

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

**ESTABELECIMENTO DE CULTIVOS CELULARES DE
CANELA SASSAFRÁS (*Ocotea odorifera* Mez.), ANÁLISE DE
CRESCIMENTO E CARACTERIZAÇÃO CITOQUÍMICA.**

ANA CARLA OLTRAMARI

FLORIANÓPOLIS, MARÇO DE 1999.

R291



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

**ESTABELECIMENTO DE CULTIVOS CELULARES DE
CANELA SASSAFRÁS (*Ocoteia odorifera* Mez.), ANÁLISE DE
CRESCIMENTO E CARACTERIZAÇÃO CITOQUÍMICA.**

Relatório apresentado ao Curso de
Agronomia da Universidade Federal de
Santa Catarina, como requisito parcial à
obtenção do título de Engenheira
Agrônoma.

ANA CARLA OLTRAMARI

FLORIANÓPOLIS, MARÇO DE 1999.

AGRADECIMENTOS

- A minha família, pela paciência e apoio durante todos os anos de estudo.
- Aos meios tios Lígia e Décio Perruzzo, Clarice Peruzzo e Angelo Ferraro.
- Ao meu Orientador Marcelo Maraschin, pelos ensinamentos e sugestões.
- Aos meus amigos de Roque González Bohora Justino, Claudete Santa Catarina, Ione Iolanda Justino pela ajuda.
- A todos que de uma forma ou outra colaboram com minha formação.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. DESCRIÇÃO DA ESPÉCIE	1
1.2. HISTÓRIA DA EXTRAÇÃO DE ÓLEO SASSAFRÁS EM SANTA CATARINA	2
1.3. ESTUDO DE MERCADO	4
1.4. PROPRIEDADES DO SAFROL	10
1.5. CULTURA DE TECIDOS	11
1.6. CULTURAS CELULARES COMO PRODUTORAS DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	13
1.7. VANTAGENS DO SISTEMA DE CULTURAS DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO	14
2. OBJETIVOS	19
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1. CONDIÇÕES DE CULTIVO	20
3.1.1. CULTURAS DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO	20
3.1.2. CULTURA DE CÉLULAS EM MEIO SEMI-SÓLIDO	21
3.1.3. VARIAÇÃO SOMACLONAL E ANÁLISE CITOQUÍMICA	22
4. RESULTADO E DISCUSSÃO	23
4.1. CULTURAS DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO	23
4.2. CULTURA DE CÉLULAS EM MEIO SEMI-SÓLIDO	28
4.3. VARIAÇÃO SOMACLONAL E ANÁLISE CITOQUÍMICA	31
4.3.1 - CARACTERIZAÇÃO CITOQUÍMICA DE CÉLULAS CULTIVADAS EM MEIO SEMI-SÓLIDO	31
4.3.2 - CARACTERIZAÇÃO CITOQUÍMICA EM SUSPENSÕES CELULARES	34
5. PERSPECTIVAS	37
6. CONCLUSÃO	38
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
ANEXO	45

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Dados referentes a quantidade de madeira explorada (m³), total da área explorada (ha) e a média de exploração de madeira/ha de canela sassafrás (*Ocotea odorifera*), durante os anos de 1982-1989*.....4
- Tabela 2. Quantidade (Kg) de safrol extraído de canela sassafrás (*Ocotea odorifera* Mez) em Santa Catarina e exportado nos períodos 1942-47, agosto de 1969 a 1970, 1984, 1982 e de janeiro a setembro de 1988 e a quantidade média de madeira em m³ necessária para a extração do devido óleo.....5
- Tabela 3. Preços médios (US\$) de safrol (Kg) extraído da canela sassafrás (*Ocotea odorifera* Mez) e exportado, para os anos de 1960, 1970, 1987, 1989, 1990.(Rexter & Dobler, 1992) e 1991 (Cassava, 1992).....6
- Tabela 4. Dados da variação de preços (US\$) de safrol no mercado externo no período 1992-95, fornecidos pelo CNI (Sistema de Estatística de Comércio Exterior), 1996 fornecidos pelo Orient Resources Company (1995-97) e 1997-98, segundo os dados obtidos através do sistema ALICE (Importações Efetivas Dados Preliminares Consulta por Mercadoria) da SECEX (Secretaria do Comércio Exterior) - DECEX (Departamento de Operações de Comércio Exterior) - SERPRO (Serviço Federal de Processamento de Dados).....7
- TABELA 5. Total de exportação de safrol de Canela Sassafrás (*Ocotea odorifera*) realizado no Porto de Paranaguá no Estado do Paraná, registrado pelo Posto de Controle e Fiscalização de Despachos Aduaneiros do Sistema de Controle de Exportações de Produtos Florestais pertencente ao Ministério do Meio Ambiente e da Amazônia Legal, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis.....9
- Tabela 6. Metabólitos secundários produzidos por cultura de tecidos de plantas em concentrações superiores àquelas encontradas em plantas intactas.....12

