 $\pm$ 0,09 cd	0,44 $\pm$ 0,07 d	Ausente	0,02 $\pm$ 0,01 bc	Ausente	1,03 $\pm$ 0,13 cde
Folha	0	1,85 $\pm$ 0,37 ef	Ausente	0,70 $\pm$ 0,18 a	Ausente	Ausente	0,75 $\pm$ 0,04 cdefgh
	2,73	4,17 $\pm$ 0,26 b	0,84 $\pm$ 0,11 b	Ausente	Ausente	0,08 $\pm$ 0,05 d	4,26 $\pm$ 0,12 b
Cotilédone	0	1,79 $\pm$ 0,09 ef	Ausente	0,56 $\pm$ 0,01 a	Ausente	Ausente	1,33 $\pm$ 0,25 c
	2,73	9,97 $\pm$ 0,38 a	1,48 $\pm$ 0,07 a	Ausente	0,22 $\pm$ 0,04 a	0,23 $\pm$ 0,01 c	6,44 $\pm$ 0,18 a
Hipocótilo	0	1,12 $\pm$ 0,08 fg	0,15 $\pm$ 0,03 fg	Ausente	Ausente	Ausente	0,26 $\pm$ 0,02 gh
	2,73	2,04 $\pm$ 0,25 e	0,40 $\pm$ 0,04 de	Ausente	Ausente	Ausente	0,93 $\pm$ 0,11 cdef
Nó foliar	0	1,05 $\pm$ 0,15 fg	0,12 $\pm$ 0,03 gh	Ausente	Ausente	Ausente	0,35 $\pm$ 0,05 fgh
	2,73	2,20 $\pm$ 0,30 de	0,31 $\pm$ 0,03 de	Ausente	0,03 $\pm$ 0,00 b	1,34 $\pm$ 0,00 a	1,24 $\pm$ 0,16 cd
Epicótilo	0	3,28 $\pm$ 0,36 c	0,58 $\pm$ 0,03 c	Ausente	Ausente	Ausente	0,61 $\pm$ 0,08 defgh
	2,73	0,70 $\pm$ 0,12 g	0,11 $\pm$ 0,02 gh	Ausente	Ausente	Ausente	0,53 $\pm$ 0,71 efgh

<sup>a</sup>Médias de três injeções (10  $\mu\text{L}$ )  $\pm$  desvio padrão seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). MS= massa seca.

### 7.5.3. Detecção de carotenoides por CLAE de calos de *Cedrela fissilis* cultivados com glucose

Calos cultivados com glucose (tabela 31) apresentaram concentrações significativamente equilibradas de carotenoides entre os tratamentos cultivados tanto na presença, quanto na ausência de glutamina. Observa-se que, a luteína também foi o composto majoritário quando comparado com os outros carotenoides (tabelas 29 e 30). O tratamento que apresentou maior conteúdo de luteína foi o realizado com calos de epicótilo, cultivados sem glutamina ( $6,08 \pm 0,92 \mu\text{g/g MS}$ ), seguido de nó foliar, cultivado com glutamina ( $4,95 \pm 0,47 \mu\text{g/g MS}$ ). Já calos de raiz, cultivados sem glutamina apresentaram as menores concentrações deste composto ( $0,29 \pm 0,26 \mu\text{g/g MS}$ ). Ocorreu presença das xantofilas zeaxantina livre e zeaxantina esterificada entre os tratamentos analisados. As maiores concentrações de zeaxantina livre foram observadas em calos de raiz, cultivados com glutamina e epicótilo, cultivados sem glutamina ( $1,00 \pm 0,12$ ;  $0,87 \pm 0,11 \mu\text{g/g MS}$  respectivamente).

Os tratamentos que não apresentaram teores de zeaxantina livre foram calos de folha e cotilédone, cultivados com e sem glutamina e calos de nó foliar, cultivados sem glutamina. Houve ocorrência de zeaxantina esterificada nos tratamentos de folha e cotilédone, cultivados com e sem glutamina e em calos de nó foliar e epicótilo, cultivados sem glutamina. Entre estes tratamentos os que apresentaram maiores concentrações de zeaxantina esterificada foram calos de folha, cultivados com glutamina e calos de folha e cotilédone, cultivados sem glutamina ( $0,62 \pm 0,05$ ;  $0,58 \pm 0,15$ ;  $0,56 \pm 0,07 \mu\text{g/g MS}$  respectivamente).

Analisando-se a tabela 31, houve ocorrência de  $\beta$ -criptoxantina em apenas um dos tratamentos analisados, calos de nó foliar cultivados com glutamina ( $0,06 \pm 0,01 \mu\text{g/g MS}$ ). Já o isômero *trans* do  $\beta$  caroteno, ocorreu nos tratamentos de nó cotiledonar, folha e nó foliar, cultivados com glutamina ( $0,50 \pm 0,02$ ;  $0,13 \pm 0,03$ ;  $0,09 \pm 0,02 \mu\text{g/g MS}$  respectivamente), sendo que a presença do isômero *cis* do  $\beta$  caroteno ocorreu em todos os tratamentos analisados. Calos de folha, cultivados com glutamina apresentaram maiores concentrações deste carotenóide ( $2,66 \pm 0,06 \mu\text{g/g MS}$ ).

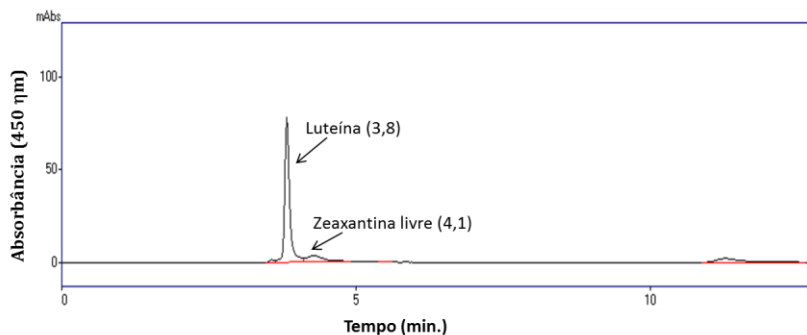
Analisando-se as tabelas 29, 30 e 31, verificam-se, para cada tipo de fonte de carbono em que os calos foram cultivados, os perfis

metabólicos foram diferentes. Observa-se que, calos cultivados com frutose e com glucose, apresentaram maiores quantidades de diferentes carotenoides, do que os cultivados com sacarose. Também, verifica-se que, de uma maneira geral, das três fontes de carbono analisadas, a sacarose foi a que apresentou perfil cromatográfico, onde os calos cultivados sem glutamina apresentaram maiores concentrações de cada carotenóide. Já para frutose e glucose, observa-se que, os tratamentos cultivados com glutamina, apresentaram maiores valores em relação aos carotenoides, além de que o perfil cromatográfico demonstrou ser relativamente interessante, por mostrar a presença de carotenoides que não foram produzidos com a sacarose. Isso mostra que a presença de glutamina pode influenciar os perfis carotenóidicos.

**Tabela 31:** Efeito de glucose, glutamina e tipos de explante sobre a concentração dos carotenoides ( $\mu\text{g/g}$  massa seca), determinada por CLAE para o extrato organossolvente (hexano:acetona:BHT), de calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de diferentes tipos de explantes cultivados na presença de luz, durante 8 semanas, em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de glucose, 0 ou 2,73 mM de glutamina, 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA.

Tipo de explante	Glutamina (mM)	Carotenoides ( $\mu\text{g/g MS}$ ) <sup>a</sup>					
		Luteína Rt (min) = 3,8	Zeaxantina livre Rt (min) = 4,1	Zeaxantina esterificada Rt (min) = 4,4	$\beta$ -criptoxantina Rt (min) = 7,2	<i>trans</i> - $\beta$ -caroteno Rt (min) = 10,8	<i>cis</i> - $\beta$ -caroteno Rt (min) = 11,7
Raiz	0	0,29 $\pm$ 0,26 f	0,04 $\pm$ 0,01 ef	Ausente	Ausente	Ausente	0,14 $\pm$ 0,01 de
	2,73	0,79 $\pm$ 0,06 ef	1,00 $\pm$ 0,12 a	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Nó cotiledonar	0	0,81 $\pm$ 0,51 ef	0,08 $\pm$ 0,05 def	Ausente	Ausente	Ausente	0,27 $\pm$ 0,06 de
	2,73	1,55 $\pm$ 0,09 de	0,19 $\pm$ 0,02 cd	Ausente	Ausente	0,50 $\pm$ 0,02 a	0,50 $\pm$ 0,02 cd
Folha	0	2,02 $\pm$ 0,21 d	Ausente	0,58 $\pm$ 0,15 a	Ausente	Ausente	1,29 $\pm$ 0,36 b
	2,73	3,58 $\pm$ 0,31 c	Ausente	0,62 $\pm$ 0,05 a	Ausente	0,13 $\pm$ 0,03 b	2,66 $\pm$ 0,06 a
Cotilédone	0	1,58 $\pm$ 0,33 de	Ausente	0,56 $\pm$ 0,07 a	Ausente	Ausente	0,49 $\pm$ 0,08 cd
	2,73	1,12 $\pm$ 0,19 def	Ausente	0,17 $\pm$ 0,03 b	Ausente	Ausente	0,49 $\pm$ 0,03 cd
Hipocótilo	0	1,05 $\pm$ 0,12 def	0,15 $\pm$ 0,01 cde	Ausente	Ausente	Ausente	0,09 $\pm$ 0,01 e
	2,73	0,74 $\pm$ 0,18 ef	0,12 $\pm$ 0,02 def	Ausente	Ausente	Ausente	0,14 $\pm$ 0,03 de
Nó foliar	0	0,73 $\pm$ 0,20 ef	Ausente	0,20 $\pm$ 0,05 b	Ausente	Ausente	0,31 $\pm$ 0,03 de
	2,73	4,95 $\pm$ 0,47 b	0,70 $\pm$ 0,05 b	Ausente	0,06 $\pm$ 0,01 a	0,09 $\pm$ 0,02 c	1,53 $\pm$ 0,20 b
Epicótilo	0	6,08 $\pm$ 0,92 a	0,87 $\pm$ 0,11 a	0,10 $\pm$ 0,02 bc	Ausente	Ausente	0,73 $\pm$ 0,13 c
	2,73	1,54 $\pm$ 0,21 de	0,27 $\pm$ 0,03 c	Ausente	Ausente	Ausente	0,26 $\pm$ 0,03 de

<sup>a</sup>Médias de três injeções (10  $\mu\text{L}$ )  $\pm$  desvio padrão seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). MS= massa seca.



**Figura 10:** Exemplo do perfil cromatográfico de carotenoides (450 nm) do extrato organossolvente de calos de *Cedrela fissilis* provenientes de epicótilo cultivados em meio MS suplementado com 118 mM de glicose.

## 7.6 ANÁLISES DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE CALOS DE *Cedrela fissilis*

Os experimentos, cujos resultados são apresentados a seguir foram realizados com o objetivo de estudar a atividade antioxidante de extratos de calos de *C. fissilis* produzidos em condições de cultivo em que foram manipuladas, combinações de concentrações de glutamina e de sacarose, combinações de fontes de carbono e de diferentes combinações de concentrações BAP e ANA e fontes de carbono, tipos de explantes, presença e ausência de luz e de glutamina.

Nos experimentos em que foram estudados os efeitos das fontes de carbono, devido à grande quantidade de dados obtidos, os resultados são apresentados, para cada fonte de carbono, na forma de tabelas, para melhor visualização dos valores precisos de porcentagens de inibição do radical DPPH • (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) obtidos e das diferenças estatísticas entre todos os tratamentos conduzidos.

### 7.6.1 Efeito de diferentes combinações de concentrações de sacarose e de glutamina sobre os teores de proteínas totais, açúcares solúveis totais e amido em calos de *Cedrela fissilis*

Nos experimentos descritos a seguir foram determinadas as porcentagens de inibição do radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil)



de extratos de calos de *C. fissilis*, produzidos a partir de nós cotiledonares, após 8 semanas de cultivo, em meio de cultura MS suplementado com 2,5 µM de BAP, 5 µM de ANA, 0,2% de Phytigel (Sigma) e com concentrações de sacarose de 59 mM e 118 mM, em combinação com concentrações de glutamina de 0, 2,73 mM e 5,46 mM.

Os resultados da tabela 32 indicam que o maior valor de inibição do radical DPPH• (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) foi detectado em extratos de calos cultivados com 118 mM de sacarose e 2,73 mM de glutamina (84,29%). Esse valor, contudo, não diferiu significativamente do observado com 118 mM de sacarose, na ausência de glutamina (79,44%). Os menores valores de inibição do radical DPPH•(1,1-difenil-2-picrilhidrazil) foram observados nos tratamentos em que os calos foram cultivados com 59 mM de sacarose, sem glutamina (43,53%) ou com 5,46 mM de glutamina (63,89%).

**Tabela 32:** Efeito de concentrações de sacarose e glutamina sobre a porcentagem de inibição do radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) de calos de *Cedrela fissilis* cultivados, durante 8 semanas, a partir de nós cotiledonares em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 2,5 µM de BAP e 5 µM de ANA. (Extrato=10 mg de massa seca)

Sacarose (mM)	Glutamina (mM)	Inibição do radical DPPH (%) <sup>a</sup>
59	0	43,53 ± 1,43 d
59	2,73	74,25 ± 0,51 b
59	5,46	63,89 ± 0,42 c
118	0	79,44 ± 0,64 ab
118	2,73	84,29 ± 0,90 a
118	5,46	76,63 ± 0,55 b

<sup>a</sup>Médias de no mínimo cinco repetições seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey (p< 0,05). MS= massa seca.

### 7.6.2 Efeito de diferentes fontes de carbono e de combinações de concentrações de BAP e ANA sobre os teores de proteínas totais, açúcares solúveis totais e amido em calos de *Cedrela fissilis*

Nesses experimentos foram determinadas as porcentagens de inibição do radical DPPH• (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) de extratos de

calos de *C. fissilis*, produzidos a partir de nós cotiledonares, após 8 semanas de cultivo, em meio de cultura MS suplementado com 118 mM de sacarose, frutose ou glicose, 2,73 mM de glutamina, 0,2% de Phytigel (Sigma) e com diferentes combinações de concentrações de BAP e ANA.

Observa-se, na tabela 33 que a maior porcentagem de inibição do radical DPPH• (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) foi detectada nos extratos de calos produzidos em meio de cultura contendo glicose, 5 µM de BAP e 5 µM de ANA (93,68%). Com sacarose, o maior valor (83,57%) foi obtido com 2,5 µM de BAP e 2,5 µM de ANA, e com frutose (43,02%), com 5 µM de BAP e 2,5 µM de ANA. As menores porcentagens de inibição foram observadas com glicose e 2,5 µM de BAP e 2,5 µM de ANA (11,72%) e com 2,5 µM de BAP e 5 µM de ANA (16,84%)

**Tabela 33:** Efeito de fontes de carbono e de combinações de BAP e ANA sobre a porcentagem de inibição do radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) de calos de *Cedrela fissilis* cultivados, durante 8 semanas, a partir de nós cotiledonares em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de sacarose, frutose ou glicose e 2,73 mM de glutamina. (Extrato=10 mg de massa seca)

Fonte de carbono	BAP (µM)	ANA (µM)	Inibição do radical DPPH (%) <sup>a</sup>
Sacrose	2,5	5,0	76,55 ± 1,80 c
	5,0	2,5	56,67 ± 0,18 e
	2,5	2,5	83,57 ± 0,43 b
	5,0	5,0	78,61 ± 0,41 c
Frutose	2,5	5,0	20,70 ± 1,98 h
	5,0	2,5	43,02 ± 2,14 f
	2,5	2,5	30,70 ± 0,18 g
	5,0	5,0	20,42 ± 0,73 h
Glicose	2,5	5,0	16,84 ± 1,60 i
	5,0	2,5	59,47 ± 0,28 d
	2,5	2,5	11,72 ± 0,77 j
	5,0	5,0	93,68 ± 0,18 a

<sup>a</sup>Médias de cinco repetições seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si de acordo, respectivamente, com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). MS= massa seca.

### **7.6.3 Efeito de fontes de carbono, tipos de explantes, glutamina e presença e ausência de luz sobre os teores de proteínas totais, açúcares solúveis totais e amido em calos de *Cedrela fissilis***

Nesses experimentos foram determinadas as porcentagens de inibição do radical DPPH• (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) de extratos de calos de *C. fissilis*, produzidos, após 8 semanas de cultivo, a partir de diferentes tipos de explantes cultivados em meio de cultura MS, suplementado com 118 mM de sacarose, glucose ou frutose, 2,73 mM de glutamina, 2,5  $\mu$ M de BAP, 5  $\mu$ M de ANA e 0,2% de Phytigel (Sigma).

#### **7.6.3.1 Efeito da sacarose sobre as porcentagens de inibição do radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) de extratos de calos de *C. fissilis***

Os resultados da tabela 34 indicam que, com sacarose, a maior porcentagem de inibição do radical DPPH (89,52%) foi observada em calos de folha, cultivados no escuro, na ausência de glutamina. Esse valor, contudo, não diferiu significativamente dos obtidos para calos de folha, sem glutamina na luz, de calos de epicótilo com glutamina na luz, de calos de nó foliar com glutamina no escuro, de calos de cotilédone com glutamina no escuro e de calos de epicótilo com glutamina no escuro. Na luz, a presença de glutamina diminuiu as porcentagens de inibição para a maioria dos tratamentos, exceto para calos de epicótilo, em que a presença de glutamina aumentou a porcentagem de inibição. No escuro, entretanto, a presença de glutamina elevou as porcentagens de inibição na maioria dos tratamentos sendo que diminuiu apenas em calos de folha e de raiz.

**Tabela 34:** Efeito da sacarose, luz, escuro, tipo de explante e glutamina sobre a porcentagem de inibição do radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) de calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de diferentes tipos de explantes cultivados durante 8 semanas em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de sacarose, 0 ou 2,73 mM de glutamina, 2,5  $\mu$ M de BAP e 5  $\mu$ M de ANA. (Extrato=10 mg de massa seca)

Condição de cultura	Tipo de explante	de Glutamina (mM)	Inibição do radical DPPH (%) <sup>a</sup>	
Luz	Nó cotiledonar	0	85,75 $\pm$ 0,69 bcde	
		2,73	67,12 $\pm$ 0,62 hl	
	Folha	0	87,80 $\pm$ 0,70 abc	
		2,73	-	
	Nó foliar	0	83,22 $\pm$ 1,69 defg	
		2,73	52,87 $\pm$ 0,82 m	
	Cotilédone	0	81,17 $\pm$ 1,66 fg	
		2,73	80,46 $\pm$ 0,41 g	
	Hipocótilo	0	84,13 $\pm$ 0,82 def	
		2,73	63,65 $\pm$ 0,90 l	
	Raiz	0	82,67 $\pm$ 0,74 efg	
		2,73	80,39 $\pm$ 0,31 g	
	Epicótilo	0	70,86 $\pm$ 3,08 ij	
		2,73	86,59 $\pm$ 0,37 abcd	
	Escuro	Nó cotiledonar	0	75,31 $\pm$ 1,43 h
			2,73	84,70 $\pm$ 1,09 bcdef
Folha		0	89,52 $\pm$ 0,44 a	
		2,73	84,95 $\pm$ 0,80 bcde	
Nó foliar		0	73,94 $\pm$ 3,75 hi	
		2,73	86,76 $\pm$ 1,64 abcd	
Cotilédone		0	76,48 $\pm$ 0,95 h	
		2,73	86,12 $\pm$ 0,94 abcde	
Hipocótilo		0	67,72 $\pm$ 3,53 jk	
		2,73	84,92 $\pm$ 1,67 bcde	
Raiz		0	84,54 $\pm$ 1,02 cdef	
		2,73	81,34 $\pm$ 0,97 fg	
Epicótilo		0	85,58 $\pm$ 1,20 bcde	
		2,73	88,14 $\pm$ 0,47 ab	

<sup>a</sup>Médias de no mínimo cinco repetições seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq$

0,05). MS= massa seca. - Biomassa insuficiente (não ocorreu formação de calos).

Na luz (Tabela 34) a inibição do radical livre DPPH• foi maior em calos de folha, cultivados sem a presença de glutamina ( $87,80 \pm 0,70\%$ ), seguido de calos de epicótilo, cultivados com glutamina ( $86,59 \pm 0,37\%$ ). O tratamento que apresentou a menor inibição do radical DPPH• foi com calos de nó foliar, cultivados com glutamina ( $52,87 \pm 0,82\%$ ).

No escuro (Tabela 34) os extratos de calos de folha, cultivados sem glutamina apresentaram inibição do radical livre DPPH• significativamente maior ( $89,52 \pm 0,44\%$ ) e o menor valor ( $67,72\%$ ) detectado em calos de hipocótilo, na ausência de glutamina.

#### 7.6.3.2 Efeito da frutose sobre as porcentagens de inibição do radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) de extratos de calos de *C. fissilis*

Os resultados da tabela 35 indicam que, com frutose, a maior porcentagem de inibição do radical DPPH• ( $85,85\%$ ) foi observada em calos de raiz, cultivados no escuro, na presença de glutamina. Esse valor diferiu significativamente de todos os demais obtidos para os outros tratamentos. Na luz, a presença de glutamina diminuiu as porcentagens de inibição do radical livre DPPH• apenas em calos de nó foliar e de cotilédone e no escuro, apenas para os calos de cotilédone e de epicótilo.

**Tabela 35:** Efeito da frutose, luz, escuro, tipo de explante e glutamina sobre a porcentagem de inibição do radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) de calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de diferentes tipos de explantes cultivados durante 8 semanas em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de frutose, 0 ou 2,73 mM de glutamina, 2,5 µM de BAP e 5 µM de ANA. (Extrato=10 mg de massa seca)

Condição de cultura	Tipo de explante	Glutamina (mM)	Inibição do radical DPPH (%) <sup>a</sup>	
Luz	Nó cotiledonar	0	39,23 ± 1,97 fgh	
		2,73	40,00 ± 0,88 fg	
	Folha	0	78,50 ± 1,65 b	
		2,73	77,66 ± 0,73 b	
	Nó foliar	0	32,35 ± 2,38 j	
		2,73	26,80 ± 0,43 kl	
	Cotilédone	0	80,00 ± 1,03 b	
		2,73	25,90 ± 1,03 lm	
	Hipocótilo	0	21,30 ± 4,08 m	
		2,73	35,03 ± 0,72 hij	
	Raiz	0	56,32 ± 4,87 d	
		2,73	76,98 ± 0,40 b	
	Epicótilo	0	26,42 ± 4,00 kl	
		2,73	46,01 ± 0,99 e	
	Escuro	Nó cotiledonar	0	33,14 ± 2,19 j
			2,73	43,17 ± 1,79 ef
Folha		0	66,55 ± 1,66 c	
		2,73	68,56 ± 1,01 c	
Nó foliar		0	30,73 ± 2,29 jkl	
		2,73	31,13 ± 1,90 jk	
Cotilédone		0	38,19 ± 2,37 ghi	
		2,73	33,01 ± 2,37 j	
Hipocótilo		0	51,60 ± 1,19 d	
		2,73	33,45 ± 1,39 ij	
Raiz		0	66,55 ± 3,73 c	
		2,73	85,85 ± 1,39 a	
Epicótilo		0	46,72 ± 1,40 e	
		2,73	31,80 ± 1,71 j	

<sup>a</sup>Médias de no mínimo cinco repetições seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey (p≤ 0,05). MS= massa seca.

Na luz (Tabela 35) calos de folha, com e sem glutamina, de cotilédone sem glutamina e de raiz com glutamina apresentaram significativamente as maiores porcentagens de inibição do radical livre DPPH• ( $78,50 \pm 1,65$ ;  $77,66 \pm 0,73$ ;  $80 \pm 1,03$ ;  $76,98 \pm 0,40\%$  respectivamente). O tratamento que apresentou estatisticamente a menor inibição do radical DPPH• foram calos de hipocótilo, cultivados sem glutamina ( $21,30 \pm 4,08\%$ ).

No escuro (Tabela 35), além dos calos de raiz com glutamina, que apresentaram significativamente as maiores porcentagens de inibição do radical livre DPPH• ( $85,85 \pm 1,39\%$ ), os calos de calos de folha com e sem glutamina, e calos de raiz sem glutamina, também apresentaram altas porcentagens de inibição do radical livre DPPH•, respectivamente de ( $68,56 \pm 1,01$ ;  $66,55 \pm 1,66$ ;  $66,55 \pm 3,73\%$ ).

#### 7.6.3.3 Efeito da glucose sobre as porcentagens de inibição do radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) de extratos de calos de *C. fissilis*

Os resultados da tabela 36 indicam que, com glucose, as maiores porcentagens de inibição do radical DPPH• (86,29% e 84,58%) foram observadas em calos de segmentos de folha e de raiz, cultivados no escuro, com glutamina na ausência de glutamina. Esses valores, contudo, não diferiram significativamente dos obtidos para calos de raiz (81,96%), cultivados com glutamina na luz. Com glucose, em todos os tratamentos, tanto na luz como no escuro, a presença de glutamina aumentou significativamente as porcentagens de inibição para todos os tipos de explantes.

**Tabela 36:** Efeito da glucose, luz, escuro, tipo de explante e glutamina sobre a porcentagem de inibição do radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) de calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de diferentes tipos de explantes cultivados durante 8 semanas em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de glucose, 0 ou 2,73 mM de glutamina, 2,5  $\mu$ M de BAP e 5  $\mu$ M de ANA. (Extrato=10 mg de massa seca)

Condição de cultura	Tipo de explante	Glutamina (mM)	Inibição do radical DPPH (%) <sup>a</sup>	
Luz	Nó cotiledonar	0	30,47 $\pm$ 3,01 j	
		2,73	45,01 $\pm$ 2,91 g	
	Folha	0	65,54 $\pm$ 1,83 d	
		2,73	75,89 $\pm$ 1,69 c	
	Nó foliar	0	11,70 $\pm$ 2,29 l	
		2,73	51,85 $\pm$ 2,13 f	
	Cotilédone	0	23,84 $\pm$ 1,99 k	
		2,73	37,82 $\pm$ 0,85 i	
	Hipocótilo	0	1,37 $\pm$ 0,74 m	
		2,73	32,45 $\pm$ 0,67 j	
	Raiz	0	53,54 $\pm$ 5,05 f	
		2,73	81,96 $\pm$ 1,38 ab	
	Epicótilo	0	51,13 $\pm$ 2,77 f	
		2,73	43,47 $\pm$ 0,29 gh	
	Escuro	Nó cotiledonar	0	23,44 $\pm$ 0,86 k
			2,73	69,92 $\pm$ 1,08 d
Folha		0	78,32 $\pm$ 0,55 bc	
		2,73	86,29 $\pm$ 0,76 a	
Nó foliar		0	9,49 $\pm$ 0,96 l	
		2,73	58,72 $\pm$ 0,76 e	
Cotilédone		0	51,23 $\pm$ 4,29 f	
		2,73	75,21 $\pm$ 1,45 c	
Hipocótilo		0	39,56 $\pm$ 2,12 hi	
		2,73	68,00 $\pm$ 1,11 d	
Raiz		0	45,51 $\pm$ 1,54 g	
		2,73	84,58 $\pm$ 1,33 a	
Epicótilo		0	28,02 $\pm$ 2,88 jk	
		2,73	52,35 $\pm$ 1,73 f	

<sup>a</sup>Médias de no mínimo cinco repetições seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). MS= massa seca.

Com glucose, na luz (Tabela 36) observa-se que calos de raiz cultivados com glutamina apresentaram significativamente a maior porcentagem de inibição do radical livre DPPH• (81,96  $\pm$  1,38%),



seguidos de calos de folha cultivados na glutamina ( $75,89 \pm 1,69\%$ ). O tratamento que apresentou a menor porcentagem de inibição do radical livre DPPH•, foi o realizado com calos de hipocótilo, cultivados sem glutamina ( $1,37 \pm 0,74\%$ ).

Entre os tratamentos cultivados em glucose, no escuro (Tabela 36), os calos de folha e raiz cultivados na glutamina ( $86,29 \pm 0,76$ ;  $84,58 \pm 1,33\%$  respectivamente apresentaram significativamente as maiores porcentagens de inibição do radical livre DPPH•. A menor porcentagem de inibição do radical livre DPPH• foi detectada em calos de nó foliar, cultivados na ausência de glutamina ( $9,49\%$ ).

#### 7.6.3.4 Análise comparativa dos efeitos das fontes de carbono sobre as porcentagens de inibição do radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) de extratos de calos de *C. fissilis*

A tabela 37 abaixo apresenta a compilação dos tratamentos que apresentaram os melhores resultados para as porcentagens de inibição do radical DPPH• (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) de extratos de calos, com a manipulação das diferentes fontes de carbono. Verifica-se, quanto aos tipos de explantes, que quando a sacarose foi a fonte de carbono, os calos que produziram as maiores porcentagens de inibição foram iniciados a partir segmentos de folha, hipocótilo, nó foliar, cotilédone ou hipocótilo. Porém, quando a frutose foi utilizada, os explantes de raiz foram os que produziram calos com as maiores porcentagens de inibição do radical livre DPPH• e com a glucose, os explantes de folha e raiz foram os que produziram calos, cujos extratos apresentaram as maiores porcentagens de inibição.

Quanto à eficiência da glutamina em promover as porcentagens de inibição do radical livre DPPH• observa-se na tabela 25 que, quando a fonte de carbono foi a glucose ou a frutose, a glutamina foi necessária para propiciar um efeito promotor, mas, quando a fonte de carbono foi a sacarose, apenas foi necessária a glutamina quando os explantes foram nó foliar, cotilédone e epicótilo. Quanto à necessidade de luz, verifica-se que, com sacarose, quando segmentos de hipocótilo foram utilizados como explantes a luz foi necessária, sendo que para os demais explantes as maiores inibições ocorreram quando foram cultivados no escuro. Apenas para explantes de folha, tanto na presença como na ausência de luz ocorreram altas porcentagens de inibição do radical livre DPPH• nos extratos de calos. Já com frutose ou glucose a ausência de luz foi necessária. Apenas para explantes de raiz, cultivados em glucose é que

as maiores porcentagens de inibição ocorreram tanto na luz como no escuro.

Em termos quantitativos as maiores porcentagens de inibição do radical livre DPPH• detectadas em extratos de calos produzidos em sacarose, frutose ou glucose foram similares, respectivamente de 89,52; 85,85 e 86,20%.

**Tabela 37:** Compilação dos melhores tratamentos (tipo de explante, presença/ausência de glutamina, presença/ausência de luz) que produziram as maiores porcentagens de inibição do radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) de extratos de calos de *Cedrela fissilis* cultivados durante 8 semanas, em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de sacarose, glucose ou frutose, 0 ou 2,73 mM de glutamina, 2,5 µM de BAP e 5 µM de ANA. (Extrato=10 mg de massa seca)

Fontes de carbono	Inibição do radical DPPH (%)
Sacarose	Folha, sem glutamina, luz
	Folha, sem glutamina, escuro
	Hipocótilo, sem glutamina, luz
	Nó foliar, com glutamina, escuro
	Cotilédone, com glutamina, escuro
	Epicótilo, com glutamina, escuro
Frutose	Raiz, com glutamina, escuro
Glucose	Folha, com glutamina, escuro
	Raiz, com glutamina, escuro
	Raiz, com glutamina, luz

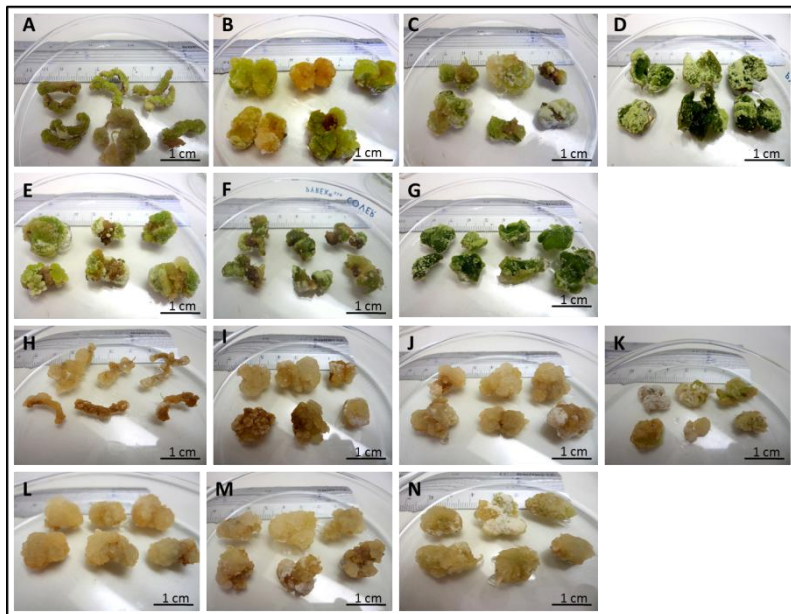
## 7.7 ANÁLISES HISTOQUÍMICA DE CALOS DE *CEDRELA FISSILIS*

### 7.7.1 Teste histoquímico do azul de toluídina (AT-O)

Para caracterizar a morfologia e a histoquímica, foram escolhidas 14 amostras crescidas em diferentes condições de cultivo, mas que contemplam tanto as características mais comuns quanto algumas estruturas mais raras observadas nos calos.

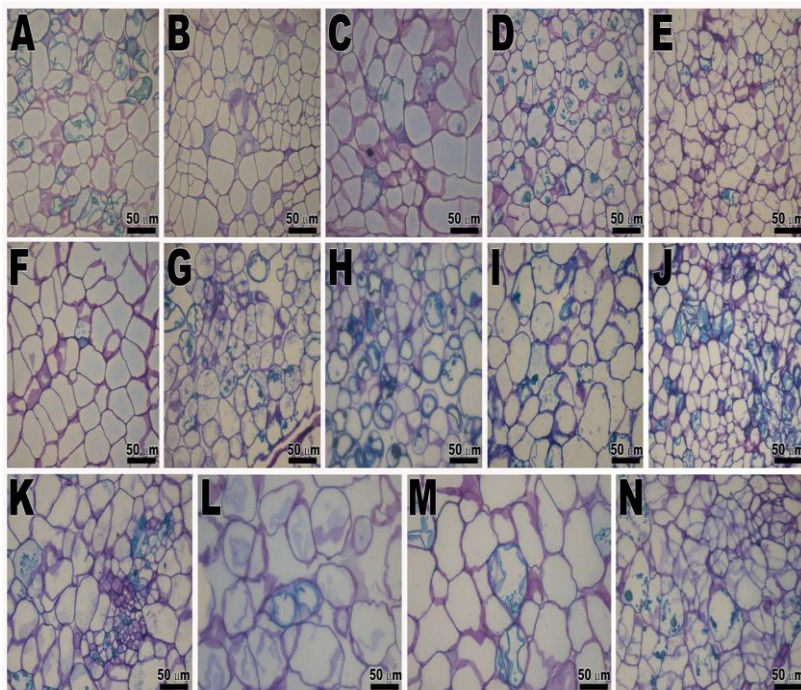
Calo de raiz apresentado na Figura 11– A, crescido em meio de cultura contendo 118 mM de glucose, com a adição de 2,73 mM de glutamina e cultivados na luz, representa a morfologia com coloração esverdeada, com presença de calos maiores e outros menores na mesma amostra. A amostra B, apontada na figura 11 (calos de hipocótilo) também foi obtida em meio de cultura suplementado com 118 mM de glucose, e com a adição de glutamina, apresentou calos com colorações esverdeadas e calos alaranjados, sendo em sua maioria calos grandes. A amostra C da figura 11, calos de nó cotiledonar apresentaram em sua morfologia colorações esverdeadas com estruturas globulares brancas de aspecto aveludado. As amostras D, E, F e G apontadas na figura 11, são calos de folha, epicótilo, nó foliar e cotilédone respectivamente, apresentaram colorações esverdeadas, com estruturas esbranquiçadas e algumas amostras com pigmentação marrom (Figura 11, amostras E e F).

Os calos cultivados com 118 mM de glucose, 2,73 mM de glutamina no escuro (Figura 11, Amostras H a N) apresentaram morfologias esbranquiçadas quando comparados com os calos cultivados na luz. Apresentaram estruturas globulares brancas de aspecto aveludado, que apareceram com frequência em calos crescidos nas diferentes condições deste cultivo. Estes calos apresentaram-se friáveis quando comparados com os calos cultivados na luz.



**Figura 11:** Diferentes morfologias de calos de *Cedrela fissilis* crescidas na presença ou ausência de luz cultivados durante 8 semanas em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de glicose, 2,73 mM de glutamina, 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA. A: Calos oriundos de raiz, na luz; B: Calos oriundos de hipocótilo, na luz; C: Calos oriundos de nó cotiledonar, na luz; D: Calos oriundos de folha, na luz; E: Calos oriundos de epicótilo, na luz; F: Calos oriundos de nó foliar, na luz; G: Calos oriundos de cotilédone, na luz; H: Calos oriundos de raiz, no escuro; I: Calos oriundos de hipocótilo, no escuro; J: Calos oriundos de nó cotiledonar, no escuro; K: Calos oriundos de folha, no escuro; L: Calos oriundos de epicótilo, no escuro; M: Calos oriundos de nó foliar, no escuro; N: Calos oriundos de cotilédone, no escuro.

Quando observados ao microscópio de luz, os diferentes tipos de calos de *Cedrela fissilis* quando tratados com Azul de Toluidina (AT-O) apresentaram uma reação metacromática na fina parede celular ((Fig. 12, A-N)) coloração roxa)), indicando a presença de polissacarídeos ácidos. Enquanto, que o citoplasma apresentou uma reação ortocromática, e a presença de grânulos ortocromáticos foram verificados. Estes grânulos possivelmente indicam a presença de compostos fenólicos.

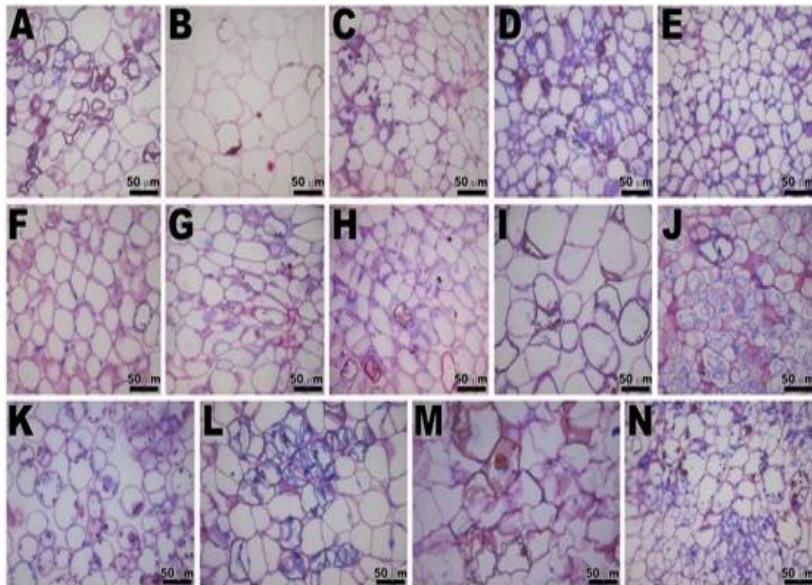


**Figura 12:** Seções transversais de estruturas de calos de *Cedrela fissilis* crescidas na presença ou ausência de luz em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de glicose, 2,73 mM de glutamina, 2,5 µM de BAP e 5 µM de ANA. Após 8 semanas de cultivo, submetidos ao teste histoquímico Azul de Toluidina. Note a reação metacromática nas paredes celulares e grânulos ortocromáticos (em azul). A: Calos oriundos de raiz, na luz; B: Calos oriundos de hipocótilo, na luz; C: Calos oriundos de nó cotiledonar, na luz; D: Calos oriundos de folha, na luz; E: Calos oriundos de epicótilo, na luz; F: Calos oriundos de nó foliar, na luz; G: Calos oriundos de cotilédone, na luz; H: Calos oriundos de raiz, no escuro; I: Calos oriundos de hipocótilo, no escuro; J: Calos oriundos de nó cotiledonar, no escuro; K: Calos oriundos de folha, no escuro; L: Calos oriundos de epicótilo, no escuro; M: Calos oriundos de nó foliar, no escuro; N: Calos oriundos de cotilédone, no escuro.

### 7.7.2 Teste histoquímico do PAS e Coumassie Brilliant Blue (CBB)

Quando submetidos à histoquímica de PAS+CBB, os calos de *Cedrela fissilis* apresentaram reação positiva aos polissacarídeos neutros ((Fig. 13, A-N)) coloração rósea)) evidenciando a presença de

celulose. No citoplasma foi possível verificar a presença de poucos grãos de amido. Também foi possível evidenciar a presença de organelas ricas em material proteico (( Fig. 13, A-N) coloração azulada).



**Figura 13:** Secções transversais de estruturas de calos de *Cedrela fissilis* crescidas na presença ou ausência de luz em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 118 mM de glicose, 2,73 mM de glutamina, 2,5  $\mu$ M de BAP e 5  $\mu$ M de ANA. Após 8 semanas de cultivo, submetidos ao teste histoquímico de PAS + CBB. Observe a reação nas paredes celulares, a presença de grãos de amido (em rosa) e estruturas celulares ricas em material proteico (em azul). A: Calos oriundos de raiz, na luz; B: Calos oriundos de hipocótilo, na luz; C: Calos oriundos de nó cotiledonar, na luz; D: Calos oriundos de folha, na luz; E: Calos oriundos de epicótilo, na luz; F: Calos oriundos de nó foliar, na luz; G: Calos oriundos de cotilédone, na luz; H: Calos oriundos de raiz, no escuro; I: Calos oriundos de hipocótilo, no escuro; J: Calos oriundos de nó cotiledonar, no escuro; K: Calos oriundos de folha, no escuro; L: Calos oriundos de epicótilo, no escuro; M: Calos oriundos de nó foliar, no escuro; N: Calos oriundos de cotilédone, no escuro.

## 8. DISCUSSÃO

A manipulação de aportes de carbono e glutamina no meio de cultura em que foram produzidos os calos, visando otimizar o metabolismo secundário, teve por base a constatação de que o metabolismo secundário das plantas é dependente do metabolismo primário, pois a síntese das moléculas do metabolismo secundário das plantas ocorre a partir dos intermediários das vias do metabolismo primário, como a via glicolítica, ciclo de Krebs e via da pentose fosfato.

A via glicolítica e via da pentose fosfato são as duas maiores vias que convertem o carboidrato a piruvato e malato, importantes para o Ciclo de Krebs, e utilizam o mesmo substrato que é a glucose-6-fosfato, que por sua vez se origina do metabolismo dos carboidratos disponíveis na célula, sejam esses sacarose (carboidrato de transporte, além da sacarose temos outros tipos de moléculas de carboidratos que podem ser transportadas como as frutanas, frutose, glucose) ou amido (carboidrato que pode ser armazenado). A via da pentose fosfato, que metaboliza a glucose-6-fosfato para a produção dos açúcares com cinco carbonos, as pentoses, são importantes para a síntese dos ácidos nucleicos (TAIZ & ZEIGER, 2009). Dessa forma, tanto a glicólise como a via das pentose fosfato poderiam ser estimuladas diretamente, pela maior disponibilidade de carboidratos fornecidos no meio de cultura, gerando uma quantidade maior de moléculas intermediárias que poderiam então ser utilizadas para a construção das moléculas dos metabólitos secundários.

Para a construção dessas moléculas são necessários átomos de carbono e em alguns casos, átomos de nitrogênio. Além disso, átomos de carbono e de nitrogênio também serão necessários para construir os aminoácidos e proteínas, muitas das quais enzimas que catalisarão as reações das vias do metabolismo primário e secundário das plantas.