Tabela 7. Duração das fases de crescimento de culturas células em suspensão de *Ocotea odorifera*, nos meios MS, WPM e LPm adicionados de Picloram - (P) (10 μ M) e cinetina - (K) (1 μ M) e MC24 (MS adicionado de 2,4-D (9,04 μ M), BAP (8,88 μ M), KIN (13,95 μ M), trinta dias após inoculação.....26

Tabela 8. Peso fresco e peso seco de células de *Ocotea odorifera*, cultivadas em meio líquido, tendo como fonte de inóculo 0,1 g de células, após 40 dias em meio de cultura....27

Tabela 9. Valores de unidades de área das curvas de dissimilação de colônias de células de *Ocotea odorifera*, inoculadas em meio de cultura MS suplementado com Picloram (10 μ M) mais cinetina (1 μ M) e MS suplementado com 2,4-D (9,04 μ M), BAP (8,88 μ M), cinetina (13,95 μ M), após 35 dias em meio de cultura.....30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Curva de dissimilação de suspensão celulares de *Ocotea odorifera* em meio de cultura LPM adicionado de Picloram (10 μ M) e KIN (1 μ M) (LP2).

Figura 2. Curva de dissimilação de suspensão celulares de *Ocotea odorifera* em meio de cultura LPM adicionado de Picloram (10 μ M) e KIN (1 μ M) (LP4).

Figura 3. Curva de dissimilação de suspensão celulares de *Ocotea odorifera* em meio de cultura MS adicionado de 2,4-D (9,04 μ M), BAP (8,88 μ M) e KIN (13,95 μ M) (MC2).

Figura 4. Curva de dissimilação de suspensão celulares de *Ocotea odorifera* em meio de cultura MS adicionado de 2,4-D (9,04 μ M), BAP (8,88 μ M) e KIN (13,95 μ M) (MC3).

Figura 5. Curva de dissimilação de suspensão celulares de *Ocotea odorifera* em meio de cultura MS adicionado de 2,4-D (9,04 μ M), BAP (8,88 μ M) e KIN (13,95 μ M) (MC5).

Figura 6. Curva de dissimilação de suspensão celulares de *Ocotea odorifera* em meio de cultura MS adicionado de Picloram (10 μ M) e KIN (1 μ M) (MP7).

Figura 7. Curva de dissimilação de suspensão celulares de *Ocotea odorifera* em meio de cultura WPM adicionado de Picloram (10 μ M) e KIN (1 μ M) (WP2).

Figura 8. Curva de dissimilação em meio semi-sólido de cultura de células de *Ocotea odorifera* em meio de cultura WPM adicionado de Picloram (10 μ M) e KIN (1 μ M) (WP2).

Figura 9. Curva de dissimilação em meio semi-sólido de cultura de células de *Ocotea odorifera* em meio de cultura MS (MP1) adicionado de Picloram (10 μ M) e KIN (1 μ M).

Figura 10. Curva de dissimilação em meio semi-sólido de cultura de células de *Ocotea odorifera* em meio de cultura MS (MP2) adicionado de Picloram (10 μM) e KIN (1 μM).

Figura 11. Curva de dissimilação em meio semi-sólido de cultura de células de *Ocotea odorifera* em meio de cultura MS (MP5) adicionado de Picloram (10 μM) e KIN (1 μM).

Figura 12. Curva de dissimilação em meio semi-sólido de cultura de células de *Ocotea odorifera* em meio de cultura MS (MP6) adicionado de Picloram (10 μM) e KIN (1 μM).

Figura 13. Aspectos dos calos de folha de *Ocotea odorifera* cultivados em meios de cultura MS e WPM, adicionados de Picloram (10 μM) e KIN (1 μM).

Figura 14. Curva de dissimilação em meio semi-sólido de cultura de células de *Ocotea odorifera* em meio de cultura MC24 (MC2) adicionado de 2,4-D (9,04 μM), BAP (8,88 μM) e KIN (13,95 μM).

Figura 15. Curva de dissimilação em meio semi-sólido de cultura de células de *Ocotea odorifera* em meio de cultura MC24 (MC4) adicionado de 2,4-D (9,04 μM), BAP (8,88 μM) e KIN (13,95 μM).

Figura 16. Curva de dissimilação em meio semi-sólido de cultura de células de *Ocotea odorifera* em meio de cultura MC24 (MC6) adicionado de 2,4-D (9,04 μM), BAP (8,88 μM) e KIN (13,95 μM).

Figura 17. Curva de dissimilação em meio semi-sólido de cultura de células de *Ocotea odorifera* em meio de cultura MC24 (MC5) adicionado de 2,4-D (9,04 μM), BAP (8,88 μM) e KIN (13,95 μM).

Figura 18. Curva de dissimilação em meio semi-sólido de cultura de células de *Ocotea odorifera* em meio de cultura LPm (LP) adicionado de Picloram (10 μM) e KIN (1 μM).

Figura 19. Aspecto das populações celulares cultivadas em meios de cultura semi-sólidos desprovidos de corante aos 15 dias após a inoculação; **A)** Células em meio de cultura MS isenta de regulador de crescimento (200x); **B)** Células em meio de cultura MS adicionado de Picloram (10 μ M) e KIN (1 μ M) (200x); **C)** Células em meio MC24 (200x); **D)** Células em meio de cultura WPM Picloram (10 μ M) e KIN (1 μ M) (200x); **E)** Células em meio de cultura WPM desprovidos de reguladores (200x); **F)** Células em meio de cultura LPm isenta de reguladores (200x); **G)** Células em meio de cultura LPm mais Picloram (10 μ M) e KIN (1 μ M) (200x). Me = Matriz extracelular; Pc = Parede celular; Vc = Vacúolo.

Figura 20. Análise citoquímica das populações celulares em meios de cultura semi-sólidos ausentes de reguladores de crescimento coradas com lugol (200x); **A)** Células em meio de cultura MS aos 15 dias (200x); **B)** Células em meio de cultura MS aos 30 dias (200x); **C)** Células em meio WPM aos 15 dias (400x); **D)** Células em meio de cultura WPM aos 30 dias (200x); **E)** Células em meio de cultura LPm aos 15 dias (200x); **F)** Células em meio de cultura LPm aos 30 dias (200x). Pc = Parede celular; Vc = Vacúolo; Am = Amido.

Figura 21. Análise citoquímica das populações celulares em meios de cultura semi-sólidos ausentes de reguladores de crescimento coradas com Sudam. **A)** Células em meio de cultura WPM aos 15 dias (200x); **B)** Células em meio de cultura WPM aos 30 dias (200x); **C)** Células em meio MS aos 15 dias (200x); **D)** Células em meio de cultura MS aos 30 dias (200x); **E)** Células em meio de cultura LPm aos 15 dias (200x); **F)** Células em meio de cultura LPm aos 30 dias (200x). Me = Matriz extracelular; Pc = Parede celular; Vc = Vacúolo.

Figura 22. Análise citoquímica das populações celulares em meios de cultura semi-sólidos ausentes de reguladores de crescimento coradas Azul de Evans e Carmin Acético. **A)** Células em meio de cultura LPm aos 15 dias (200x); **B)** Células em meio de cultura LPm aos 30 dias; **C)** Células em meio WPM aos 15 dias (200x); **D)** Células em meio de cultura WPM aos 30 dias (200x); **E)** Células em meio de cultura MS aos 15 dias (200x); **F)** Células

em meio de cultura MS aos 30 dias (400x). Pc = Parede celular; Vc = Vacúolo; Mb = Membrana.

Figura 23. Análise da presença de grãos de amido nas populações celulares cultivadas em meios de cultura semi-sólidos, na presença de reguladores de crescimento Picloram (10 μM) e KIN (1 μM) e 2,4-D (9,04 μM), BAP (8,88 μM) e KIN (13,95 μM) - MC24; **A**) Células em meio de cultura MS com aos 15 dias (200x); **B**) Células em meio de cultura MS aos 30 dias; **C**) Células em meio MC24 aos 15 dias (200x); **D**) Células em meio de cultura MC24 aos 30 dias; **E**) Células em meio de cultura LPm aos 15 dias (200x); **F**) Células em meio de cultura LPm aos 30 dias (200x); **G**) Células em meio de cultura WPM aos 15 dias; **H**) Células em meio de cultura WPM aos 30 dias (200x). Pc = Parede celular; Vc = Vacúolo; Am = Amido.