Para a assimilação do nitrogênio inorgânico presente do meio de cultura, será necessária a disponibilidade de moléculas de glutamato, onde serão incorporados os átomos de nitrogênio provenientes do íon amônio (que pode estar presente nessa forma no meio de cultura ou pode ser oriundo da conversão do nitrato em nitrito e do nitrito em amônio), formando então a glutamina, pela ação da enzima GS (glutamina sintetase). Parte das moléculas de glutamina formadas servirá de molécula doadora de nitrogênio para as reações que formarão os aminoácidos, pela ação das transaminases e parte será importante para se ligar ao alfa-cetoglutarato, fornecido pelo Ciclo de Krebs,

regenerando o glutamato, molécula receptora do nitrogênio inorgânico, pela ação da enzima GOGAT (glutamato sintase) (TAIZ & ZEIGER, 2009). Assim, a produção de glutamato depende da quantidade de glutamina disponível e também dos esqueletos de carbono, na forma do alfa-cetoglutarato, vindos do Ciclo de Krebs, que por sua vez dependem dos carboidratos que estão sendo metabolizados na via glicolítica. Dessa forma, para otimizar a assimilação do nitrogênio é necessário que a célula tenha o aporte de carboidratos necessários para construir as moléculas receptoras do nitrogênio que está entrando na célula, que são as moléculas de glutamato.

Portanto, a glutamina fornecida no meio de cultura, em combinação com o fornecimento de maiores aportes de carboidratos, poderia otimizar a produção de mais moléculas de glutamato, para otimizar a assimilação do nitrogênio inorgânico disponível. Poderia também aumentar o número de moléculas de glutamina disponíveis para ação das transaminases e síntese de aminoácidos e proteínas estruturais e enzimáticas, para os diferentes processos de síntese do metabolismo primário e secundário, além de significar um aumento da disponibilidade de átomos de nitrogênio, que poderiam ser utilizados na síntese dos metabólitos secundários nitrogenados.

Outros efeitos importantes do maior aporte de átomos de nitrogênio, sejam esses fornecidos através de fontes de nitrogênio orgânico ou inorgânico, seria no metabolismo dos ácidos nucleicos e na síntese de moléculas nitrogenadas que atuam como hormônios, tanto potencializando a produção das enzimas de síntese como também contribuindo estruturalmente para a construção de moléculas específicas como de certas auxinas, citocininas e poliaminas e de pequenos peptídeos sinalizadores, como a sistemina, com apenas 18 aminoácidos, que viajam pelo floema das folhas sob herbivoria dos insetos para aumentar o conteúdo de ácido jasmônico e inibidores de proteínas em folhas distantes, protegendo-as contra o ataque pelos insetos. Assim, os suprimentos externos de nitrogênio e carbono poderiam estar alterando os níveis endógenos dos hormônios dos calos que, em interação com os reguladores de crescimento fornecidos exógenamente, poderiam estar modulando os metabolismos primários e secundários.

Os resultados obtidos no presente trabalho indicaram que foi possível otimizar, para nós cotiledonares, na presença de 2,5 $\mu$ M de BAP e 5  $\mu$ M de ANA as melhores concentrações de sacarose e de glutamina que asseguraram a produção de maiores concentrações dos diferentes tipos de metabólitos analisados e a maior atividade antioxidante dos calos. Quando foram manipuladas as concentrações de BAP e ANA e as



fontes de carbono, na concentração de 118 mM para este mesmo tipo de explante, também foi possível determinar as melhores concentrações e combinações de reguladores de crescimento, quando foi utilizada a concentração de 2,73 mM de glutamina, que estimularam a produção de metabólitos e atividade antioxidante. Porém, com as manipulações dos tipos de explantes, fontes de carbono, glutamina e presença e ausência de luz foi possível otimizar ainda mais a produção de compostos fenólicos pelos calos em 95%, de flavonoides em 216%, de carotenoides em 382%, clorofila *a* em 540% e clorofila *b* em 291% em relação aos valores máximos obtidos nos experimentos anteriores conduzidos com nó cotiledonar, em que foram manipuladas as concentrações de glutamina, na presença de 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  e ANA. Entretanto, a otimização da produção de proteínas totais pelos calos foi de 18%, de açúcares solúveis totais de 28% e de amido 36%. Várias considerações sobre esses resultados serão feitas a seguir.

Os experimentos que avaliaram o efeito das concentrações de sacarose e glutamina sobre a indução e morfogênese de calos de *Cedrela fissilis* iniciados a partir de nós cotiledonares cultivados durante 8 semanas em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA, mostraram que os calos cultivados nas concentrações de 59 e 118 mM de sacarose, sem a suplementação de glutamina, apresentaram 85% de calogênese. Os estudos conduzidos por Pilatti, (2011) sobre a dissimilação dos calos talvez expliquem a possível redução nas porcentagens de indução no meio de cultura com glutamina, pois, nos calos cultivados em meio de cultura contendo sacarose, a adição de glutamina resultou em um aumento na fase *lag*, sugerindo que a adaptação do metabolismo das células ao meio contendo a glutamina demanda mais tempo, atrasando o início do crescimento dos calos. Foi possível observar, que nos tratamentos (59 e 118 mM de sacarose, sem a adição de glutamina) ocorreu formação de rizogênese. A formação de raízes está ligada à ação das auxinas e depende de sua concentração no meio de cultura. Altas concentrações de auxinas no meio de cultura favorecem a rizogênese direta nos explantes, ou a formação de raízes em calos, portanto, a rizogênese ocorrida nestes tratamentos, pode ter sido pela maior síntese de auxinas pelos calos e com a adição de glutamina ao meio, provocou inibição ou redução na produção de auxinas pelos calos.

O efeito das concentrações de sacarose e glutamina sobre o conteúdo de proteínas totais revelou que calos cultivados com 59 mM de sacarose e 5,46 mM de glutamina apresentaram as maiores concentrações deste composto, entretanto, com 118 mM de sacarose o

maior conteúdo de proteínas ocorreu com 2,73 mM e não com 5,46 mM de glutamina. Tais resultados poderiam ser explicados pelo possível estresse osmótico causado pelas altas concentrações de sacarose (118 mM) em combinação com concentrações maiores de glutamina (5,46 mM), que poderia estar dificultando a absorção das moléculas de glutamina disponíveis no meio de cultura, devido à possível diminuição do potencial osmótico. Assim, apesar de existir um aporte maior de glutamina no meio de cultura, a molécula não pode ser aproveitada de forma eficiente, talvez pela dificuldade de absorção pelas células dos calos. Um resultado que confirma esta hipótese é o fato das concentrações de proteínas, tanto com 118 mM de sacarose na ausência de glutamina como na presença de 5,46 mM terem sido similares. Já, no tratamento com 59 mM de sacarose, é possível que o potencial osmótico do meio de cultura tenha permanecido num nível que permitiu a completa ou mais eficiente absorção e utilização dos 5,46 mM de glutamina fornecidos, resultando na maior disponibilidade de nitrogênio para a posterior síntese de aminoácidos e proteínas totais.

Os maiores níveis de açúcares solúveis totais e amido observados com as concentrações de 118 mM de sacarose e 5,46 mM de glutamina podem ser explicados primeiro pelo fato do maior aporte de sacarose implicar no aumento da disponibilidade de esqueletos de carbono para incrementar as vias metabólicas dos carboidratos, elevando os níveis intracelulares dos açúcares solúveis e dos carboidratos armazenados na forma de amido. Entretanto, é interessante notar que, na ausência de glutamina, a mesma concentração de sacarose (118 mM), ou seja, o mesmo aporte de esqueletos de carbono, não pôde, por si só, incrementar os níveis de síntese de açúcares solúveis totais e amido, tendo sido necessária a presença de 5,46 mM de glutamina para otimizar o processo. É possível que nesse caso, o maior aporte de glutamina no meio de cultura tenha contribuído para otimizar a síntese de certas proteínas/enzimas específicas das vias metabólicas de carboidratos, que levam à síntese de açúcares solúveis totais e amido.

O mesmo raciocínio descrito no parágrafo anterior é válido para explicar uma outra observação importante: 118 mM de sacarose e 5,46 mM de glutamina também resultaram na otimização da via de síntese de carotenoides pelos calos, o que faz sentido pois os carotenoides, que são tetrapernóides com 40 átomos de carbono, são produzidos a partir do ácido mevalônico, demandando grande quantidade de átomos de carbono provida pela alta concentração de sacarose no meio de cultura e de nitrogênio, fornecido pela glutamina, para otimizar a produção das proteínas/enzimas envolvidas na síntese desses compostos.

A via de síntese dos tetraterpenóides também fornece a cadeia de fitol para a síntese das clorofilas, mas contraditoriamente, os maiores níveis de clorofila nos calos, tanto da clorofila *a* como da clorofila *b* foram observados nos tratamentos com 59 mM de sacarose e 5,46 mM de glutamina e apenas no caso da clorofila *b*, 118 mM de sacarose e 2,73 mM de glutamina também promoveu a maior síntese. Como a clorofila é formada pelos anéis tetrapirrólicos, que contém nitrogênio, é coerente que a síntese desse composto tenha sido otimizada na presença de níveis maiores de glutamina e que tenha ocorrido no mesmo tratamento em que foram detectados os maiores níveis de proteínas totais.

Os níveis de açúcares solúveis totais permitem caracterizar as fases de desenvolvimento celular que podem demandar maior produção de compostos metabólicos específicos (SERRA, 1999). Açúcares funcionam como moléculas para armazenagem de energia, como fornecedores de esqueletos de carbono orgânico para sintetizar compostos pelas células (SERRA *et al.*, 2000). Além disso, os níveis de açúcares tem implicações em vários estudos fisiológicos, pois significam níveis de reserva prontamente disponíveis para o crescimento (PASSOS, 1996).

Diferentes autores têm relatado a presença de amido em células vegetais, cultivadas *in vitro* (SWARNKAR *et al.*, 1986; MANGAT *et al.*, 1990; BRANCA *et al.*, 1994). O possível papel deste polissacarídeo parece ser incerto ainda nos processos de desenvolvimento *in vitro*, mas têm se sugerido que o amido pode atuar como fonte de energia ou como agente osmótico essencial ao desenvolvimento (STAMP, 1997). Trabalhos sobre a determinação de amido em células vegetais *in vitro* foram realizados com culturas de calos embriogênicos e não embriogênicos de *Medicago arborea L.* Estas culturas foram investigadas a fim de determinar o conteúdo de amido e foi observado que os calos não embriogênicos cultivados em meio MS foram os que apresentaram maiores teores deste composto (MARTIN *et al.*, 2000).

Apesar da maior concentração de proteínas totais nos calos ter ocorrido com 59 mM de sacarose e 5,46 mM de glutamina e dos maiores níveis de açúcares solúveis totais e amido terem ocorrido com 118 mM de sacarose e 5,46 mM de glutamina, os maiores níveis de fenólicos totais e flavonoides, assim como a maior inibição do radical DPPH ocorreram com 118 mM de sacarose e 2,73 mM de glutamina, o que indica que apenas nessas condições de cultivo foram otimizadas as vias de síntese desses compostos. Um outro aspecto importante é que, o maior estresse osmótico do meio de cultura, provocado pelas altas concentrações de sacarose e glutamina não redundou na maior produção

dos fenólicos totais e flavonoides. Assim, apenas o fornecimento de um maior aporte de átomos de carbono não é suficiente para otimizar a via de síntese de fenólicos e flavonoides, sendo necessário o aporte paralelo da quantidade de nitrogênio suficiente para a produção de aminoácidos e proteínas/enzimas envolvidas na síntese desses compostos. A síntese dos compostos fenólicos ocorre a partir da glucose, via ácido chiquímico, podendo ser catalizada pela enzima PAL, a partir da fenilalanina, via ácido cinâmico ou TAL, a partir da tirosina, via ácido cumárico, ambas podendo levar à síntese dos flavonoides. Portanto, fica claro que o maior aporte de carbono estaria desempenhando um papel importante na otimização dessa via metabólica.

O aumento de compostos fenólicos está ligado à presença da enzima fenilalanina amônia liase (PAL, *phenylalanine ammonia lyase*) e os resultados obtidos no presente estudo indicam que nos calos cultivados com sacarose, glutamina, na luz estiveram presentes os fatores essenciais para a ativação da enzima PAL em estimular a síntese de compostos fenólicos.

Quando avaliada a atividade antioxidante entre os tratamentos de calos de *Cedrela fissilis*, foi possível observar uma relação entre a maior porcentagem de inibição do radical livre DPPH• e as maiores concentrações de compostos fenólicos totais, flavonoides e de clorofila *b* (118 mM de sacarose e 2,73 mM de glutamina), que poderiam estar atuando como antioxidantes. Os compostos fenólicos são potentes antioxidantes, o que se deve principalmente à sua estrutura química e suas propriedades redutoras. Estas características fazem com que desempenhem um papel importante na neutralização ou sequestro dos radicais livres, agindo no oxigênio singlete, atuando nas oxidações lipídicas, e quelação de metais de transição (SATUÉ-GARCIA *et al.*, 1997; HOPIA & HEINONEM, 1999), agindo tanto na etapa de iniciação como na desenvolvimento do processo oxidativo (SOARES, 2002; HASLAM, 1996; CHUN *et al.*, 2005).

Culturas de calos de *Citrus aurantifolia* são capazes de armazenar flavonoides, mas em menores quantidades, do que foi observado em extratos de tecidos de folhas e frutos da planta (BERHOW *et al.*; 1994). Tavano *et al.*, (2009), observaram que culturas de calos de Camomila, apresentaram valores baixíssimos de flavonoides (0,12 µg/g MS). No presente estudo, por outro lado, níveis maiores de flavonoides de 0,54 µg/g MS foram detectados em calos produzidos com 118 mM de sacarose e 2,73 mM de glutamina. Em condições naturais, os flavonoides têm um importante papel na defesa de plantas. É possível que o meio de cultura utilizado que induziu a formação de calos, não

tenha favorecido a formação de flavonoides, que apareceram em baixas concentrações, como também observado por Dias *et al.*, (1998) em *Hypericum perforatum*, já que em meio de cultura, a planta não necessitaria de produzir grande quantidade de fitoalexinas. Estudos com calos de folhas de *Passiflora quadrangularis*, mostraram que, ao longo do cultivo, ocorreram pequenas formações de flavonoides, mas que, quando os calos foram expostos a radiação UV-B, houve maior produção deste composto (ANTOIGNONI *et al.*, 2007).

Alguns autores confirmam que a adição de glutamina ao meio de cultivo provoca o aumento de proteínas totais, como Zouine & Hadrami, (2007), que analisando embriões somáticos de *Phoenix dactylifera L.* observaram que a adição de glutamina ao meio de cultivo aumentou a produção de embriões somáticos e estimulou a síntese de proteínas. Lai *et al.*, (1992), estudando embriões somáticos de *Medicago sativa* também observaram que a glutamina tem um papel essencial em estimular a síntese de proteínas. Santos e Caldeira, (1999), afirmam que a adição de amônio, que também é uma fonte de nitrogênio, como a glutamina, em culturas de calos induz níveis baixos no conteúdo de proteínas solúveis totais.

Os níveis de açúcares solúveis totais permitem determinar as fases de desenvolvimento celular que podem fornecer maior produção de compostos celulares específicos (SERRA, 1999). Açúcares funcionam como dispositivos para armazenagem de energia, como fornecedores de esqueletos de carbono orgânico para sintetizar compostos através das células (SERRA *et al.*, 2000). Além disso, os níveis de açúcares tem implicações em vários estudos fisiológicos, pois significam níveis de reserva prontamente disponíveis para o crescimento (PASSOS, 1996).

Muitos autores afirmam que o estresse salino, que poderia estar ocorrendo no tratamento com 118 mM de sacarose e 5,46 mM de glutamina, poderia levar a um incremento na atividade das enzimas glutamina sintase (ROOSENS *et al.*, 1998; VIÉGAS & SILVEIRA, 1999) e glutamato sintase (BERTELI, 1995), envolvidas na assimilação do íon amônio. A glutamina fornecida no meio de cultura então, também poderia ser utilizada para aumentar a produção de moléculas de glutamato para assimilar mais íons amônio do meio de cultura, desta forma, otimizando ainda mais a biossíntese de glutamina e aminoácidos pelas células. Esta síntese de glutamato depende de um precursor do Ciclo de Krebs, o  $\alpha$ -cetogluturato, cujo aporte depende do ótimo metabolismo da fonte de carbono pela via glicolítica. Quando a planta é fotossinteticamente ativa, a resposta ao estresse oxidativo se dá pelo

aumento nas concentrações de carotenoides (SIMÃO, 2010). No entanto, muito pouco se sabe sobre como ocorre à síntese e acúmulo de carotenoides em culturas de calos.

O fato dos resultados dos experimentos conduzidos para verificar o efeito das fontes de carbono (sacarose, frutose e glucose a 118 mM) e das diferentes concentrações de BAP e ANA sobre a indução e morfogênese de calos cultivados durante 8 semanas em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido terem indicado um efeito promotor da frutose e glucose, na indução dos calos e da sacarose, na rizogênese, poder ter sido devido à forma como esses açúcares são metabolizados pelas células dos calos.

A sacarose apresenta uma rota metabólica diferente da frutose e da glucose, pois para que a sacarose seja metabolizada é necessário que as células dos tecidos absorvam as moléculas de sacarose do meio de cultura, produzam as invertases, capazes de quebrar a molécula e originar moléculas de D-glucose e de D-frutose, que serão então utilizadas, respectivamente, pelas enzimas hexoquinase e frutoquinase, e transformadas em moléculas de glucose-6-fosfato e de frutose-6-fosfato, para posterior processamento na via glicolítica. Já outra via possível de metabolização da glucose-6-fosfato seria a via da pentosefosfato, que utiliza a glucose-6-fosfato para conversão em moléculas de açúcares de 5 carbonos (TAIZ & ZEIGER, 2004).

Quando, porém, se adiciona apenas a glucose ao meio de cultura é necessário que existam nas células duas enzimas ativas, que atuarão na primeira reação de transformação em glucose-6-P e na segunda reação de conversão da glucose-6-P em frutose-6-fosfato, que seguirá o fluxo da via glicolítica e Ciclo de Krebs, em que outras enzimas serão necessárias. Parece então, que com a ministração da glucose e da frutose ao meio de cultura, o metabolismo seria mais rápido do que com a sacarose, pois as moléculas são rapidamente transformadas em glucose-6-fosfato, na primeira reação e esta em frutose-6-fosfato, seguindo o fluxo da via glicolítica, para a geração de energia para o crescimento das células, via Ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa. Outra via de metabolização da glucose é a via da pentose fosfato citado anteriormente, que utiliza a glucose-6-fosfato para conversão em moléculas de açúcares de cinco carbonos, entre elas as riboses, que poderiam estar contribuindo para otimizar a síntese dos ácidos nucléicos e a divisão celular.

O fato de todas as combinações de BAP e ANA terem contribuído para a rizogênese dos calos produzidos com sacarose e não com as outras fontes de carbono sugere que, com sacarose, os

reguladores de crescimento atuaram de forma diferenciada. É possível que a sacarose tenha induzido alterações endógenas no balanço de auxinas e citocininas, que em combinação com todas as concentrações exógenas fornecidas atingiu o nível ótimo para induzir a diferenciação de raízes nos calos. A indução de raízes adventícias foi devida à alteração da relação auxina/citocinina endógena dos tecidos, como ocorre normalmente em plantas (ROSE *et al.*, 2006).

A capacidade dos tecidos para formação de raízes depende de vários fatores endógenos ou exógenos e suas interações (HAISSIG, 1982 & NEMETH, 1986). A iniciação das raízes é um processo que demanda bastante energia e, portanto, a presença de carboidratos no meio de cultura (MOHAMMED & VIVALDER, 1988). De acordo com George & Sherington (1984), a presença de carboidratos tem mostrado ser essencial para a formação de raízes em calos cultivados *in vitro* de muitas espécies. Nanda & Jain (1972) observaram que, para haver enraizamento, há necessidade de um nível ótimo de carboidratos, e que alguns são mais eficientes que outros. Há também uma interação no nível de carboidratos com o nível hormonal endógeno (NEMETH, 1986).

Bhojwani & Razdan, (1983) verificaram que a diferenciação de tecidos vasculares é afetada pela presença de auxinas e sacarose. De acordo com os mesmos autores, o efeito da auxina na diferenciação de tecidos vasculares está relacionado com a presença de sacarose. A sacarose poderia atuar como substrato para o processo de respiração celular, fornecendo uma quantidade de energia para o processo de rizogênese. Segundo George e Sherington (1984), a presença de carboidratos no meio tem demonstrado ser essencial para o desenvolvimento de raízes em calos cultivados *in vitro*. Por outro lado, Nemeth, (1986) cita que a sacarose estaria associada em manter os níveis endógenos de hormônios, diferentemente das outras fontes de carbono. Dessa forma, o metabolismo dos calos que apresentaram rizogênese poderia ser diferente do metabolismo dos calos que não formaram raízes, principalmente quanto à disponibilidade dos níveis endógenos dos reguladores de crescimento.

O fato dos teores de proteínas totais serem maiores em certos tratamentos sugere que a fonte de carbono utilizada, no caso a sacarose em combinação com 5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA ou a frutose, com 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA, interage com concentrações específicas de reguladores de crescimento para otimizar a síntese de proteínas totais pelos calos. Tais resultados podem ser explicados pelo fato de que tanto as citocininas como as auxinas estão envolvidas no

processo de retardar a senescência dos tecidos vegetais, e para atuarem nessa direção, devem estimular o metabolismo das proteínas e ácidos nucléicos, mantendo os níveis destes compostos altos. Também as auxinas em combinação com as citocininas podem estimular a divisão celular, que vai exigir maior síntese protéica e de ácidos nucléicos.

É interessante notar que foi com a sacarose e com 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 2,5  $\mu\text{M}$  de ANA que foram produzidas as maiores concentrações de açúcares solúveis totais, amido, fenólicos totais e clorofila *a*, mas para otimizar a produção de carotenoides foi necessário aumentar a concentração de BAP em relação ao ANA e trabalhar com as concentrações de 5  $\mu\text{M}$  de BAP e 2,5  $\mu\text{M}$  de ANA. E ainda foi necessário utilizar a glicose para otimizar a síntese de flavonoides (2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 2,5  $\mu\text{M}$  de ANA), para otimizar a inibição do radical DPPH (5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA) e otimizar a produção de clorofila *b* (5  $\mu\text{M}$  de BAP e 2,5  $\mu\text{M}$  de ANA). E ainda, vários parâmetros como os açúcares solúveis totais, o amido, os flavonoides, carotenoides, clorofila *a* e a inibição do radical DPPH• foram otimizados, pelas manipulações das fontes de carbono e das concentrações dos reguladores de crescimento, em relação aos resultados dos experimentos comentados na seção anterior, em que para a concentração de 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5  $\mu\text{M}$  de ANA foram manipuladas as concentrações de sacarose e de glutamina.

Na avaliação do conteúdo de proteínas totais, em calos cultivados com diferentes concentrações de BAP e ANA, foi possível observar que os calos cultivados com as concentrações de 5,0  $\mu\text{M}$  de BAP e 5,0  $\mu\text{M}$  de ANA e o tratamento com frutose com 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 5,0  $\mu\text{M}$  de ANA apresentaram as maiores concentrações de proteínas solúveis totais. Geralmente, as auxinas, como ANA, utilizadas no presente estudo, atuam na inicialização da divisão celular e controlam os processos de crescimento e alongação celular. Algumas delas atuam no metabolismo do RNA, induzindo a transcrição de RNAs mensageiros que decodificam proteínas para o crescimento, induzindo uma desordenada proliferação celular e a formação dos calos (GEORGE, 1996). Evidências mostram que auxinas exógenas estimulam a síntese de novos RNAs e proteínas, em particular, em culturas de tecidos vegetais (TEALE *et al.*, 2006). Embora não haja nenhuma informação sobre o mecanismo que ativa a síntese de tipos específicos de RNAs ou as possíveis funções das proteínas que sintetizam. Além disso, o envolvimento de reguladores de crescimento na indução e alterações nos níveis de proteínas foi atribuída ao papel no controle da divisão celular, regulando certos genes (SPRINGER *et al.*, 1995; TAKEUCHI



*et al.*, 1995). Diferentes concentrações de reguladores de crescimento podem desencadear mudanças nos padrões de proteínas em culturas de calos (MOHAMED *et al.*, 2011). Silva *et al.*, (2005) observaram que bandas de proteínas com pesos moleculares entre 94 e 20 kDa foram detectadas em culturas de calos de *Glycine wightii* cultivadas em meio MS, com 4,52 mM de 2,4-D e 0,46 mM de cinetina, sendo uma resposta aos reguladores de crescimento. Renaudin *et al.*, (1991), também relataram que os padrões de proteínas variaram significativamente no seu nível de expressão, de acordo com as concentrações de reguladores de crescimento.

O fato das maiores concentrações de açúcares solúveis totais e amido ocorrerem no mesmo tratamento (sacarose, 2,5  $\mu$ M de BAP e 2,5  $\mu$ M de ANA) indica que não está havendo competição entre as vias de síntese de açúcares solúveis totais e a via de síntese de amido, assim a combinação da sacarose com as concentrações de 2,5  $\mu$ M de BAP e 2,5  $\mu$ M ANA estariam atuando de forma a otimizar as duas vias de síntese, talvez pelo fato dos esqueletos de carbono supridos pela sacarose não serem limitantes. Experimentos preliminares conduzidos por Nunes *et al.*, 2002 e por Laudano (2005) demonstraram a ação sinérgica de BAP e ANA na promoção do crescimento em massa seca de calos de *C. fissilis* originados a partir de segmentos nodais cotiledonares durante 45 dias em meio de cultura MS, semi-sólido, suplementado com 20 g/L de sacarose. Este fato talvez possa explicar o acúmulo de maiores concentrações de açúcares solúveis totais e amido, como resultado do estímulo do metabolismo necessário para prover o maior crescimento dos calos.

O acúmulo de compostos fenólicos totais ocorreu em maiores quantidades em calos de segmentos nodais cotiledonares, cultivados com sacarose com 2,5  $\mu$ M de BAP e 2,5  $\mu$ M de ANA. Estes resultados estão em concordância com os obtidos por Rao & Ravishankar (2002), que afirmaram que ao manipular as condições de cultura, incluindo as concentrações e o tipo de reguladores de crescimento, pode ser estabelecida a formação do produto secundário em plantas medicinais, cultivadas *in vitro*. Os tipos e as concentrações de auxina e citocinina ou a razão entre elas pode influenciar as concentrações dos metabólitos secundários em células de plantas cultivadas *in vitro*. Uma elevada proporção da auxina 2,4-D e BAP (2 mg/l de 2,4-D : 1 mg/l de BAP) e Picloran e BAP (0,1 mg/l de picloran : 2 mg/l de BAP) com a suplementação de sacarose, promoveram maiores concentrações de fenólicos totais ( $29,21 \pm 0,91$ ;  $165,32 \pm 10,54$   $\mu$ g MS respectivamente) em culturas de calos de *Larrea divaricata* (PALACIO *et al.*, 2012). Os

autores afirmam que a síntese e o acúmulo de compostos secundários dependem, também, do estado de diferenciação da célula ou do órgão. Compostos fenólicos também estão envolvidos na regulação do crescimento, na diferenciação e no controle dos níveis exógenos de auxinas, sendo que alguns tipos de fenólicos podem regular o transporte de auxinas (MATO *et al.*, 1998; DUNSTAN *et al.*, 1995).

Quanto ao conteúdo de flavonoides, calos cultivados com glucose, com a adição de 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 2,5  $\mu\text{M}$  de ANA apresentaram as maiores quantidades deste composto. Observa-se que tanto para fenólicos, quanto para flavonoides, as mesmas concentrações de reguladores de crescimento eficientes foram as mesmas (2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 2,5  $\mu\text{M}$  de ANA), mas o que diferiu foi o tipo de fonte de carbono. Palacio *et al.*, (2012), também observaram que as concentrações citadas anteriormente de auxinas e citocininas, também promoveram maiores teores de flavonoides (quercetina) ( $10,55 \pm 0,71$ ;  $18,98 \pm 1,98 \mu\text{g MS}^{-1}$  respectivamente) para os mesmos tratamentos em calos de Citrus.

A maior produção de carotenoides observada com sacarose, 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 2,5  $\mu\text{M}$  de ANA indicou que a produção desses compostos foi influenciada mais pelo tipo de açúcar utilizado. Os açúcares têm sido indicados para atuarem como mensageiros primários nos processos de transdução de sinais, onde a expressão de genes regulam muitos processos importantes (FOYER, *et al.*, 1997; LORETI *et al.*, 2005). Mas, ainda é desconhecido como o metabolismo dos carotenoides é regulado por açúcares. Zhang *et al.*, (2012), investigaram os mecanismos que regulam o acúmulo de carotenoides em um sistema de 3 variedades de cultura de Citrus (*Citrus unshiu* Marc.; *Citrus sinensis* Osbeck e *Citrus limon* Burm.f.) e observaram aumentos nas concentrações de carotenoides nos tratamentos cultivados com sacarose. Segundo os autores, ocorreram alterações na expressão de genes relacionados com o metabolismo dos carotenoides. O maior nível de expressão do gene CitPSY contribuiu para os aumentos nos teores de carotenoides nas amostras tratadas com sacarose das três variedades cítricas. Já em frutos de tomate, ocorreu um aumento na expressão do gene PSY, que também foi observado com o tratamento cultivado em sacarose (TELEF *et al.*, 2006).

Calos de segmentos cotiledonares, cultivados com glucose e com 5,0  $\mu\text{M}$  de BAP e 2,5  $\mu\text{M}$  de ANA apresentaram as maiores concentrações de clorofilas *a* e *b*. Os níveis de clorofila *b* foram similares aos observados quando os nós cotiledonares foram cultivados com 118 mM de sacarose, 2,73 mM de glutamina, 2,5 de BAP e 5 de

ANA, mas a concentração de clorofila a aumentou 60%, indicando a influência das concentrações de BAP e ANA sobre o metabolismo desses pigmentos.

A avaliação da atividade antioxidante de calos cultivados em diferentes fontes de carbono e concentrações de BAP e ANA revelou que calos cultivados com glicose com 5,0  $\mu\text{M}$  de BAP e 5,0  $\mu\text{M}$  de ANA apresentaram os maiores percentuais de inibição do radical DPPH•. Estes resultados mostraram, para esta fonte de carbono, que quanto maior foram as concentrações de BAP e ANA, maior foi a atividade antioxidante. Neste tratamento a porcentagem de atividade antioxidante foi maior, não coincidindo com os tratamentos que produziram os maiores níveis de fenólicos totais, que são potentes antioxidantes. É possível que ocorreram sinergismos com outros componentes que estão envolvidos em sistemas que combatem o estresse oxidativo (BARREIROS *et al.*, 2006). Um outro aspecto importante, verificado nestes experimentos, foi que porcentagens de inibição do radical DPPH acima de 70% também foram observadas com sacarose, mas estas respostas coincidiram com os níveis mais altos de fenólicos, flavonoides, carotenoides e clorofila b dos calos. Portanto, é possível que diferentes tipos de compostos, produzidos em diferentes fontes de carbono e com diferentes combinações de concentrações de BAP e ANA estejam atuando como antioxidantes.

Os resultados obtidos nestes experimentos também podem ser reflexo da natureza e do grau de diferenciação dos tecidos (TORRES *et al.*, 1999) e além dos fatores estudados, outros fatores inerentes ao material vegetal, como os fatores genéticos e o estado fisiológico da planta mãe doadora do explante podem influenciar a diferenciação e o metabolismo dos calos *in vitro* (GRATTAPAGLIA & MACHADO 1998, CALDAS *et al.*, 1990). Conforme Mantell (1994) e Pletsch (1998), a produtividade de metabólitos *in vitro* pode ser inferior ou superior, quando comparada a plantas inteiras. Calos de *Gomphrena globosa* (Amaranthaceae) possuem potencial para a produção de vários metabólitos *in vitro*, inclusive compostos não observados na planta mãe, (ANDRE *et al.*, 2003). É possível que a expressão diferencial de genes seja responsável por esta variação de respostas.

Os resultados dos experimentos sobre indução de calos a partir de diferentes explantes indicaram a influência do tipo de explante. Resultados semelhantes foram obtidos Yan *et al.*, (2009), que estudaram a calogênese a partir de placas basais de *Allium chinense*, onde, verificaram que segmentos de raiz, cultivadas em meio B5, apresentaram 14,7% de calogênese e segmentos de folha formaram a

menor quantidade de calos (0,4%). Soomro & Memon (2007) relataram que a indução de calos a partir de hipocótilos de *Jatropha curcas* chegou a 100%, enquanto que em folhas, a indução foi de apenas 40%. Os autores relataram também que os calos formados a partir de folhas eram verde escuro, compactos e nodulares, diferentemente dos calos formados a partir de hipocótilo, que eram verde claro e friáveis. Isto também foi observado no presente trabalho. Porcentagens de 100% de calogênese foram observadas em calos cultivados nas fontes de carbono, frutose e glucose, sendo que na sacarose esta taxa de indução pareceu ser inferior, chegando a 13,3 % em calos de folha, cultivados no escuro. O fato de apenas para a sacarose, em todas as combinações, terem sido observadas as menores taxas de indução de calos, indica a influência das fontes de carbono sobre o processo, demonstrando que na presença de glucose e frutose o processo de indução de calos pode ser otimizado. Para a cultura *in vitro*, as plantas perdem parcialmente o autotrofismo, e conseqüentemente, necessitam de uma fonte exógena de carboidratos. A eficiência da melhor fonte e concentração de carboidrato (carbono reduzido) depende principalmente da espécie vegetal (NICOLOSO *et al.*, 2003). Borkowska & Szczerba, (1991), observaram que os açúcares sacarose, glicose ou frutose favoreceram o crescimento de calos de *Prunus cerasus* L. quando as suas concentrações estavam entre 20 e 30 g.L<sup>-1</sup>; porém, na presença de frutose, a proliferação foi a mais baixa. A preferência pela glucose e frutose em relação à sacarose, como fonte de carbono, por algumas espécies e tecidos, pode estar relacionada à necessidade de as células excretarem a enzima invertase ao meio de cultivo, visando à hidrólise da sacarose antes da absorção da fonte de carbono (HEW & MAH, 1989). No presente trabalho com *Cedrela fissilis*, verificou-se que a melhor porcentagem de indução ocorreu com as fontes de carbono glucose e frutose, indicando que esta espécie pode apresentar dificuldades em absorver e/ou metabolizar a sacarose diretamente do meio de cultura ou também seus produtos de hidrólise como observado por (NICOLOSO *et al.*, 2003) em outros sistemas. Isto também foi observado por Pilatti, (2011), onde calos de cedro, cultivados na sacarose, apresentaram as menores porcentagens de calogênese, quando comparados com glucose e frutose.

No tratamento de folha, cultivado com sacarose e com a presença de luz não ocorreu formação de calo, isto pode ter sido devido a um efeito tóxico da glutamina. Quando o nitrogênio na forma de nitrato é adicionado ao meio de cultivo, a atividade da enzima nitrato redutase (RN) (ASLAN & OAKS, 1976; OAKS, 1992) e a quantidade da proteína-RN (SOMERS *et al.*, 1983) são aumentadas em diferentes

tecidos das folhas e raízes, embora Srivastava (1980), afirme que o efeito da forma de aplicação do nitrogênio na atividade da enzima nitrato redutase depende da espécie e do genótipo. Nas folhas, a atividade biossintética da glutamina sintetase (GS) e da glutamato sintase (ferredoxina- GOGAT) são fortemente reguladas pela luz (HIREL & GADAL, 1980) e por nitrogênio (SANTOS & SALEMA, 1992), embora o fornecimento diferencial de nitrato e amônio às plantas tenha revelado efeitos controversos, podendo ser negativo, positivo ou nulo (MIFLIN & LEA, 1977; MACK, 1995). Isto pode ser uma possível explicação pela baixa ou nula porcentagem de formação de calos oriundos de explantes de raiz e folha obtidas no presente trabalho. Gamborg (1970) mostrou que a adição de aminoácidos (glicina Max) ao meio de cultura para culturas em suspensão de soja, teve efeito inibitório total. Este estudo mostrou que a adição de aminoácidos em concentrações de milimolares tem efeito sensível ao cultivo e revelou que é uma característica generalizada de plantas superiores.

Através dos resultados obtidos no presente trabalho sobre as diferenças significativas no conteúdo de proteínas totais em calos de *Cedrela fissilis*, foi possível observar que com a fonte de carbono sacarose, calos de cotilédone, cultivados sem glutamina na luz, apresentaram os maiores conteúdos deste composto. O fornecimento, portanto, de sacarose poderia contribuir para suprir a demanda de átomos de carbono para a biossíntese destes compostos. Contudo, o fornecimento de glutamina poderia significar o aumento do aporte de nitrogênio, para a formação de aminoácidos e de proteínas, muitas destas enzimas, poderiam otimizar os mecanismos de biossíntese. Assim, poderíamos esperar que um aporte maior de átomos de carbono, pela concentração de sacarose e de nitrogênio, através do fornecimento de glutamina, poderiam otimizar a produção de proteínas totais, mas isto não aconteceu. Talvez, os átomos de nitrogênio, estejam sendo desviados para outras rotas metabólicas, que não a de biossíntese de proteínas totais.

A utilização de carboidratos em culturas de tecidos é essencial para sustentar o crescimento em culturas *in vitro*. Vários carboidratos podem ser utilizados, mas a sacarose é a fonte de carbono mais utilizada no meio de cultura e por isso pode ser otimizada (IRAQUI & TREMBLAY, 2001). Calos de cotilédone de *Senna spectabilis*, cultivados com 3% de sacarose, 10 ou 40 mg. L<sup>-1</sup> de 2,4-D, apresentaram maiores teores de proteínas solúveis (p<0,05) apresentando valores acima de 100 mg/g<sup>-1</sup> de massa seca (SADO, 2009). Sendo que esta autora, afirma que os teores de proteínas solúveis totais

foram expressivos nos calos de *Senna spectabilis*, quando comparados com o trabalho de Silveira *et al.*, (2004), em que o maior valor obtido pela quantificação de proteínas solúveis totais em cultura de suspensão celular de *Pinus taeda* L. foi de  $0,73 \text{ mg/g}^{-1}$  da massa fresca (estimando 10% deste valor para massa seca). Em culturas de calos de batata doce, explantes de folha e pecíolo forneceram maiores quantidades de proteínas em maiores concentrações de sacarose em 3% (HATTORI *et al.*, 1991). Satyavani *et al.*, (2011) desenvolveram um protocolo para regeneração de plântulas de *Citrullus colocynthis* *in vitro* e observaram que a regeneração de brotos foram superiores em concentrações de sacarose em 3%, que também foi melhor para produção de proteínas. O cultivo de calos pode ser uma alternativa para produção de proteínas continuamente e pode ser um sistema útil e importante para o estudo de sua regulação e biossíntese (PODDER *et al.*, 1993) e em estudos bioquímicos (SERRA *et al.*, 2000). Reguladores de crescimento têm um efeito importante sobre a produção de proteínas, um estudo mostrou que auxinas exógenas estimulam a síntese de RNA e proteínas, principalmente em cultura de tecidos (TEALE *et al.*, 2006) embora ainda não haja nenhuma informação sobre o mecanismo que ativa a síntese de tipos específicos de RNAs (MOHAMED *et al.*, 2011).

Vários trabalhos foram realizados com a utilização de explantes como cotilédones e segmentos inter-nodais para a produção de proteínas totais (BIONDI & THORPE, 1982). Explantes de cotilédones cultivados *in vitro* são muito úteis para estudos de acontecimentos fisiológicos e bioquímicos (THORPE, 1988). Estudos com caracterização da expressão de genes ao nível de síntese de proteínas em cotilédones de *Pinus radiata*, cultivados com a presença de citocininas, foi possível observar que com o desenvolvimento dos cotilédones, as mudanças observadas nos perfis, sendo selecionadas algumas categorias de proteínas, sendo que podem estar relacionadas com a capacidade dos cotilédones em formar ramos em seu processo de desenvolvimento *in vitro* (THOMPSON & THORPE, 1997). Observa-se também que ocorreu alto conteúdo de proteínas ( $12,76 \text{ } \mu\text{g/g MS}$ ) em calos de *Cedrela fissilis* originados a partir de calos de cotilédone cultivados na ausência de glutamina, na luz. Santos *et al.*, (2003), analisando calos de segmentos foliares de pinhão-manso, observaram que ocorreram constantes e baixos teores de proteínas durante o período de 84 dias de cultivo ( $0,04 \text{ mg/g MF}$ ). Estes resultados são contraditórios em relação aos observados Serra *et al.*, (2000), que detectaram grande acúmulo nos teores de proteínas em calos obtidos a partir de explantes foliares de castanheira-do-Brasil ( $6,5 \text{ } \mu\text{g/g MF}$ ). No entanto, este acúmulo de

proteínas, pode depender de espécie para espécie vegetal (PALMA *et al.*, 2011).

Alguns autores se contradizem em relação à adição de glutamina ao meio de cultivo para aumento de proteínas totais, pois para Zouine & Hadrami, (2007), analisando embriões somáticos de *Phoenix dactylifera L.* perceberam que a adição de glutamina no meio de cultivo aumenta a produção de embriões somáticos e estimula a síntese de proteínas. Lai *et al.*, (1992), estudando embriões somáticos de *Medicago sativa* também observaram que a glutamina tem um papel essencial na estimulação da síntese de proteínas. Já para Santos & Caldeira, (1999) afirmam que a adição de amônio em culturas de calos induz níveis baixos no conteúdo de proteínas solúveis totais.

Quanto ao conteúdo de açúcares solúveis totais, calos de cotilédone e nó foliar, cultivados sem glutamina e na presença de luz, apresentaram as maiores concentrações destes carboidratos. Estes resultados indicam que a otimização por estes tratamentos pode ser realizada, pois a sacarose ministrada ao meio de cultura tenha sido utilizada para o metabolismo celular (SERRA *et al.*, 2000). A determinação de açúcares solúveis totais permite determinar as fases de desenvolvimento celular que podem fornecer maior produção de compostos celulares específicos (SERRA, 1999). Açúcares funcionam como dispositivos para armazenagem de energia, como um componente importante de suporte mecânico aos tecidos ou também como fornecedores de esqueletos de carbono orgânico para sintetizar compostos através das células (SERRA *et al.*, 2000). Além disso, a determinação dos níveis de açúcares tem aplicações em vários estudos fisiológicos, pois revela níveis de reserva prontamente disponíveis para o crescimento (PASSOS, 1996). Quanto ao conteúdo de açúcares solúveis totais, observados no presente estudo, sugere-se que as células em crescimento acumularam estes altos teores de açúcares para auxiliar o crescimento ao longo do período de cultivo *in vitro*. Sado, (2009) quantificou o teor de açúcares solúveis totais em calos de *Senna spectabilis* e verificou concentrações superiores a 200 mg/g<sup>-1</sup> de massa seca em açúcares solúveis totais. A condição de cultura *in vitro* é considerada estressante, pelas altas concentrações de sais nos meios de cultura, espaço restrito e alta umidade (POSPOŠILOVA *et al.*, 1999). Segundo Thompson *et al.*, (2008) plantas sob estresse produzem quantidades adequadas de assimilados para dar suporte ao crescimento, porém acumulam grandes quantidades de sacarose nos tecidos imediatamente após o estresse além do papel da sacarose como agente

regulador da osmolaridade intracelular, evita a perda excessiva de água pelos tecidos vegetais.

Vários trabalhos evidenciam a determinação de açúcares solúveis totais através do período de cultivo dos calos, sendo relacionado ao crescimento destes. Abbade *et al.*, (2010) analisaram calos oriundos de folhas de Ipê-branco quanto ao seu crescimento e conteúdo de açúcares solúveis totais, onde verificaram valores maiores ao primeiro dia de inoculação até aos 45 dias de cultivo, sendo que após isso, ocorreu um decréscimo de açúcares solúveis. De acordo com Lima *et al.*, (2007), os açúcares contidos nas folhas da planta mãe, a partir do qual são derivados os explantes é onde se origina este aumento inicial, sendo mais tarde suprida, através da demanda metabólica para o crescimento dos calos. Azevedo (2003), também observou este mesmo fato com calos oriundos de folhas de copaíba. No presente trabalho, não foram realizadas curvas de crescimento e o conteúdo de açúcares solúveis totais, conforme o período de cultivo, pois o objetivo deste não era verificar o quanto de açúcares continha no período de crescimento, mas sim, determinar quanto deste existira em diferentes tratamentos, sendo que foram analisados após 8 semanas de cultivo, ou seja, mais ou menos 60 dias, obtendo resultados satisfatórios.