Figura 24. Análise da presença de corpos lipídicos nas populações celulares cultivadas em meios de cultura semi-sólidos, na presença de reguladores de crescimento Picloram (10 μM) e KIN (1 μM) e 2,4-D (9,04 μM), BAP (8,88 μM) e KIN (13,95 μM) - MC24; **A**) Células em meio de cultura MC24 com aos 15 dias (400x); **B**) Células em meio de cultura MC24 aos 30 dias (200x); **C**) Células em meio LPm aos 15 dias (200x); **D**) Células em meio de cultura LPm aos 30 dias (200x); **E**) Células em meio de cultura WPM aos 15 dias (200x); **F**) Células em meio de cultura WPM aos 30 dias (200x); **G**) Células em meio de cultura MS aos 15 dias (200x); **H**) Células em meio de cultura MS aos 30 dias (200x). Pc = Parede celular; Vc = Vacúolo; Cl = Corpos lipídicos.

Figura 25. Presença de corpos lipídicos em calos de folha de *Ocotea odorifera*, cultivado em meio de cultura semi-sólido LPm, adicionado de Picloram (10 μM) e KIN (1 μM) (1000x). Cl = Corpos lipídicos.

Figura 26. Presença de corpos lipídicos em calos de folha de *Ocotea odorifera*, cultivado em meio de cultura WPM semi-sólido, adicionado de Picloram (10 μM) e KIN (1 μM) (1000x). Vc = Vacúolo; Pc = Parede celular.

Figura 27. Células coradas com Azul de Evans e Carmim Acético, as quais foram cultivadas em meios de cultura semi-sólidos, na presença de reguladores de crescimento Picloram (10 μM) e KIN (1 μM) e 2,4-D (9,04 μM), BAP (8,88 μM) e KIN (13,95 μM) - MC24. **A)** Células em meio de cultura MC24 com aos 15 dias (200x); **B)** Células em meio de cultura MC24 aos 30 dias (200x); **C)** Células em meio MS aos 15 dias (200x); **D)** Células em meio de cultura MS aos 30 dias (200x); **E)** Células em meio de cultura LPm aos 15 dias (200x); **F)** Células em meio de cultura LPm aos 30 dias (200x); **G)** Células em meio de cultura WPM aos 15 dias (200x); **H)** Células em meio de cultura WPM aos 30 dias (200x). Pc = Parede celular; Vc = Vacúolo.

Figura 28. Células provenientes de suspensão celular desprovidos de corante aos 15 dias após a inoculação. **A)** Células em meio de cultura MC24 isenta de regulador de crescimento (100x); **B)** Células em meio de cultura WPM (200x); **C)** Células em meio MS (200x); **D)** Células em meio de cultura MS - Picloram (10 μM) e KIN (1 μM) (200x); **E)** Células em meio de cultura LPm mais Picloram (10 μM) e KIN (1 μM) (100x); **F)** Células em meio de cultura LPm mais Picloram (10 μM) e KIN (1 μM) (100x); **G)** Células em meio de cultura WPM mais Picloram (10 μM) e KIN (1 μM) (200x); **F)** Células em meio de cultura LPm (200x). Pc = Parede celular; Vc = Vacúolo.

Figura 29. Análise da presença de grãos de amido das células em suspensão utilizando-se meio de cultura ausente de reguladores de crescimento. **A)** Células em meio de cultura MS aos 15 dias (200x); **B)** Células em meio de cultura MS aos 30 dias (200x); **C)** Células em meio LPm aos 30 dias (200x); **D)** Células em meio de cultura WPM aos 30 dias (400x); **E)** Células em meio de cultura LPm aos 15 dias (200x); **F)** Células em meio de cultura WPM aos 15 dias (200x). Pc = Parede celular; Vc = Vacúolo; Am = Amido.

Figura 30. Presença de grãos de amido em células de raiz de *Ocotea odorifera*, cultivadas em meio de cultura LPm, aos 30 dias após a inoculação (1000x). Vc = Vacúolo; Am = Amido.