Na análise de amido verificou-se correlação entre açúcares solúveis totais e o amido (análise de correlação  $R^2 = 0,88$ ;  $p \leq 0,05$ ), pois, de uma maneira geral, os calos oriundos dos mesmos explantes que obtiveram maiores teores de açúcares solúveis totais, foram para o conteúdo de amido. Uma possível explicação para tal é que nas plantas, sacarose e amido são assimilados pelas folhas, sendo produtos finais de duas rotas gliconeogênicas fisicamente separadas: sacarose no citosol e amido nos cloroplastos. Sob iluminação, o dissacarídeo sacarose é continuamente exportado do citosol foliar para as partes não fotossintetizantes da planta, enquanto o polissacarídeo amido simultaneamente acumula-se como grãos nos cloroplastos. O escurecimento não somente cessa a assimilação de carbono, mas também dá início a degradação de amido dos cloroplastos para manter a exportação da sacarose (TAIZ & ZEIGER, 2009). Este fato não está de acordo com os resultados do presente trabalho, pois calos de folha, cotilédone e raiz cultivados na frutose e na glicose sem a presença de glutamina no escuro apresentaram concentrações significativas de amido, indicando possíveis ativações de outras rotas metabólicas para a produção destes compostos.

A regulação do crescimento pela luz e açúcares garante a utilização ótima dos recursos de carbono e energia nos tecidos



exportadores e importadores de carboidratos. Além disso, esse tipo de controle leva a adaptação do metabolismo de carbono a alterações das condições ambientais e a disponibilidade de outros nutrientes. Em geral, um baixo *status* de açúcar melhora a fotossíntese, a mobilização de reservas e a exportação, enquanto açúcar em abundância promove o crescimento e a estocagem de carboidratos. Em se tratando de culturas de calos, as células possuem o potencial para fotossíntese *in vitro*, mas o crescimento da maioria das culturas é sustentado pela fonte de carboidratos adicionados ao meio. Ao mesmo tempo, reconhece-se que a presença de carboidratos no meio inibe a síntese de clorofila e, portanto, reduz a capacidade fotossintética das culturas (EDELMAN & HANSON, 1971; YAMADA & SATO, 1978). Os carboidratos fornecem energia metabólica e esqueletos carbônicos para a biossíntese de aminoácidos e proteínas, polissacarídeos estruturais como celulose, enfim, todos os compostos orgânicos necessários para o crescimento das células. Portanto, ao que tudo indica acúmulo de açúcares se dá acúmulo de carboidratos de reserva, o amido, como observado no presente estudo.

Vários trabalhos utilizaram a sacarose como fonte de carbono, pois esta é a melhor fonte de carbono para induzir polissacarídeos (ROSS *et al.*, 1994). A sacarose é uma fonte de carbono importante para o armazenamento de hexoses e síntese de polissacarídeos, após a sua hidrólise, papel efetuado pelas enzimas sacarose sintase ou sacarose invertase. Esta hidrólise é efetuada no citosol por enzimas invertases solúveis, moléculas ácidas ou básicas que são capazes de fornecer hexoses, substratos principais para a síntese de estruturas de armazenamento e polissacarídeos (ROSS *et al.*, 1994; VAN DEN ENDE *et al.*, 1995). Diferentes autores têm relatado a presença de amido em células vegetais, cultivadas *in vitro* (SWARNKAR *et al.*, 1986; MANGAT *et al.*, 1990; BRANCA *et al.*, 1994). O possível papel deste polissacarídeo parece ser incerto ainda nos processos de desenvolvimento *in vitro*, mas têm se sugerido que o amido pode atuar como fonte de energia ou como agente osmótico essencial ao desenvolvimento (STAMP, 1997). Trabalhos com a determinação de amido em células vegetais *in vitro* foram realizados, culturas de calos embriogênicos e não embriogênicos de *Medicago arborea L.* foram investigados a fim de saber o conteúdo de amido, onde perceberam que calos não embriogênicos cultivados em meio MS, foram os que apresentaram maiores teores deste composto (MARTIN *et al.*, 2000). Kitahara *et al.*, (2002), analisaram calos de batata-doce e perceberam que a partir de 1 semana, o conteúdo de amido aumentou para 10,6% do

total de peso seco dos calos, sendo que em 4 semanas este composto aumentou significativamente. Marafon *et al.*, (2007), analisaram o conteúdo de amido em gemas de pessegueiro (*Prunus pérsica L.*) e observaram que durante a dormência, a gema possui baixa capacidade mobilizadora para assimilados e nutrientes minerais, aumentando a hidrólise de amido e a síntese de sacarose como forma de proteção ao frio e que, no período de saída da dormência, a gema se torna um dreno metabólico preferencial, acumulando reservas (sorbitol e amido) por meio de transporte ativo, as quais seriam metabolizadas, induzindo o rompimento da gema, este fato de uma certa forma, pode explicar o resultado do presente trabalho, onde foi observada maior acúmulo de amido em calos oriundos de nó foliar.

Os flavonoides constituem a maior classe de fenólicos vegetais. Os flavonoides são classificados em grupos diferentes, pelo grau de oxidação da cadeia de três carbonos. Eles abrangem as antocianinas, os flavonóis, as flavonas e as isoflavonas (TAIZ & ZEIGER, 2009). Estão presentes em todas as plantas vasculares, estando distribuídos principalmente nas partes aéreas dos vegetais, como as folhas e em quantidades variadas (HARBORNE, 1984; ABDALA, 1999). No presente estudo, calos de cotilédone, cultivados na sacarose, com a suplementação de glutamina e na luz apresentaram as maiores concentrações de flavonoides e de fenólicos totais. Foi observado que o acúmulo destes compostos pode ter sido provocado pela adição de glutamina ao meio de cultura.

Este maior acúmulo de fenólicos em calos de cotilédone e folha cultivados com sacarose pode estar ligado à presença da enzima fenilalanina amônia liase (PAL, *phenylalanine ammonia lyase*) A atividade desta enzima é aumentada, quando os níveis de nutrientes e luz (pelo seu efeito no fitocromo) são baixos e pela infecção por fungos (TAIZ & ZEIGER, 2009). Pelos dados no presente estudo, calos cultivados com sacarose, glutamina e luz dispuseram dos fatores essenciais para a ativação da enzima PAL. Além disso, um estudo feito com cotilédones de *Caesalpinia peltophoroides* foi observado por testes histoquímicos, grandes cavidades secretoras, distribuídas pelos cotilédones e grandes acúmulos de compostos fenólicos (CORTE, 2005). Talvez calos oriundos de cotilédone, tenham maior potencial para produzir estes compostos. Trabalhos utilizando cultura de calos foram realizados a fim de avaliar o conteúdo de compostos fenólicos (TRAUTMANN & VISSER, 1989; SCOCCIANI *et al.*, 2000). Em culturas de plantas lenhosas, é comum a ocorrência de compostos fenólicos, que podem estar ligados a processos de regulação de

crescimento, especialmente as auxinas que, dependendo da concentração endógena no tecido, induzem à síntese desses compostos. Nas plantas lenhosas, sobretudo, acumulam-se polifenóis e produtos de oxidação, como melanina, suberina, lignina, cutina e calose em torno da superfície incisada, os quais modificam a composição do meio de cultivo e a absorção de metabólitos (ANDRADE *et al.*, 2000).

Chandler & Dodds, (1983), observaram que a adição de sacarose e concentrações baixas de nitrogênio para o cultivo de calos de folhas de *Solanum laciniatum* aumentou as concentrações de compostos fenólicos e observaram ainda que estes calos apresentaram tamanhos menores, ou seja, redução significativa no crescimento e no peso fresco final. Portanto, a adição de sacarose ao meio de cultivo, pode ser um indício de maior disponibilidade de carbono e sendo assim, maior formação de produto secundário, embora este aumento seja inversamente proporcional com o crescimento dos calos. Outro fator que pode estar relacionado com a produção de compostos fenólicos é o tipo de explante e as condições de luminosidade, como por exemplo, calos de folha de *Solanum laciniatum* responderam muito mais com a produção de fenólicos, principalmente em condições de luminosidade específicas. Moumou *et al.*, (1992), analisando calos de hipocótilo de *Fagopyrum esculentum*, observaram que os calos cultivados com sacarose, tanto na luz, quanto no escuro, apresentaram concentrações de catequinas (tipo de compostos fenólicos), mas que em condições de luz, apresentaram em maiores quantidades.

No presente trabalho, foi possível observar que calos oriundos de folha, cultivados com sacarose e sem glutamina foram os que apresentaram maiores quantidades de carotenoides. A captação da luz é realizada por receptores de luz (pigmentos) que estão inseridos na folha, por isso que no presente trabalho, as análises foram realizadas somente para calos cultivados na luz. Nas plantas, os pigmentos fotossintéticos são clorofilas e carotenoides, as clorofilas refletem a luz verde enquanto que os carotenoides refletem as luzes amarela e laranja. Esses pigmentos estão associados a proteínas que compõem dois dos complexos protéicos inseridos nas membranas dos tilacóides dos cloroplastos: o fotossistema I e o fotossistema II, formando uma antena coletora de luz ao redor dos fotossistemas. As clorofilas absorvem luz principalmente na faixa do azul e do vermelho, enquanto os carotenoides absorvem luz na faixa do azul (PAULILO *et al.*, 2010). Além disso, os carotenoides desempenham um importante papel na nutrição e na saúde humana, como a principal fonte de pró-vitamina A (COMBS, 1998) e na redução de incidência de certas doenças (GIOVANNUCCI, 1999; KRINSKY *et*

al., 2003). Trabalhos realizados com culturas de calos para a quantificação de carotenoides totais revelou que calos de *Cleome rosea* cultivados em meio MS, com 30 g.L de sacarose e com 0,2 mg. L<sup>-1</sup> de 2,4-D aos 60 dias de cultivo apresentou 3,45 ± 0,01 µg. g MS de carotenoides totais. Já calos cultivados nas mesmas condições, mas cultivados por período de 90 dias revelaram 4,70 ± 1,30 µg.g MS de carotenoides totais (ROCHA, 2012), sendo que a autora afirma que estas concentrações foram eficientes para a otimização da produção dessas substâncias. No presente estudo foram detectados nível de carotenoides superior de 5,62 µg.g MS em calos de *Cedrela fissilis* originados de folhas e cultivados com glicose.

Outro fator que a autora verificou foi a manutenção das culturas na presença de luz influenciar de forma positiva o crescimento dos calos. A influência da luz sob indução e eficiência do processo calogênico já foi reportado em alguns estudos. Uma maior produção de massa calogênica foi alcançada por culturas de *Stryphnedendron adstringens* (barbatimão) mantidas em meio MS suplementado com 2,4-D e na presença de luz quando comparado a culturas mantidas no escuro (CASTRO *et al.*, 2009). Resultados similares foram alcançados em culturas de calos de *Oryza sativa* (AFRASIAB & JAFAR, 2011). Entretanto, sabe-se que a luz tem grande influência na mediação da regulação da biossíntese dos carotenoides, influenciando a expressão gênica (BRAMLEY, 2002; SIMKIN *et al.*, 2003; PIZZARO & STANGE, 2009).

Dos calos analisados de *Cedrela fissilis* a partir de CLAE, foi possível observar que a luteína foi o componente majoritário. Depois desta, apresentou-se o isômero trans-do β-caroteno e a xantofila zeaxantina. Assim como o β-caroteno, luteína e zeaxantina também desempenham o papel de fotoprotetores e estão envolvidos na dissipação térmica do excesso de energia (GARCIA-PLAZAOLA *et al.*, 2003). Calos oriundos de folha de *Kalanchoë crenata* obtiveram maiores concentrações de luteína e β-caroteno, do que os outros tipos de carotenoides cultivados na luz (STOBART *et al.*, 1967). Davey *et al.*, (1971), analisando calos de folha e extratos de folhas de *Atropa belladonna*, verificaram que os níveis de carotenoides eram menores nos calos do que em extratos somente de folhas, mas que nos calos continha maiores conteúdos de luteína e β-caroteno.

Quando avaliada a atividade antioxidante entre os tratamentos de calos de *Cedrela fissilis*, não foi possível observar uma correlação entre a porcentagem de inibição do radical livre DPPH• e as concentrações de compostos fenólicos totais e os carotenoides. Os compostos fenólicos

são potentes antioxidantes, o que se deve principalmente à sua estrutura química e suas propriedades redutoras. Estas características fazem com que desempenhem um papel importante na neutralização ou sequestro dos radicais livres, agindo no oxigênio singlete, atuando nas oxidações lipídicas, e quelação de metais de transição (SATUÉ-GARCIA *et al.*, 1997; HOPIA & HEINONEM, 1999), agindo tanto na etapa de iniciação como na desenvolvimento do processo oxidativo (SOARES, 2002; HASLAM, 1996; CHUN *et al.*, 2005). Pelos dados analisados, os tratamentos que apresentaram maiores inibições do radical livre DPPH• mais de 80% foram os calos de folha cultivados na sacarose, sem a suplementação de glutamina e no escuro. Para o conteúdo de compostos fenólicos, calos de cotilédone, cultivados na sacarose, com glutamina e luz apresentaram as maiores concentrações deste composto e calos de folha, cultivados sem glutamina e luz apresentaram os maiores teores de carotenoides, sendo que os tratamentos não casaram e este fato pode acontecer, pois nos extratos podem ocorrer sinergismos com outros componentes que estão envolvidos em sistemas que combatem o estresse oxidativo (BARREIROS *et al.*, 2006), acarretando talvez, na síntese de outras substâncias que desempenhem papel antioxidante. Há, portanto, a necessidade de investigações mais aprofundadas, sobre a razão de alguns tratamentos apresentaram uma alta porcentagem de inibição do radical DPPH• e outros apresentarem baixos teores de compostos fenólicos e carotenoides, ou vice-versa.

A fonte de carbono frutose induziu maiores concentrações de proteínas totais e compostos fenólicos totais em calos de nó cotiledonar, cultivados sem glutamina e no escuro e para açúcares solúveis totais foram calos de raiz, cultivados sem glutamina e no escuro. Isso mostra que a fonte de carbono, o tipo de explante e as condições de escuro interferem no acúmulo destes compostos. Estes dados corroboram com Santos *et al.*, (2008) avaliaram as concentrações de proteínas totais e verificaram maiores teores em calos de segmentos nodais (0,13 mg . g<sup>-1</sup> de MF). Estudos recentes demonstraram que o polissacarídeo ácido de *Chorisia speciosa*, é capaz de induzir atividade de proteínas, além de induzir acúmulo de compostos fenólicos em cultura de células de *Rubus Fruticosus*, sendo que existe relação entre proteínas e compostos fenólicos (SOUZA, 2005). Por calos de nó cotiledonar apresentar maiores conteúdos de proteínas e compostos fenólicos se deva pela mesma adição de fonte de carbono, frutose e talvez pela afinidade entre proteínas e fenólicos. Segundo, Arnaldos *et al.*, (2001) compostos fenólicos combinam-se reversivelmente com proteínas por pontes de hidrogênio e irreversivelmente por oxidação seguida por condensação

covalente. Calos de segmentos foliares de aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva*), cultivadas em meio MS, com 3% de frutose, e 4,52  $\mu\text{M}$  de 2,4-D, revelou 3, 157  $\text{mg.g MF}^{-1}$  de proteínas totais e de 0,914  $\text{mg.g MF}^{-1}$  (VASCONCELOS *et al.*, 2012).

Calos de raiz, cultivados com frutose sem glutamina e no escuro apresentaram as maiores concentrações de açúcares solúveis totais, este fato também foram observadas para a fonte de carbono glucose, talvez pelo fato das raízes serem órgãos que tenham maior potencial para acumularem altos teores de açúcares.

Calos de folha, cultivados na frutose sem glutamina e luz apresentaram maiores conteúdos de amido, clorofilas *a* e *b* e flavonoides. Bobák *et al.* (2004) e Nakamura (1994), estudando células de calos de folhas de *Drosera spathulata* e embriões somáticos de *Coffea arabica* cvs. Mundo Novo e Catuaí Amarelo, respectivamente, através da MET (microscopia eletrônica de transmissão) encontraram plastídios cheios de amido. Grãos de amido também foram observados em células embriogênicas de calos de *Gentiana punctata* por Mikula *et al.*, (2004), relacionando este padrão bioquímico como fonte primária de energia necessária para a intensa divisão celular. Quanto ao conteúdo de clorofilas *a* e *b*, calos de cenouras, cultivados em 3% de frutose, apresentaram 33  $\mu\text{g/g MF}^{-1}$  de clorofilas totais, sendo que estes dados segundos os autores, são intermediários em relação ao conteúdo de clorofilas totais de calos cultivados na sacarose que apresentaram 18,1  $\mu\text{g/g MF}^{-1}$  e na glucose 36,3  $\mu\text{g/g MF}^{-1}$  de clorofilas totais (EDELMAN & HANSON, 1971). Estes dados corroboram com o presente trabalho, pois calos de folha, cultivados na frutose sem glutamina e luz apresentaram valores intermediários de clorofilas *a* e *b*, enquanto que calos de folha na glucose apresentaram níveis maiores. Já a sacarose apresentou valores menores de clorofila *a* e *b*. Quanto ao conteúdo de flavonoides, análises fitoquímicas de extratos de folhas, raízes e cascas de *Melia azedarach L*, planta da mesma família do presente trabalho, revelaram a presença de taninos e flavonoides (KHAN *et al.*, 2001). Extratos aquosos de folhas de *Toona sinensis* (Meliaceae), foram extraídas alguns tipos de fitoquímicos, como flavonoides, limonóides, cumarinas entre outros, além disso, os compostos fenólicos podem ter uma significativa contribuição para a capacidade antioxidante (LUO *et al.*, 2001; CHENG *et al.*, 2009). A luz influenciou o teor de flavonoides, pois estes são desencadeados principalmente em condições de estresse por UV-B, então é possível maior síntese destes compostos nestas condições.

A fonte de carbono glucose induziu maiores concentrações de proteínas totais e flavonoides em calos de cotilédone, cultivados com glutamina, na luz. Segundo George, (1996), a presença de nitrogênio no meio de cultura resulta no aumento da síntese de aminoácidos e proteínas, os quais são produzidos utilizando-se energia liberada no catabolismo dos carboidratos. O fornecimento, portanto, de glucose poderia contribuir para suprir a demanda de átomos de carbono para a biossíntese destes compostos. Por outro lado, o fornecimento de glutamina, neste caso, poderia significar o aumento do aporte de nitrogênio, para a formação de aminoácidos e de proteínas, muitas destas enzimas, poderiam otimizar os mecanismos de biossíntese. Laukkanen *et al.*, (1997) estudaram o efeito de duas diferentes fontes de nitrogênio, em culturas de calos de *Pinus sylvestris*, em meio MS modificado e observaram que o crescimento dos calos foi baixo no meio de cultura que continha somente nitrato, porém os calos cultivados neste tratamento, exibiram uma intensificação em seu metabolismo, principalmente em relação à síntese de proteínas.

Quanto ao conteúdo de flavonoides totais, calos de folha e cotilédone cultivados com glutamina e luz apresentaram as maiores concentrações deste composto. Como explicado anteriormente, a glutamina pode ter influenciado no acúmulo destes compostos. Outro fator que pode ser observado é a manipulação e o tipo de fonte de carbono utilizada, pois dependendo desta, pode ser um indicativo de eficiência ou não no processo de metabolização de enzimas e síntese destes compostos. Calos de *Hypericum perforatum*, var. cultivados em glucose e meio MS com 4,5  $\mu\text{M}$  de ANA e 2,3  $\mu\text{M}$  de BAP apresentaram teores de flavonoides de  $95 \pm 39 \mu\text{g. g de MS}$ , sendo que os autores afirmam que esta concentração é baixa em relação aos teores de flavonoides encontrados em plantas *in vivo* (70 mg.g de MS) (DIAS *et al.*, 1998). Com relação ao presente trabalho, a maior concentração de flavonoides em calos cultivados com glucose foi de  $0,89 \pm 0,01 \mu\text{g/g MS}$ , este valor pode ser considerado baixo, quando comparado ao trabalho de Dias *et al.*, (1998). Os autores também afirmam que flavonoides têm relação quanto à proteção da radiação UV em plantas e alegam que flavonoides agem como filtros solares em relação às folhas e cotilédones das plantas. É possível que o ambiente com intensidade luminosa incidente em que calos de *Cedrela fissilis* ficaram expostos, possam ter influenciado no acúmulo destes flavonoides.

Os teores de açúcares solúveis totais e amido foram maiores em calos de raiz cultivados sem glutamina e no escuro. Os níveis de açúcares solúveis e amido nas células vegetais podem variar bastante em

função do ambiente em que se encontram. As raízes são fontes de reserva e contêm altas concentrações de carboidratos e amido (SCHAFFNER *et al.*, 1995), por este fato, calos oriundos destes tecidos poderiam contribuir no maior acúmulo de açúcares e amido. Trabalhos com plantas de *Veratrum album* relataram maiores biomassas e teores de açúcares e amido nas raízes e nos hipocótilos (KLEIJN *et al.*, 2005). Silveira *et al.* (2004) em cultura de suspensão de células de *Pinus taeda*, ocorreu a maior concentração de amido de 15,53 mg g<sup>-1</sup> massa fresca (estimando 10% deste valor para massa seca). Concentrações de amido a partir de calos friáveis e nodulares de *S. spectabilis* cultivados sob o tratamento 10 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D apresentaram 35 mg.g MS<sup>-1</sup> de amido, sendo que os autores inferiram esta quantidade de amido pela síntese da fonte de carbono adicionada ao meio de cultura.

Calos de folha e raiz, cultivados na glucose, sem glutamina e no escuro apresentaram as maiores concentrações de compostos fenólicos totais. Pelo fato de calos de raiz apresentaram maiores teores deste composto é que os fenólicos estão entre as mais difundidas classes de metabólitos secundários, sendo conhecido pela sua grande importância no sistema solo-planta. A maioria dos estudos relaciona esses compostos com estresse metabólico, parede celular e exsudados de raízes e sementes, funcionam como moléculas sinais e atuam como compostos alelopáticos, sendo componentes estruturais e funcionais da matéria orgânica do solo (SIQUEIRA, *et al.*, 1991). Os compostos fenólicos estão presentes em todos os tecidos, possuindo grande importância no desenvolvimento da planta, mas tem se destacado o envolvimento de compostos fenólicos em processos como a rizogênese, vitrificação, resistências a estresses bióticos e abióticos e reações redox em solos, sendo também componentes funcionais da rizosfera e a matéria orgânica do solo (MAKOI & NDAKIDEMI, 2007). Os teores de fenóis nas raízes foram maiores em calos de Camomila (*Matricaria recutita* L.) cultivadas *in vitro* se comparados com os teores encontrados nas plantas do campo. Segundos os autores, esses resultados demonstram que os calos oriundos de raízes são boa fonte de compostos fenólicos e que seriam indicados para estudos mais aprofundados nestes órgãos (TAVANO *et al.*, 2009). Por este motivo, calos de raízes, cultivados na glucose, possam ter influenciado as moléculas a ativar a enzima fenilalanina amônia liase no acúmulo destes compostos. O escuro pode ter influenciado no fato de as culturas estarem acondicionados por um processo de desdiferenciação mais lenta, do que as da luz, por isso, podem ter acumulado estes compostos. Além disso, a síntese de compostos fenólicos se dá a partir da radiação ultravioleta (condição de



estresse), onde os calos não estavam condicionados a este tipo de ambiente. Em muitas espécies vegetais, a regulação da atividade da PAL torna-se mais complexa pela existência de múltiplos genes que codificam esta enzima, alguns dos quais são expressos somente em tecidos específicos ou sob certas condições de ambiente (LOGEMANN *et al.*, 1995). A glutamina não é a precursora direta dos compostos fenólicos, e, portanto, a adição deste nitrogênio ao meio de cultivo, pode não ter estimulado as rotas metabólicas do ácido chiquímico a promoverem teores relevantes de fenólicos totais.

No presente trabalho, foi possível observar que calos oriundos de folha, com glutamina e luz apresentaram as maiores concentrações de carotenoides, clorofilas *a* e *b* e flavonoides. Para uma produção considerável de carotenoides é recomendada a utilização de glucose como fonte de carbono (VALDUGA *et al.*, 2009). O uso de glucose no meio de cultivo pode levar a uma maior eficiência na produção específica em carotenoides (1,00 µg/g de massa seca) por *Rhodotorula sp.* (BUZZINI & MARTINI, 2000). Os calos cultivados com glutamina podem estar acondicionados por estresse, levando a um incremento na atividade das enzimas glutamina sintase (ROOSENS *et al.*, 1998; VIÉGAS & SILVEIRA, 1999) e glutamato sintase (BERTELI, 1995), envolvidas na assimilação do íon amônio. A capacidade de incorporar íon amônio em condições de estresse seja osmótico (FLORES & GALSTON, 1982), salino (LOVATT, 1990) ou nutricional (RABE & LOVATT, 1986) pode representar um mecanismo homeostático importante frente a condições de estresse em vegetais (CAMARA *et al.*, 2000).

As clorofilas são pigmentos fundamentais para a sobrevivência vegetal, responsáveis pela cor verde característica da maioria das plantas terrestres e também pela captação de radiação solar, que durante o processo de fotossíntese, é convertida em energia química redutora na forma de ATP e NADPH. A clorofila *a* está presente em todos os organismos que realizam fotossíntese oxigênica, participando do primeiro estágio do processo de fotossíntese, que envolve a conversão da energia luminosa em energia química, enquanto os demais pigmentos fotossintetizantes participam da absorção de luz e da transferência de energia radiante para os centros de reação, sendo chamados de pigmentos acessórios, como as clorofilas *b*, *c*, *d* e os carotenoides (STREIT *et al.* 2005). A energia absorvida pelos diferentes pigmentos pode ser transferida para a clorofila *a* durante o processo de fotossíntese e ainda, os carotenoides têm a função de proteger as moléculas de clorofilas contra a foto-oxidação sob irradiância intensa (DUARTE,

2003). A maioria das plantas contém aproximadamente de duas a três vezes mais clorofila *a* do que clorofila *b*, presentes nas folhas de plantas vasculares e nas algas verdes (TAIZ & ZEIGER, 2010). Sabe-se que a sacarose reduz a formação de clorofila em culturas celulares e acredita-se que isso decorre da inibição da atividade da enzima ALA-sintase, responsável pela síntese do ácido 5-aminolevulínico, precursor das moléculas de porfirina, que compõe a clorofila (GEORGE *et al.*, 2008). Calos de cenouras, cultivados em 3% de sacarose, e glucose, apresentaram na sacarose 18,1  $\mu\text{g/g MF}^{-1}$  e na glucose 36,3  $\mu\text{g/g MF}^{-1}$  de clorofilas totais (EDELMAN & HANSON, 1971). Os autores afirmam que este resultado ocorreu pela alteração do número e morfologia dos cloroplastos, pois a morfologia aberrante do cloroplasto visualizada por eles na presença de sacarose, explicaria a baixa taxa fotossintética com base do teor de clorofila presente nestes calos. Eles também observaram uma redução no teor de carotenoides em calos crescidos na sacarose, quando comparado com calos crescidos na glucose. Estes resultados corroboram com os resultados obtidos no presente trabalho, onde calos de folha cultivados na glucose apresentaram maiores concentrações de clorofilas *a* e *b*. Quanto à capacidade antioxidante dos calos cultivados com glucose, calos de folha e raiz, cultivados com glutamina no escuro apresentaram as maiores atividades antioxidantes, sendo que estes tratamentos não se relacionaram com maiores conteúdos de fenólicos e carotenoides totais, indicando que outros tipos de compostos sintetizados no escuro seriam responsáveis pela atividade antioxidante dos extratos.

Diante do exposto a produção de proteínas totais foi otimizada em calos de cotilédone de *Cedrela fissilis*, cultivados com sacarose, sem glutamina e na luz. Açúcares solúveis totais foram otimizados a partir de calos de nó foliar e cotilédone, cultivados com sacarose, sem glutamina e luz e a produção de amido foi otimizada em calos de nó foliar, cultivados sem glutamina e na luz. A produção de fenólicos totais foi otimizada em calos de cotilédone, cultivados com sacarose, com glutamina e luz e a de carotenoides foi otimizada em calos de folha, cultivados com glucose, com glutamina e luz. Clorofilas *a* e *b* foram otimizadas a partir de calos de folha, cultivados com glucose, com glutamina e luz e flavonoides foram otimizados em calos de folha, cultivados com frutose, sem glutamina e luz. A atividade antioxidante dos extratos de calos foi otimizada (porcentagens acima de 70% de inibição do radical DPPH) no tratamento com sacarose, em todos os explantes, exceto em calos originados de nó cotiledonar, nó foliar e hipocótilo, cultivados na luz, com glutamina. Nos tratamentos com

frutose, apenas em calos de folha cotilédone e raiz as porcentagens de inibição do radical DPPH foram superiores a 70% e com glucose, este valor foi observado para calos de folha e raiz apenas.

A espectroscopia de varredura em UV-vis mostrou ser uma ferramenta extremamente útil na identificação das classes de metabólitos secundários majoritárias nas culturas, auxiliando no direcionamento das análises de quantificação dos metabólitos que foram realizadas posteriormente. A identificação das diferentes classes de compostos secundários através das regiões de absorbância foi feita com base em Harborne, (1998).

Os espectros apresentaram a formação de uma grande banda da região de comprimento de onda entre 300 – 480 nm, onde ocorre a absorção da luz UV por compostos fenólicos, carotenoides e flavonoides. Os tratamentos que apresentaram maior absorbância nessa região foram de calos oriundos de cotilédone e folha, crescidos em meio de cultura contendo glucose e suplementados com 2,73 mM de glutamina e calos de folha, cultivados na frutose e suplementado com 2,73 mM de glutamina. As dosagens de fenólicos totais, carotenoides e flavonoides confirmaram a presença desses compostos nos calos.

Picos de absorbância na região de absorção da clorofila (659 – 670 nm) também puderam ser identificados claramente, e a comparação entre os valores de absorbância dos tratamentos corroboraram com os conteúdos de clorofila dosados posteriormente. Nos espectros foi possível identificar também picos de absorbância referentes aos carotenoides (450 – 480 nm), antocianinas (530 – 540 nm) e citocromos (605 – 614 nm). Embora estes compostos não tenham sido dosados por metodologias mais específicas e precisas neste trabalho, fazê-lo se mostra importante para a composição mais precisa do perfil de metabólitos secundários produzidos pelos calos nos diferentes tratamentos. Estes dados também corroboram com Pilatti, (2011) que analisou calos de segmentos nodais cotiledonares cultivados em meio de cultura MS, semi-sólido, suplementado com 118 mM de glucose, sacarose ou frutose, 0 ou 2,73 mM de glutamina, 2,5 µM de BAP e 5 µM de ANA, e de calos iniciados a partir de segmentos cotiledonares e hipocótilo cultivados em meio de cultura MS, semi-sólido, suplementado com 118 mM de frutose, 2,5 µM de BAP e 5 µM de ANA e verificou os mesmos perfis metabólicos, analisados pelo presente trabalho.

A fim de avaliar e observar algumas estruturas de calos de *Cedrela fissilis*, foram escolhidos os sete tipos de calos oriundos de raiz, hipocótilo, nó cotiledonar, folha, epicótilo, nó foliar e cotilédone

cultivados na glucose, com a presença da glutamina na luz e no escuro. Quando os calos foram corados com Azul de Toluidina (AT-O), as paredes celulares apresentaram leve reação metacromática, produzindo uma coloração violácea. A coloração é produzida por polissacarídeos com grupo carboxil e sulfatados se corados com pH 4.4; em pH com valor igual ou menor que 1.0 somente os grupos sulfatos têm carga elétrica e resultam em metacromasia (McCULLY, 1968). Esta reação indica a presença de polissacarídeos ácidos na parede celulares dos calos de *C. fissilis*. Também em algumas células foram observados inúmeros grânulos que reagiram ortocromaticamente à coloração, onde, possivelmente podem indicar presença de compostos fenólicos. No presente trabalho, foi analisada bioquimicamente a presença de compostos fenólicos totais, resultando que há a presença destes compostos, corroborando com os resultados observados na histoquímica com AT-O. Os mesmos resultados foram observados por Pilatti, (2011), que avaliou calos de segmentos nodais cotiledonares de *Cedrela fissilis*, cultivados com 118 mM de frutose e glucose sem a adição de glutamina, e calos cultivados com 118 mM de glucose e com suplementação de 2,73mM de glutamina, somente na luz, onde, observou ocorrência de uma leve reação metacromática, indicando uma pequena concentração de polissacarídeos ácidos nas paredes celulares. Além disso, o citoplasma destas células apresentou reação ortocromática e presença de muitos grânulos ortocromáticos.

A reação de PAS é utilizada para a identificação de polissacarídeos neutros, porque requer a presença de grupos 1.2-glicol que são oxidados para aldeídos pelo ácido periódico (TRICK & PUESHEL, 1990). A parede celular das células dos calos analisados reagiu positivamente a esta coloração, devido à presença de celulose em sua constituição. No citoplasma foi possível verificar a presença de poucos grãos de amido. A quantidade total de polissacarídeos da parede celular é alta nos calos. A reação do ácido periódico ocorreu também no citoplasma das células, corando grânulos de amido (NARAYANASWAMY, 1994). Bobák *et al.*, (2004) e Nakamura, (1994), estudando células de calos de *Drosera spathulata* e embriões somáticos de *Coffea arabica* cvs. Mundo Novo e Catuaí Amarelo, respectivamente, encontraram grãos de amido. No presente trabalho, extratos aquosos de *Cedrela fissilis*, foram analisados a fim de quantificar o conteúdo de amido, e foi possível observar que nestes tratamentos tem amido. Medina *et al.*, (1998), o acúmulo de amido nas células dos calos é comum e a quantidade acumulada varia de acordo com o tipo de calo formado. O acúmulo intenso deste carboidrato pode

ser indicativo de desenvolvimento tardio e de diferenciação ocorrendo no calo, já que a organogênese requer uma considerável quantidade de energia e que esta poderia derivar da degradação do amido.

Foi possível evidenciar a presença de organelas ricas em material protéico nos tratamentos avaliados. Bouzon, (1999) afirma que as proteínas são as principais constituintes estruturais das membranas das organelas celulares e estão presentes no citoplasma, como moléculas envolvidas em diversas rotas metabólicas, muitas delas atuando como enzimas. A alta afinidade de ligação a proteínas que CBB possui, faz com que seja o corante mais utilizado para identificação e quantificação de proteínas totais (CAWOOD *et al.*, 1978). Pilatti, (2011) também avaliou e observou alta afinidade de ligação a proteínas por este teste histoquímico (CBB). Além disso, no presente trabalho foram quantificadas teores de proteínas totais e foi verificada grande presença deste composto nos tratamentos avaliados.

Os testes histoquímicos mostraram que as análises bioquímicas são de fundamental importância para a identificação e quantificação dos compostos celulares presentes. Mas, estudos mais aprofundados poderão trazer maiores conhecimentos sobre o metabolismo dos diferentes tipos de calo, contribuindo para a otimização das culturas de calos de *C. fissilis* e suas possíveis aplicações.

## 9. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho possibilitaram as seguintes conclusões:

- Calos de *Cedrela fissilis* foram induzidos em todos os tipos de explantes testados, exceto em explantes de folhas cultivados com 118 mM de sacarose, 2,73 mM de glutamina e na luz, cultivados em diferentes fontes de carbono, em todas as combinações de concentrações de BAP e ANA (nós cotiledonares), em diferentes concentrações de glutamina, na presença e ausência da luz. Tais resultados possibilitaram a produção de biomassa, a partir de uma diversidade considerável de explantes, em diversas condições de cultivo, o que foi relevante para viabilizar os estudos conduzidos sobre a influência dos vários fatores sobre o metabolismo e a atividade antioxidante dos calos.
- Para cada tipo de fonte de carbono foi possível otimizar o tipo de explante, necessidade de glutamina e de luz para a produção, pelos calos, dos maiores níveis de proteínas totais, açúcares solúveis totais, amido, fenólicos totais, flavonóides, carotenóides, clorofilas a e b a atividade antioxidante.
- As fontes de carbono (tipos e concentrações), concentrações de glutamina, tipos de explantes, combinações de concentrações de BAP e ANA e presença e ausência de luz influenciaram os conteúdos de metabólicos primários (proteínas totais, açúcares solúveis totais, amido), metabólitos secundários (fenólicos totais, flavonóides, carotenóides, clorofilas a e b), a atividade antioxidante e os perfis metabólicos dos calos de *Cedrela fissilis*, obtidos por espectrofotometria de varredura em UV-vis. permitindo otimizar as condições de cultivo e confirmando o potencial de aplicação de estratégias biotecnológicas, para os estudos sobre a biossíntese e produção de compostos de interesse, através de sistemas de culturas de células.

- As fontes de carbono, tipos de explantes e glutamina influenciaram os tipos de carotenoides produzidos pelos calos, assim como as concentrações, sendo que a frutose estimulou o aparecimento de tipos de carotenoides como beta-criptoxantina e trans-beta-criptoxantina, que não foram produzidas com sacarose, ou que apareceram em alguns poucos tratamentos com glucose. Através de CLAE, foram detectados também outros tipos de carotenoides como luteína, zeaxantina livre, zeaxantina esterificada,  $\beta$ -criptoxantina, o isômero *trans*- do  $\beta$ -caroteno e o isômero-*cis* do  $\beta$ -caroteno, sendo verificados em maiores quantidades em calos de cotilédone, cultivados com frutose, com 2,73 mM de glutamina.
- A partir da caracterização histoquímica de diferentes tipos de calos cultivados com glucose, com 2,73 mM de glutamina, na luz e no escuro foi possível observar diferenças entre os calos oriundos dos diferentes tipos de explantes, através dos testes de PAS e CBB, que indicaram presença de polissacarídeos neutros e ácidos, presença de celulose, poucos grãos de amido e organelas ricas em material protéico. Além disso, o teste de AT-O indicou a ocorrência de reação ortocromática no citoplasma, com a presença de grânulos ortocromáticos e de compostos fenólicos.

## 10. REFERÊNCIAS

ABBADE, L. C.; PAIVA, P. D. O.; PAIVA, R.; GRACIANO, M. H. P. Growth curve and biochemical analyses of callus of ipê-branco (tabebuia roseo alba (ridl.) Sand.). **Naturalia**, v.33, p.45-56, 2010.

ABDALA, L. R. Flavonoids in *Tagetes coronopifolia* wild (Asteraceae). **Acta Horticulturae**, n. 501, p. 219-221, 1999.

AFRASIAB, H.; JAFAR, R. Effect of different media and solidifying agents on callogenesis and plant regeneration from different explants of Rice (*Oryza sativa* L.) varieties super basmati and irri-6. **Pakistan Journal of Botany**, v. 43, n. 1, p. 487-501, 2011.

AITCHINSON, P. A.; MACLEOD, A. J.; YEOMAN, M. M. Growth patterns in tissue (callus) cultures. In: **Plant Tissue and Cell Culture**. Street, H. E. (ed) Blackweel Scientific Publications. 1977.

AMBROZIN, A. R. P.; LEITE, A. C.; BUENO, F. C. Limonoids from andiroba oil and *Cedrela fissilis* and their insecticidal activity. **Journal of Brazilian Chemical Society**, vol 3, n. 17: 542 – 547. 2006.

ANDRADE, L. B. **Efeito do meio de cultura, tipos de explante e períodos de escuro sobre a micropropagação da batata (*Solanum tuberosum* L.)**, cv. Cristal.1998. 60 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1998.

ANDRADE, M.W.; LUZ, J.M.Q.; LACERDA, A.S. *et al.* Micropropagação de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. Allemao). **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n.1, p.174-180, 2000.

ANDRE, A.C.G.M. *et al.* Estudo comparativo da produção de metabólitos secundários em cultura de células e na planta in natura de *Gomphrena globosa* (Amaranthaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 22-24, 2003.

ANTOIGNONI, F.; ZHENG, S.; PAGNUCCO, C.; BARALDI, R.; POLI, F.; BIONDI, S. Induction of flavonoid production by UV-B radiation in *Passiflora quadrangularis* callus cultures. **Fitoterapia**, 78: 345–352, 2007.



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.13, p.315-322, 2001.

ASLAM, M. & OAKS, A. Comparative studies on the induction and inactivation of nitrate reductase in corn roots and leaves. **Plant Physiology**, 57:572-576, 1976.

AZEVEDO, K. de S. **Indução e análises bioquímicas de calos e aspectos da anatomia foliar de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.)**. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, MG, 86 p. 2003.

BARREIROS, A.L.B.S., DAVID, J.M. & DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, 29:113-123, 2006.

BERHOW, M. A.; BENNET, R. D.; POLING, S. M.; VANNIER, S.; HIDAKA, T.; OMURA, M. Analysis of antioxidant activity and antioxidant constituents of *Chinese toon*. **Phytochemistry**, vol. 36, n. 5. p. 122-1227, 1994.

BERNET, E.; CLAPAROLS, I.; DONDINI, L.; SANTOS, M. A., SERAFINI-FRACASSINI, D. AND TORNÉ, J. M. Changes in polyamine content, arginine and ornithine decarboxylases and transglutaminase activities during light/dark phases (of initial differentiation) in maize calluses and their chloroplasts. **Plant Physiol. Biochem.** 37, 899-909, 1999.

BERTELI, F.; CORRALES, E.; GUERRERO, C.; ARIZA, M.J.; PILEGO, F.; VALPUESTA, C. Salt stress increases ferredoxin-dependent glutamate synthase activity and protein level in the leaves of tomato. **Physiology Plantarum**. 93: 259-264, 1995.

BHOJWANI, S. S.: RAZDAN, M. K. **Plant tissue culture: theory and practice**. New York: Elsevier Publishing, 1983. 501p.

BIONDI, S.; THORPE, T. Grown regulator effects, metabolite changes, and respiration during shoot initiation in cultured cotyledon explants of *Pinus radiata*. **Bot. Gaz.**, 143 (1): 20-25, 1982.

BOBÁK, M.; SAMAJ, J.; PRETOVÁ, A.; BLEHOVÁ, A.; HLINKOVÁ, E.; OVECKA, M.; HLAVACKA, A.; KUTARNOVÁ, Z. The histological analysis of indirect somatic embryogenesis on *Drosera spathulata* Labill. **Acta Physiologiae Plantarum**, Berlin, v. 26, n.3, p.353-361, may. 2004.

BORKOWSKA, B.; SZCZERBA, J. Influence of different carbon sources on invertase activity and growth of sour cherry (*Prunus cerasus* L.) shoot cultures. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 42, n. 240, p. 911-915, 1991.

BOUZON, Z. L. **Histoquímica e ultraestrutura da espermatogênese e carposporogênese de algas Gracilarióides (Rhodophyta)**. Tese de Doutorado, USP, São Paulo - SP, 116 p., 1999.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **AnalBiochem.**72: 248-254, 1976.

BRANCA, C., A. TORELLI, P. FERMI, M.M. ALTAMURA, M. BASSI. Early phases 'in vitro' culture tomato cotyledons: starch accumulation and protein pattern in relation to the hormonal treatment, **Protoplasma**, 182:59-64, 1994.

BRAMLEY, P. M. Regulation of carotenoid formation during tomato fruit ripening and development. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 377, p. 2107- 2113, 2002.

BRITTON, G.; LIAEEN-JENSEN, S.; PFANDERM, H. **Carotenoids Handbook**. Birkhäuser Verlag, Basel, 2004. 675p.

BRUM, G.; McKANE, L.; KARP, G. **Biology: exploring life**. 2. ed. New York: John Wiley, 1994. 1030 p.

BUZZINI, P., & MARTINI, A. Production of carotenoids by strains of *Rhodotorula glutinis* cultured in raw materials of agroindustrial origin. **Bioresource Technology**, 71, 41-44, 2000.

CALDAS LS, HARIDASAN P, FERREIRA ME. Meios Nutritivos. In: TORRES AC, CALDAS LS, BUSO JA. **Técnicas e Aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP, EMBRAPA-CNPB, p. 37-70, 1990.

CAMARA, T.R.; WILLADINO, L.; TORNÉ, J. M.; MANICK, A.; SANTOS M.A. Efeito do estresse salino e da prolina exógena em calos de milho. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 12(2):146-155, 2000.

CARDOZO, K. H. M.; GUARATINI, T.; BARROS, M. P.; FALCÃO, V. R.; TONON, A.P.; LOPES, N. P.; CAMPOS, S.; TORRES, M. A.; SOUZA, A. O.; COLEPICOLA, P.; PINTO, E. Metabolites from algae with economical impact. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 146, p. 60–78, 2007.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies Florestais Brasileiras – Recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Colombo, PR. EMBRAPA-CNPB/SPI. 1994. 639p.

CASTRO, A. H. F.; PAIVA, R.; ALVARENGA, A. A. de.; VITOR, S. M. M. Calogênese e teores de fenóis e taninos totais em Barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (mart.) Coville]. **Ciênc. agrotec**.vol.33, n.2, Lavras, 2009.

CAWOOD, A.; POTTER, U. & DICKINSON, H.G. An evaluation of coomassie brilliant blue as a stain for quantitative microdensitometry of protein in sections. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, 76: 645-650, 1978.

CHAGAS, E. A. *et al.* Development of globular embryos from the hybridization between ‘Pêra Rio’ sweet orange and ‘Poncã’ mandarin. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.25, n.3, p.483-488, 2003.

CHANDLER, S. F.; DODDS, J. H. The Effect of Phosphate, Nitrogen and Sucrose on the Production of Phenolics and Solasodine in Callus Cultures of *Solanum laciniatum*. **Plant Cell Reports**, 2:205-208, 1983.

CHAWLA, H. S. Introduction to Plant Biotechnology. **Science Publishers, Inc.** 2004.

CHENG, K.; YANG, R. Y.; TSOU, S. C. S.; LO, C. S. C.; HO, C. T.; LEE, T. C.; WANG, M. Analysis of antioxidant activity and antioxidant constituents of Chinese toon . **Journal of Functional foods**, p. 253-259, 2009.

CHUN, S.S.; VATEM, D.A.; LIN, Y.T.; SHETTY, K.; Phenolic antioxidant from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. **Process Biochem.** 40: 809. 2005.

COMBS, J.R., G.F. The Vitamins: Fundamental Aspects in Nutrition and Health. **Academic Press**, San Diego, 1998.

CONNER, E. M.; GRISHAM, M. B. Inflammation, free radicals, and antioxidants. **Nutrition**, 12: 274- 277, 1996.

CORTE, V. B. **Estudos histoquímicos, bioquímicos e fisiológicos em sementes de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. Durante a germinação e crescimento inicial das plântulas.** Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa- MG, 69 p. 2005.

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**, p.1250-1318. 2000.

CURVELIER, M.E.; RICHARD, H.; BERST, C. Comparison of the antioxidant activity of some acid-phenolics: structure-activity relationship. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 56, p. 324-325, 1992.

DAVEY, M. R.; FOWLER, M. W. STREET, H. E. Cell clones contrasted in growth, morphology and pigmentation isolated from a callus culture of *Atropa belladonna* Var. *Lutea*. **Phytochemistry**, v. 10, p. 2559-2575, 1971.

DIAS, A.C.P.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; FERNANDES-FERREIRA, M.; FERRERES, F. Unusual flavonoids produced by callus of *Hypericum perforatum*. **Phytochemistry**, v.48, p.1165- 1169, 1998.

DUARTE, C. C. **Detecção óptica da eficiência quântica da fotossíntese. Dissertação de mestrado.** Universidade Federal de Pernambuco, 109 p. 2003.

DUNSTAN D. I., TAUTORUS T. E., THORPE T. A. Somatic embryogenesis in woody plants. in: In vitro embryogenesis in plants, Thorpe T. A. (ed.), **Kluwer Acad. Pub., Dordrecht**, 47 1-538, 1995.

EDELMAM, J.; HANSON, A. D. Sucrose suppression of chlorophyll synthesis in carrot callus cultures. **Planta**, c. 98,p. 150-156, 1971.

ESPÍN, J.C., SOLER-RIVAS, C. & WICHERS, H.J. Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 48: 648-656, 2000.

FLORES, H.E.; GALSTON, A.W. Polyamine and plant stress: activation of biosynthesis by osmotic shock.. **Science**, 217:1259-1260, 1982.

FOYER CH, LOPEZ-DELGADO H, DAT JF, SCOTT IM. Hydrogen peroxide and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signaling. **Physiologia Plantarum**, 100:241–254, 1997.

GAMBORG, O. L. The effect of amino acids and ammonium on the growth of plant cells in suspension culture. **Plant Physiol.** v.45, p. 372-375, 1970.

GARCIA-PLAZAOLA, J.I., HERNÁNDEZ, A., OLANO, J.M. & BECERRIL, J.M. The operation of the lutein epoxide cycle correlates with energy dissipation. **Functional Plant Biology**, 30: 319–24, 2003.

GEORGE, E. F.: SHERINGTON, P. D. Factors affecting growth and morphogenesis. In:\_\_\_\_\_. Plant propagation by tissue culture. **England: Exegeics**, p.125-171, 1984.

GEORGE, E. F. Plant propagation by tissue culture: in practice. Reino Unido: **Exegetics Limited**, Parte 2, 1361p.1996.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; De KLERK, G. Plant Propagation by Tissue Culture – Vol. 1: **The Background**. 3<sup>rd</sup> ed. Springer. 2008.

GIOVANNUCCI, E. Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: review of the epidemiologic literature. **J. Natl. Cancer Inst.** 91, 317–331, 1999.

GOULART, H. R.; KIMURA, E. A.; PERES, V. J.; COUTO, A. S.; AQUINO DUARTE, F. A.; KATZIN, A. M. Terpenes arrest parasite development and inhibit biosynthesis of isoprenoids in *Plasmodium falciparum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, vol 48, n. 7: 2502 – 2509. 2004.

GRATTAPAGLIA D, MACHADO MA. **Micropropagação**. In: TORRES AC, Caldas LS, Buso JA (Eds.) Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: EMBRAPA-SPI; EMBRAPA-CNPQ, p. 183-260, 1998.

GUERRA, M. P.; VESCO, L. L. dal; PESCADOR, R.; SCHUELTER, A. R.; NODARI, R. O. Estabelecimento de um protocolo regenerativo para micropropagação do abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, p. 1557-1563, 1999.

GÜNTHER, E. A.; OVODOV, Y. S. An alternate carbon source for enhancing production of polysaccharides by *Silene vulgaris* callus. **Carbohydrate Research**, v. 337, p. 1641–1645. 2002.

HAISSIG, B. E. Carbohydrate and acid concentrations during adventitious root primordium development in *Pinus banksiana* Lamb. cuttings. **Forestry Science**. Washington, v.28, p.813-821, 1982.

HARBORNE, J. B. **Phytochemical methods**. 2 ed. Hong Kong: Chapman and Hall, 1984. 288 p.

HARBORNE, J. B. Introduction to Ecological Biochemistry. London: **Academic Press**. 1988.

HARBORNE, J.B. Classes and functions of secondary products. In: WALTON, N.J.; BROWN, D. (Eds). Chemicals from plants, perspectives on secondary products plant products. **Imperial College Press**. p.1-25, 1999.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drug and medicines: possible modes of action. **Journal of Natural Products**. 59: 205-215, 1996.

HATTORI, T.; FUKUMOTO, H.; NAKAGAWA, S.; NAKAMURA, K. Sucrose-Induced Expression of Genes Coding for the Tuberos Root Storage Protein, Sporamin, of Sweet Potato in Leaves and Petioles. **Plant Cell Physiol**, 32 (1): 79-86,1991.

HEATH, O. V. S. **Physiologie der photosynthese**. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1972. 314 p.

HEW, C. X.; MAH, T. C. Sugar uptake and invertase activity in *Dendrobium* tissues. **New Phytologist**, Cambridge, v. 111, n. 2, p. 167-171, 1989.

HIREL, B. & GADAL, P. Glutamine synthetase in rice. A comparative study of the enzymes from roots and leaves. **Plant Physiology**, 66:619-623, 1980.

HISCOX, J. D & ISRAELSTAM, G. F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian Journal Botany**, vol. 57: 1332 – 1334. 1979.

HOPIA, A; HEINONEM, M. Antioxidant activity of flavonol aglycones and their glycosides in methyl linoleate. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 76:139-144, 1999.

INOUE, M. T. **Fundamentos ecofisiológicos para a silvicultura de (*Cedrela spp.*)**. Tese (Professor) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1978. 91p.

INOUE, M.T.; RODERJAN, C.V.; KUNIYOSHI, Y.S. **Projeto madeira do Paraná**. Curitiba, FUPEF, 1984. 260p.

IRAQUI, D.; TREMBLAY, F. M. The papel of sucrose during maturation of Black spruce (*Piceamariana*) and White spruce (*Picea glauca*) somatic embryos. **Plant physiol**, 111: 381-388, 2001.

KERBAUY, G.B. Clonagem de plantas *in vitro*. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. Brasília, v.1, n.1, p.30-33, maio 1997.

KHAN, M. R.; KIHARA, M.; OMOLOSO, A. D. Antimicrobial activity of *Horsfieldia helwigii* and *Melia azedarach*. **Fitoterapia**, 72:423–427, 2001.

KIM, Y.K., GUO, Q. & PACKER, L. Free radical scavenging activity of red ginseng aqueous extracts. **Toxicology**, 172: 149–156, 2002.

KITAHARA, K.; ANTOKU, M.; HORI, Y.; SEDOSHITA, A.; SUGANUMA, T. Developmental change in starch granules in sweetpotato callus. **Carbohydrate Polymers**, 49: 91-96, 2002.

KLEIJN D, STEINGER T. Contrasting effects of grazing and hay-cutting on the spatial and genetic population structure of *Veratrum album*, an unpalatable, long-lived, clonal plant species. **Journal of Ecology**, 90: 360–370, 2005.

KLEIN, R. M. **Flora Ilustrada Catarinense – Meliáceas**. Itajaí, SC. 1984.

KOSSEL, A. Über die chemische zusammensetzung der zelle. **Archiv für Physiologie** p.181-186. 1981.

KRINSKY, N.I., LANDRUM, J.T., BONE, R.A. Biologic mechanisms of the protective role of lutein and zeaxanthin in the eye. **Annu. Rev. Nutr.** 23, 171–201, 2003.

JOLY, A. B. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**. 7.ed. São Paulo: Editora Nacional, 1985. 776p.

LADYMAN, J. A. R.; GIRARD, B. Cucumber somatic embryo development on various gelling agents and carboydrate sources. **Scientia Horticulturae**, 27: 164-165, 1992.



LAGO, J. H. G.; ÁVILA, P.; AQUINO, E. M.; MORENO, P. R. H.; OHARA, M. T.; NIMBERGER, R. T.; APEL, M. A.; HENRIQUES, A. T. Volatile oils from leaves and stem barks of *Cedrela fissilis* (Meliaceae): chemical composition and antibacterial activities. **Flavour and Fragrance Journal**, n. 19: 1 – 4. 2004.

LAI, F.; SENARATNA, T.; MCKERSIE, B. D. Glutamine enhances storage protein synthesis in *Medicago sativa* L. somatic embryos. **Plant Science**, 87: 69-77, 1992.

LAUDANO, W. S. **Cultura de calos e criopreservação de sementes de *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae)**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC. 2005.

LAUKKANEN, H.; TIITO, R. J.; HOHTOLA, A. Effect of different nitrogen nutrients on the viability , protein synthesis and tannin production of Scots pine callus. **Physiologia Plantarum**, v. 100, p. 982-988, 1997.

LEITE, A. C.; BUENO, F. C.; OLIVEIRA, C. G.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C. DA SILVA, M. F. G. F.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; HEBLING, M. J. A.; BACCI JR., M. Limonoids from *Cipadessa fruticosa* and *Cedrela fissilis* and their insecticidal activity. **Journal of Brazilian Chemical Society**, vol. 16 (6B): 1391 – 1395. 2005.

LI, J.; OU-LEE, T. M.; RABA, R.; AMUNDSON, R. G.; LAST, R. L. Arabidopsis mutants are hypersensitive to UV-B radiation. **Plant Cell**5: 171-179. 1993.

LIMA, E. C.; PAIVA, R.; SOARES, F. P.; NOGUEIRA, R.C.; EMRICH, E. B.; NICIOLI, P. M. Avaliação bioquímica do desenvolvimento de calos in vitro a partir de segmentos foliares de Sangra d'água (*Croton urucurana* Baill.). **Magistra**, v. 19, n. 3, p. 184-190, 2007.

LOGEMANN, E.; PARNISKE, M.; HAHLBROCK, K. Modes of expression and common structural features of the complete phenylalanine ammonia-lyase gene family in parsley. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**92: 5905-5909, 1995.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Ed. Plantarum: Nova Odessa, SP. 1992.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 3ª ed. volume I e II. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 1998.

LORETI E, POGGI A, NOVI G, ALPI A, PERATA P. A genome-wide analysis of the effects of sucrose on gene expression in Arabidopsis seedlings under anoxia. **Plant Physiology**,137:1130–1138, 2005.

LOVATT, C.J. Stress alters ammonia and arginine metabolism. In: FLORES, H.E.; ARTECA, R.N.; SHANNON, J.C. (Eds.) Polyamines and ethylene biochemistry, physiology and interactions. **American Society of Plant Physiologist**. p.166-179, 1990.

LUO, X., WU, S., MA, Y., & WU, D. Studies on chemical constituents of *Toona sinensis*. **Zhongcaoyao**, 32, 390–39, 2001.

MACK, G. Organ-specific changes in the activity and subunit composition of glutamine synthetase isoforms of barley (*Hordeum vulgare* L.) after growth on different levels of NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. **Planta**, 196: 231-238, 1995.

MAGGI-CAPEYRON, M. F.; CEBALLOS, P.; CRISTOL, J. P.; DELBOSE, S.; LE DOUSEN, C.; PONS, M.; LEGER, C. L. DESCOMPS, B. Wine phenolic antioxidants inhibit Ap-1 transcriptional activity. **J. Agric. Food Chem.** 49:5646 – 5652, 2001.

MAIA, B. H. L. N. S.; DE PAULA, J. R.; SANT'ANA, J.; SILVA, M. F. G. F.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; COSTA. M. S. S.; OHASHIB, O. S.; SILVA, J. N. M. Essential oils of *Toona* and *Cedrela* species (Meliaceae): taxonomic and ecological implications. **J. Braz. Chem. Soc.**, vol. 11, n. 6: 629 – 639. 2000.

MAKOI, J. H. J. R.; NDAKIDEM, P. A. Biological, ecological and agronomic significance of plant phenolic compounds in rhizosphere of the symbiotic legumes. **African Journal of Biotechnology**, Vol. 6 (12), p. 1358-1368, 2007.

MAKUNGA, N.P., VAN J. STADEN AND W.A. CRESS. The effect of light and 2,4-D on anthocyanin production in *Oxalis reclinata* callus. **Plant Growth Regul.**, 23: 153-158, 1997.

MANGAT, B. S.; M.K. PELEKIS, A.C. CASSELLS. Changes in the starch content during organogenesis in 'in vitro' cultured *Begonia rex* stem explants, *Physiol. Plant* 79: 267–274, 1990.

MANSOUR, M. M. F. Nitrogen containing compounds and adaptation of plants to salinity stress. **Biologia Plantarum**, Dordrecht, v.43, n.4, p.491-500, 2000.

MANTELL, S.H. **Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas**. Ribeirão Preto: SBG, 1994. 344p.

MARAFON, A. C.; HERTER, F. G.; BACARIN, M. A.; RODRIGUES, A. C.; VERÍSSIMO, V. Concentrações de carboidratos em tecidos de pessegueiro (*Prunus persica* (L.) Batsch) cv. Jubileu em plantas com e sem sintomas de morte-precoce durante o período de dormência. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal - SP, v. 29, n. 1, p. 075-079, Abril, 2007.

MARTIN, A. B.; CUADRADO, Y.; GUERRA, H.; GALLEGO, P.; HITA, O.; MARTIN, L.; DORADO, A.; VILLALOBOS, N. Differences in the contents of total sugars, reducing sugars, starch and sucrose in embryogenic and non-embryogenic calli from *Medicago arborea* L. **Plant Science**, 154: 143–151, 2000.

MARUYAMA, E.; ISHII, K. Somatic embryogenesis in big-leaf mahogany (*Swietenia macrophylla* King). In: JAIN, S. M.; GUPTA, P. K.; NEWTON, R. J. **Somatic embryogenesis of woody plants**. Ch. 3: 45 – 62. 1999.

MARZALINA, M.; KRISHNAPILLAY, B. Recalcitrant seed Biotechnology applications to rain forest conservation. In: BENSON, E. E. (Ed.) – **Plant Conservation Biotechnology**, London: Taylor and Francis Ltd., 1999. p. 265-276.

McCULLY, M.E. The histological localization of the structural polysaccharides of seaweeds. **Annals of the New York Academy of Sciences**, vol. 175: 702 – 711. 1970.

MATO, M. C. RUA, M. L. FERRO, E. Changes in levels of peroxidases and phenolics during root formation in *Vitis* cultured in vitro, **Physiol. Plant.**, 72: 84-88, 1998.

MEDINA, M.; VILLALOBOS, N.; DE LA CRUZ, P. J.; DORADO, A.; GUERRA, H. Effect of culture medium and light conditions on the morphological characteristics and carbohydrate contents of *Medicago strasserii* calli. **Acta Physiologiae Plantarum**, vol. 20, n. 4: 383 – 392. 1998.

MENSOR, L.L., MENEZES, F.S., LEITÃO, G.G., REIS, A.S., DOS SANTOS, T.C., COUBE, C.S. & LEITÃO, S.G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, 15: 127-130, 2001.

MESQUITA, A.C. et al. Análises bioquímicas de calos obtidos de segmentos foliares de lechieira (*Litchi chinesisnsis* Sonn.). **Magistra**, Cruz das Almas, v.14, n.1, p.1-6, 2002.

MIFLIN, B.J. & LEA, P.J. Amino acid metabolism. **Annual Review of Plant Physiology**, 28: 299-329, 1977.

MIKULA, A.; TYKARSKA, T.; SKA, M. Z.; KURAS, M., SKI, J. J. R. Ultrastructural changes in zygotic embryos of gentiana punctata l. during callus formation and somatic embryogenesis. **ActaBiologica Cracoviensia Series Botanica**, Cracow, v. 46, p.109–120, 2004.

MIOTO, P. T. **Crescimento e análise preliminar do perfil fitoquímico de calos de *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae)**. Monografia (Gradação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC. 2007.

MOHAMED, A. A.; EL-BAZ, F. K; ALI, S. I.; SAKER, M. M.; HEGAZY, A. K. Alteration of Protein Patterns in Callus Cultures of *Citrullus colocynthis* in Relation to Plant Growth Regulators. **Insight Biotechnology**, 1 (1): 1-6, 2011.

MOHAMMED, D. G.; VIVALDER, W. E. Root production and plantlet development in tissue cultured conifers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands. v.14, p.137-60, 1988.

MOUMOU, Y.; VASSEUR, J.; TROTIN, F.; DUBOIS, J. Catechin production by callus cultures of *Fagopyrum esculentum*. **Phytochemistry**, vol. 31, n. 1239-1241, 1992.

MULLER, T.S. **Fisiologia e metabolismo da embriogênese somática e zigótica de *Acca sellowiana* (Berg) Burret.** Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Federal de Santa Catarina, SC, 92 p. 2008.

MUELLNER, A.N., SAMUEL, R., JOHNSON, S.A., CHEEK, M., PENNINGTON, T.D., CHASE, M.W. Molecular phylogenetics of Meliaceae (Sapindales) based on nuclear and plastid DNA sequences. **Am. J. Bot.** v. 90, p. 471-480, 2003.

MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A Revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, n.3, p.473-497, 1962.

NAKAMURA, T.; TANIGUCHI, T.; MAEDA, E. Cyto-histological studies on somatic embryos of Coffee: Ultrastructural Aspects. **Japanese Journal of Crop Science**, Nagoya, Japan v. 63, n. 1, p. 144-157, July.1994.

NANDA, K. K.; JAIN, M. K. Utilization of sugars and starch as carbon sources in the rooting of etiolated stem segments of *Populus nigra*. **New Phytologist**, Oxford. v.71, p.825-828, 1972.

NARAYANASWAMY, S. **Plant cell and tissue culture**. Nova Delhi: Tata McGraw-Hill Publishing Company Limited. 1994.

NEMETH, G. **Induction of rooting**. In: BAJAJ, Y. P. S. ( ed.). **Biotechnology agriculture and forestry I**, Berlin: Springer-Verlag, 1986.

NICOLOSO, F. T.; ERIG, A. C.; RUSSOWSKI, D.; MARTINS, C. F. Efeito de doses e fontes de carboidratos no crescimento de plantas de ginseng Brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] Cultivadas *in vitro*. **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 1, p. 84-90, 2003.

NUNES, E. C. **Sistemas de cultura e conservação *in vitro* para *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae).** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC. 2000.

NUNES, E. C.; CASTILHO, C. V.; MORENO, F. N.; VIANA, A. M. *In vitro* culture of *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, n. 70: 259 – 268. 2002.

NUNES, E. C.; BENSON, E. E.; OLTRAMARI, A. C.; ARAUJO, P. S.; MOSER, J. R. and VIANA, A.M. *In vitro* conservation of *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae), a native tree of the Brazilian Atlantic Forest. **Biodiversity and Conservation**, v. 12: 837 – 848. 2003.

NUNES, E. C. *et al.* Micropropagation of *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae). In: JAIN, S. M.; HÄGGMAN, H. (Ed) – Protocols for Micropropagation of Woody **Trees and Fruits**. Springer. Ch. 27: 221 – 235. 2007.

OAKS, A. Nitrogen assimilation in roots: a re-evaluation. **Bioscience**,142:103-111, 1992.

PALACIO, L. CANTERO, J. J. CUSIDÓ, R. M. GOLENIOWSKI, M. E. Phenolic compound production in relation to differentiation in cell and tissue cultures of *Larrea divaricata* (Cav.). **Plant Science**, 193– 194 :1– 7, 2012.

PALMA, D.; SCHUELTER, A. R.; STEFANELLO, S.; FORTES, A. M. T. Aspectos morfofisiológicos e controle da hiperhidricidade na Cultura de tecidos vegetais. **Bras. Agrociência**, Pelotas, v.17, n.2-4, p.174-184, abr-jun, 2011.

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

PASSOS, L.P. **Métodos analíticos e laboratoriais em fisiologia vegetal**. Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL, 1996. 233p.

PAULILO, M. T. S.; VIANA, A. M.; RANDI, A. M. **Fisiologia Vegetal**. Florianópolis: Biologia/ EAD/ UFSC, 2010.

PEREIRA, D. K. S. **Espectrofotometria de Absorção Molecular Uv-vis. Dissertação (Mestrado em Química)** – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa - PA. 2009.

PILATTI, F. K.; AGUIAR, T.; SIMÕES, T.; BENSON, E. E.; VIANA, A. M. *In vitro* and cryogenic preservation of plant biodiversity in Brazil. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, vol. 27: 82-98. 2010.

PILATTI, F. K. **Crescimento, perfil metabólico e citoquímica de calos de *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae)**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC. 2011.

PIZZARO, L.; STANGE, C. Light dependent regulation of carotenoid biosynthesis in plants. **Ciencia e investigación Agrária**, v. 36, n. 2, p. 143-162, 2009.

PLETSCH, M. Compostos naturais biologicamente ativos: a aplicação da biotecnologia à produção de compostos naturais biologicamente ativos. **Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, n. 4: 12 – 15. 1998.

PODDER, K.S.; DA`SILVA, I.; VAIDYANATHAN, C. S. Ribosome-inactivating proteins and agglutinins from callus and suspension cultures of *Ricinus communis* L. and *Abrus precatorius* L. **Plant Sci.**, 94: 161-172, 1993.

PORTER, J. R.; LAWLOR, D. W.; Plant Growth: interactions with nutrition and environment. Cambridge: **University of Cambridge Press**, 1991. 284 p.

POSPOŠILOVA J. , TICHA, I. KADLEČEK, P. HASEL D. & PLZAKOVA, Š. Acclimatization of micropropagated plants to ex vitro conditions. **Biologia Plantarum**, 42: 481-497, 1999.

RABE, E; LOVATT, C. Increased arginine biosynthesis during phosphorus deficiency. **Plant Physiology**, 81:774-779, 1986.

RAMLOV, F. **Variação sazonal dos carotenoides e compostos fenólicos e estudos fisiológicos em diferentes estádios reprodutivos de *Gracilaria domingensis* (Kütz.) Sonderex Dickie (Gracilariales, Rhodophyta)**. Tese (Doutorado em Biodiversidade Vegetal e Meio ambiente) – Instituto de Botânica, São Paulo – SP. 2010.

RAMOS, D. F.; LEITÃO, G. G.; COSTA, F. N.; ABREU, L.; VILLARREAL, J. V.; LEITÃO, S. G.; FERNÁNDEZ, S. L. S.; DA SILVA, P. E. A. Investigation of the antimycobacterial activity of 36 plant extracts from the Brazilian Atlantic Forest. **Revista Brasileira Ciências Farmacêuticas**, vol 44, n. 4: 669 – 674. 2008.

RAO, S. M.; BINDER, J. R.; BANDETTINI, P. A.; HAMMEKE, T. A.; YETKIN, F. Z.; JESMANOWICZ, A.; LISK, L. M.; MORRIS, G. L.; MUELLER, W. M.; ESTKOWSKI, L. D.; WONG, E. C.; HAUGHTON, V. M.; Hyde, J. S. Functional magnetic resonance imaging of complex human movements. **Neurology**, 43: 2311–2318, 1993.

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

REITZ, R.; KLEIN, R.M.; REIS, A. **Madeiras do Brasil**. Florianópolis: Ed. Lunardelli. 1979.

REITZ, R.; KLEIN, R.M. ; REIS, A. **Projeto madeira do Rio Grande do Sul**. Itajaí: IOESC, 525 p. 1983. 525p.

RENAUDIN, J.P., C. TOURNAIRE AND B.J. DE LA-SERVE. Quantitative analysis of protein changes during meristem initiation and bud development in protoplast derived *Petunia hybrida* callus. **Physiologia Plantarum**, 82: 48-56, 1991.

RICE-EVANS, C. A., MILLER N.J., PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in plant science**, v. 2, p.152-159, 1997.

RIZZINI, C. T. **Manual de Dendrologia Brasileira**. São Paulo. Ed. Edgard Blücher Ltda., 294p. 1971.



RIZZINI, C. T. **Árvores e madeira úteis do Brasil – Manual de Dendrologia Brasileira**. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda. 296p. 1978.

RIZZINI, C.T. **Árvores e madeiras úteis do Brasil**. São Paulo, E. Blücher, 1981. 296p.

ROBINS, R. J. Secondary products from cultured cells and organs: I. Molecular and cellular approaches. In: DIXON, R. A.; GONZALES, R. A. (Ed.) – *Plant Cell Culture – A Practical Approach*. **Oxford University Press**, 2<sup>nd</sup> Ed. Ch. 8: 169 – 198. 1994.

ROCHA, A. S. da. **Produção de carotenoides em culturas *in vitro* de *Cleome Rosea Vahl ex DC* (Capparaceae) e avaliação de sua toxicidade e potencial antioxidante**. Dissertação de mestrado (Biologia Vegetal). Universidade do Estado do Rio de Janeiro – RJ, 94 p. 2012.

ROGINSKY, V. & LISSI, E.A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, 92: 235-254, 2005.

RÖMER, S., LUBECK, J, KAUDER, F., STEIGER, S., ADOMAT,C. & SANDMANN,G.Genetic engineering of a zeaxanthin-rich potato by antisense inactivation and co-suppression of carotenoid epoxidation. **Metabolic Engineering**, v.4, p. 263–272, 2002.

ROOSENS, N.H.C.J.; TRAN, T.T.; HAYATI, M.I.; JACOBS, M. Isolation of the ornithine- $\alpha$ -aminotrasferase cDNA and effect of salt stress on ornithine expression in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, 117:263-271, 1998.

ROSE, R. J.; WANG, X. D.; NOLAN, K. E.; ROLFE, B. G. Root meristems in *Medicago truncatula* tissue culture arise from vascular-derived procambial- like cells in a process regulated by ethylene. **Journal of Experimental Botany**, London, v. 57, n. 10, p. 2227-2235, 2006.

ROSS, H. A., H.V. DAVIES, L.R. BURCH, R. VIOLA, D. MCRAE. Developmental changes in carbohydrate content and sucrose degrading

enzymes in tuberising stolons of potato (*Solanum tuberosum*), **Physiol. Plant**, 90: 748–756, 1994.

ROSSI, J.A. & KASUM, C.M. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. **Annual Review of Nutrition** 22:19–34, 2002.

ROY, A.; SARAF, S. Limonoids: Overview of significant bioactive triterpenes distributed in plants kingdom. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, vol. 2, n. 29: 191 – 201, 2006.

SALDANHA, A. L. M. **Protocolo para a Propagação *in vitro* de Cedro (*Cedrela odorata* L.)**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém – PA. 2010.

SADO, M. **Efeito do 2,4-D na calogênese de *Senna spectabilis* (DC) Irwin et Barn (Leguminosae) e seus compostos de reserva**. Dissertação de mestrado. Instituto de Botânica da Secretaria do Meio ambiente. São Paulo, 90 p. 2009.

SÁNCHEZ-MORENO, C., LARRAURI, J.A. & SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 76: 270-276, 1998.

SANTOS, C.; CALDEIRA, G. Comparative responses of *Helianthus annuus* plants and *calluses* exposed to NaCl. I. Growth rate and osmotic regulation in intact plants and *calluses*. **J. Plant. Physiol.**, 155, 769–777, 1999.

SANTOS, I. & SALEMA, R. Effect of nitrogen nutrition on nitrate and nitrite reductase, glutamine synthetase, glutamate synthase and glutamate dehydrogenase in the CAM plant *Kalanchoe lateritia* Engl. **Plant Science**, 84:145-152, 1992.

SANTOS, A. S.; ARAÚJO, S. F.; GOULART, H. F.; CAETANO, L. C.; ARRUDA, M. S. P.; SANTOS, L. S.; SANTANA, A. E. G. A dehydrorotenoid produced by callus tissue culture and wild plant roots of *Boerhaavia coccinea*. **Rev Bras Farmacogn** 17: 538-541. 2007.

SANTOS, D. N.; NUNES, C. F.; PASQUAL, M.; VALENTE, T. C. T.; OLIVEIRA, A. C. L. de.; SILVEIRA, N. M. Análise Bioquímica de calos de pinhão-mansô. **Ciência Rural**, v. 40, n. 11, 2010.

SATO, J. Mata Atlântica: **Direito Ambiental e a Legislação, Exame das restrições do Uso da Propriedade**. São Paulo: Hemus. 1995.

SATUÉ-GARCIA, M.T.; HEINONEN, M.; FRANKEL, E.N. Anthocyanins as antioxidants on human lowdensity lipoprotein and lecithin-liposome systems. **J. Agric. Food Chem.**, v. 45, n. 9, p. 3.362-3.367, 1997.

SATYAVANI, K.; RAMANATHAN, T.; GURUDEEBAN, S. Effect of plant growth regulators on callus induction and plantlet regeneration of bitter apple (*Citrullus colocynthis*) from stem explants. **Asian J. Biotechnol**, 3: 246-253, 2011.

SCHAFFNER U, NENTWIG W, BRÄNDLE R. Effect of mowing, rust infection and seed production upon C and N reserves and morphology of the perennial *Veratrum album* L. (Liliales, Melanthiaceae). **Botanica Helvetica**, 105: 17–23, 1995.

SCHMIDT, E.C., SCARIOTA, L.A., ROVER, T. & BOUZON, Z.L. Changes in ultrastructure and histochemistry of two red macroalgae strains of *Kappaphycus alvarezii* Rhodophyta, Gigartinales), as a consequence of ultraviolet B radiation exposure. **Micron**, 40: 860-869, 2009.

SCHMIDT, E.C., SANTOS, R., HORTA, P.A., MARASCHIN, M., & BOUZON, Z.L. Effects of UVB radiation on the agarophyte *Gracilaria domingensis* (Rhodophyta, Gracilariales): Changes in cell organization, growth and photosynthetic performance. **Micron**, 41: 919-930, 2010.

SCHMIDT E C.; PEREIRA, B; SANTOS, R; GOUVEIA, C.; COSTA G. B.; FARIA, G.S.M.; SCHERNER, F; HORTA, P A. ; PAULA M, R ; LATINI, A; RAMLOV, F; MARASCHIN, M ; BOUZON, Z L. Responses of the macroalgae *Hypnea musciformis* after in vitro exposure to UV-B. **Aquatic Botany**. v. 100, p-8-17, 2012.

SCOCCIANI, V.; SGARBI, E.; FRATERNALE, D.; BIONDI, S. Organogenesis from *Solanum melongena* L. (eggplant) cotyledon

explants is associated with hormone-modulated enhancement of polyamine biosynthesis and conjugation, **Protoplasma**, 211: 51-63, 2000.

SERRA, A. G.P. **Análises bioquímicas de calos e estudo da divergência genética em castanha do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.)**.(Dissertação – Mestrado em Fisiologia Vegetal). Universidade Federal de Lavras- MG, 72 p. 1999.

SERRA, A. G. P.; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O. Analises bioquímicas de calos formados de explantes foliares de castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.). **Ciencia e Agrotecnologia**, 24: 833-840, 2000.

SHAHIDI, F. & NACZK, M. **Phenolics in food and nutraceuticals**. CRC Press, London, 566 p. 2006.

SILVA, A.L.C., C.S. CARUSO, R.A. MOREIRA AND A.C.G. HORTA. Growth characteristics and dynamics of protein synthesis in callus cultures from *Glycine wightii* (Wight and Arn.). Verdc. **Cienc Agrotec**, 29: 1161-1166, 2005.

SILVEIRA, V., FLOH, E.I.S., HANDRO, W. & GUERRA,. M. P. Effect of plant growth regulators on the cellular growth and levels of intracellular protein, starch and polyamines in embryogenic suspension cultures of *Pinnus taeda*.**Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 76: 53-60, 2004.

SIMÃO, A.A. **Antioxidantes, clorofila e perfil de ácidos graxos em folhas de mandioca**. Dissertação de Mestrado em Agroquímica. Universidade Federal de Lavras, 2010.

SIMKIN, A. J.; ZHU, C.; KUNTS, M.; SANDMANN, G. Light-dark regulation of carotenoid biosynthesis em pepper (*Capsicum annuum*) leaves. **Journal of Plant Physiology**, v. 160, p. 439-443, 2003.

SIMÕES, C.; BIZARRI, C. H. B.; CORDEIRO, L. S.; CASTRO, T. C.; COUTADA, L. C. M.; SILVA, A. J. R.; ALBARELLO, N.; MANSUR, E. Anthocyanin production in callus cultures of *Cleome rosea*: Modulation by culture conditions and characterization of pigments by

means of HPLC-DAD/ESIMS. **Plant Physiology and Biochemistry**, vol. 47: 895 – 903. 2009.

SIQUEIRA, J. O.; NAIR, M. G.; HAMMESRSCHIMIDT, R.; SAFIR, G. R. Significance of phenolic compounds in plant-soil-microbial systems. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.10, n. 1, p. 63-121, 1991.

SOARES, S. E.; Rev. Phenolic acids as antioxidants. **Revista de Nutrição**, Campinas, 15(1):71-81, jan./abr., 2002.

SOMERS, D.A.; KUO, T.M.; KLEINHOF, A.; WARNER, R.L. & OAKS, A. Synthesis and degradation of barley nitrate reductase. **Plant Physiology**, 72:948-952, 1983.

SOOMRO, R.; MEMON, R. A. Establishment of callus and suspension culture in *Jatropha curcas*. **Pakistan Journal of Botany**, vol. 39, n.7: 2431 – 2441. 2007.

SOUZA, C.C. **Influência de poliaminas no desenvolvimento de plantas de inhame (*Dioscorea sp*) cultivadas *in vitro***. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Instituto de Biociências. Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 86 p. 2002.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação de famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum. 2005.

SOUZA, W. R. **Estudo do efeito elicitador do ácido salicílico e do polissacarídeo extraído de sementes de paineira (*Chorisia speciosa*) em culturas de células de amora-preta (*Rubus fruticosus*)**. Dissertação (Mestrado em Ciências farmacêuticas). Faculdade de Ciências farmacêuticas de Ribeirão Preto- Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 97p. 2005.

SPRINGER, P.S., W.R. MCCOMBIE, V. SUNDARESAN AND R.A. Martienssen. Gene trap tagging of PROLIFERA, an essential MCM2-3-5-like gene in *Arabidopsis*. **Science**, 268: 877-880, 1995.

SRIVASTAVA, H.S. Regulation of nitrate reductase activity in higher plants. **Phytochemistry**, 19:725-733, 1980.

STAMP, J. A. Somatic embryogenesis in cassava. The anatomy and morphology of the regeneration process, **Ann. Bot.** 57: 451–459, 1997.

STOBART, A. K.; McLAREN, I.; THOMAS, D. R. Chlorophylls and carotenoids of colourless callus, green callus and leaves of *kalanchoe crenata*. **Phytochemistry**, vol. 6. p. 1467 -1474, 1967.

STREIT, N. M.; CANTERLE, L. P.; CANTO, M. W.; HECKTHEUER, L. H. H. As Clorofilas. **Ciência Rural.** 35(3): 28-39, 2005.

SWARNKAR, P. L.; S. P. BOHRA, N. CHANDRA. Biochemical studies on initiation of callus in *Solanum surattense*, **J. Plant Physiol.** 126:293–296, 1986.

TAPIERO, H., TEW, K.D., NGUYEN BA, G. & MATHÉ, G. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? **Biomed Pharmacother** 56: 200-7 2002.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**, 3 ed. Artmed. Porto Alegre, RS. 722p. 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4<sup>a</sup> Ed., Artmed, Porto Alegre, 2009.

TAIZ, L. & ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 5.ed. Massachusetts: Sinauer Associates, 782 p. 2010.

TAKEUCHI, Y., Y. OMIGUSA, M. OGASAWARA, K. YONEYAMA, M. KONNI AND A.D. Worsham. Effects of brassinosteroids on conditioning and germination of clover broomrape (*Orobanche minor*) seeds. **Plant Growth Regulators**, 16: 152-160, 1995.

TAVANO, E.C.R.; TAVARES, A.R.; TAKAKI, M.; LIMA, G.P.P. Conteúdos de compostos fenólicos e flavonoides em plantas de camomila (*Matricaria recutita* L. -Asteraceae) cultivadas *in vivo* e *in vitro*. **Naturalia**, n.32, p.67-77, 2009.

TEALE, W.D., I.A. Paponov and K. Palme. Auxin in action: Signalling, transport and the control of plant growth and development. **Nature Rev. Mol. Cell Biol.**, 7: 847-859, 2006.

TEASDALE, R. D. **Micronutrientes**. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. Cell and tissue culture in forestry. General principles and biotechnology. Dordrech: Martinus Nijhoff. p. 17-49, 1987.

TELEF N, STAMMITTI-BERT L, MORTAIN-BERTRAND A, MAUCOURT M, CARDE JP, ROLIN D, GALLUSCI P. Sucrose deficiency delays lycopene accumulation in tomato fruit pericarp discs. **Plant Molecular Biology**,62:453-469, 2006.

TERMIGNONI, R. R. **Cultura de Tecidos Vegetais**. Porto Alegre: Editora da UFRGS. 2005.

TISSERAT, B.; ESAN, E.B.; MURASHIGE, T. Somatic embryogenesis in angiosperms. - **Hort. Rev.** 1: 1-78, 1979.

TORRES, AC, CALDAS LS, BUSO JA. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPQ. v.2, p.524, 1999.

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.

THOMPSON, M. R.; THORPE, T. A. Analysis of Protein Patterns during Shoot Initiation in Cultured *Pinus radiata* Cotyledons. **Journal of Plant Physiology**, v. 151, p. 724-734, 1997.

THOMPSON, A.L., LOVE, S.L., SOWOKINOS, J.R., THORNTON, M.K. & SHOCK, C.C. Review of the sugar end disorder in potato (*Solanum tuberosum* L.). **American Journal of Potato Research**, 85: 375-386, 2008.

THORPE, T. A: Physiology of bud induction in conifers *in vitro*. In: HANOVER, J. W. and D. E. KEATHLEY (eds.): Genetic Manipulation of Woody Plants, p. 167-184. **Plenum**, New York, 1988.

TRAUTMANN, I. A.; VISSER, J. H. Development of a liquid flow-through system to inhibit browning in callus cultures of guayule (*Partheniumargentatum* Gray). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 16:39-46, 1989.

TRICK, H. N.; PUESCHEL, C. Cytochemical of pit plugs in *Bossia californica* (Corallinales, Rhodophyta). **Phycologia**, vol. 29: 403-409. 1990.

URBANETZ, C.; TAMASHIRO, J. Y.; KINOSHITA, L. S. Chave de identificação de espécies lenhosas de um trecho de Floresta Ombrófila Densa Atlântica, no Sudeste do Brasil, baseada em caracteres vegetativos. **Biota Neotropica**, vol. 10, n. 2: 349-398. 2010.

VALDUGA E.; VALÉRIO A.; TREICHEL H.; JÚNIOR A. F.; LUCCIO M. D. Optimization of the production of total carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) using response surface technique. **Food Bioprocess Technol** 2: 415–421; 2009.

VAN DEN ENDE, W.; A. VAN LAERE, Purification and properties of a neutral invertase from the roots of *Cichoriumintybus*, **Physiol. Plant** 93: 241–248, 1995.

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.). **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.14, n.4, p.592-597, 2012.

VERMERRIS, W., NICHOLSON, R. **Phenolic compound biochemistry**. Springer Science, London, 2008. 267p.

VERPOORTE, R.; MARASCHIN, M. **Engenharia do Metabolismo de Plantas Mediciniais**. In: YUNES, RA & CALIXTO JB (Eds.) – Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. Argos Editora Universitária. Ch. 11: 381 – 432. 2001.

VIANA, A. M.; MAZZA, M. C.; MANTELL, S. **Applications of biotechnology for the conservation and sustainable exploitation of plants from Brazilian Rain Forest**. In: BENSON, E. E. (Ed.) – Plant



Conservation Biotechnology, London: Taylor and Francis Ltd. Ch. 18: 277 – 299. 1999.

VIÉGAS, R.A.; SILVEIRA, J.A.G. Ammonia assimilation and proline accumulation in young cashew plants during long term exposure to NaCl-salinity. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 11:153-159, 1999.

VIEIRA, E. C.; GAZINELLI, G.; MARES-GUIA, M. **Bioquímica celular e biologia molecular**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 1991. 360 p.

VILA, S.; GONZALEZ, A.; REY, H.; MROGINSKI, L. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Cedrela fissilis*. **Biologia Plantarum**, vol. 53, n. 2: 383 – 386. 2009.

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

WEWETZER, A. Callus cultures of *Azadirachta indica* and their potential for the production of azadirachtin. **Phytoparasitica**, vol. 26, n. 1: 47 – 52. 1998.

YAMADA, Y.; SATO, F. The photoautotrophic culture of chlorophyllous cells. **Plant Cell Physiology**, v. 19, p. 691-699, 1978.

YAN, M.; XU, C.; KIM, C.; UMC, Y.; BAH, A. A.; GUO, D. Effects of explant type, culture media and growth regulators on callus induction and plant regeneration of *Chinese jiaotou* (*Allium chinense*). **Scientia Horticulturae**, vol. 123: 124 – 128. 2009.

YEMM, E.W.; & WILLIS, A.J. The estimation of carbohydrates in plants extracts by anthrone. **Biochemical Journal**. Colchester. v. 57, p.508-514, 1954.

ZACARIAS, A.A., MORESCO, H.H., HORST, H., BRIGHENTE, I.M.C., MARQUES, M.C.A. & PIZZOLLATI, M.G. **Determinação do teor de fenólicos e flavonoides no extrato e frações de *Tabebuia***

*heptaphylla.In*: 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Santa Maria, Rio Grande do Sul. Setembro/1999, 2007.

ZHANG, X., WANG, C., ZHANG, Y., SUN, Y. AND MOU, Z. The Arabidopsis Mediator complex subunit 16 positively regulates salicylate-mediated systemic acquired resistance and jasmonate/ethylene-induced defense pathways. **Plant Cell**, 24, 4294-4309, 2012.

ZOUINE, J.; HADRAMI, E. Somatic Embryogenesis in *Phoenix dactylifera* L: Effect of Exogenous Supply of Sucrose on Proteins, Sugars, Phenolics and Peroxidases Activities During the embryogenic cell suspension culture. **Biotechnology**, 3 (2): 114- 118, 2007.