Figura 31. Análise da presença de corpos lipídicos das células em suspensão utilizando-se meio de cultura ausente de reguladores de crescimento. **A)** Células em meio de cultura MS aos 15 dias (200x); **B)** Células em meio de cultura MS aos 30 dias (100x); **C)** Células em meio LPm aos 15 dias (200x); **D)** Células em meio de cultura LPm aos 30 dias (200x); **E)** Células em meio de cultura WPM aos 15 dias (200x); **F)** Células em meio de cultura WPM aos 30 dias (200x). Pc = Parede celular; Vc = Vacúolo; Cl = Corpos lipídicos.

Figura 32. Análise citoquímica de células em suspensão, ausentes de reguladores de crescimento coradas Azul de Evans e Carmin Acético. **A)** Células em meio de cultura WPM aos 15 dias (200x); **B)** Células em meio de cultura WPM aos 30 dias (400x); **C)** Células em meio MS aos 15 dias (100x); **D)** Células em meio de cultura MS aos 30 dias (200x); **E)** Células em meio de cultura LPm aos 15 dias (200x); **F)** Células em meio de cultura LPm aos 30 dias (200x). Pc = Parede celular; Vc = Vacúolo; Me = Matriz extracelular.

Figura 33. Avaliação de células provenientes de suspensões celulares coradas com Lugol, na presença de reguladores de crescimento Picloram (10 μM) e KIN (1 μM) e 2,4-D (9,04 μM), BAP (8,88 μM) e KIN (13,95 μM) - MC24. **A)** Células em meio de cultura MS com aos 15 dias (200x); **B)** Células em meio de cultura MS aos 30 dias (400x); **C)** Células em meio LPm aos 15 dias (200x); **D)** Células em meio de cultura LPm aos 30 dias (400x); **E)** Células em meio de cultura MC24 aos 15 dias (200x); **F)** Células em meio de cultura MC24 aos 30 dias (200x); **G)** Células em meio de cultura WPM aos 15 dias (400x). **H)** Células em meio de cultura WPM aos 30 dias (200x). Pc = Parede celular; Vc = Vacúolo; Am = Amido.

Figura 34 - Presença de grãos de amido em células de raiz de *Ocotea odorifera*, cultivadas em meio de cultura LPm na presença de reguladores de crescimento Picloram (10 μM) e KIN (1 μM), aos 30 dias após a inoculação (1000x). Vc = Vacúolo; Am = Amido.

Figura 35. Avaliação de células provenientes de suspensões celulares coradas com Sudam, na presença de reguladores de crescimento Picloram (10 μM) e KIN (1 μM) e 2,4-D

(9,04 μ M), BAP (8,88 μ M) e KIN (13,95 μ M) - MC24 (200x); **A**) Células em meio de cultura MS com aos 15 dias (400x); **B**) Células em meio de cultura MS aos 30 dias (200x); **C**) Células em meio LPm aos 15 dias (200x); **D**) Células em meio de cultura LPm aos 30 dias (200x); **E**) Células em meio de cultura WPM aos 15 dias (200x); **F**) Células em meio de cultura WPM aos 30 dias (200x); **G**) Células em meio de cultura MC24 aos 15 dias (200x); **H**) Células em meio de cultura MC24 aos 30 dias (200x). Pc = Parede celular; Vc = Vacúolo; Cl = Corpos lipídicos.

Figura 36. Células coradas com Azul de Evans e Carmim Acético, as quais foram cultivadas em meio de cultura semi-sólido, na presença de reguladores de crescimento Picloram (10 μ M) e KIN (1 μ M) e 2,4-D (9,04 μ M), BAP (8,88 μ M) e KIN (13,95 μ M) - MC24. **A**) Células em meio de cultura MS com aos 15 dias (200x); **B**) Células em meio de cultura MS aos 30 dias (200x); **C**) Células em meio LPm aos 15 dias (400x); **D**) Células em meio de cultura LPm aos 30 dias (200x); **E**) Células em meio de cultura WPM aos 15 dias (200x); **F**) Células em meio de cultura WPM aos 30 dias (200x); **G**) Células em meio de cultura MC24 aos 15 dias (200x); **H**) Células em meio de cultura MC24 aos 30 dias (200x). Pc = Parede celular; Vc = Vacúolo.

LISTA DE ABREVIATURAS

WPM = Loyd & McCown, 1980

KIN = Cinetina

BAP = 6-benzilamino purina

2,4-D = Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

LPm = Von Arnold & Ericksson, 1981

Picloram = Ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico

MS = Murashige & Skoog, 1962

ANA = Ácido naftalenoacético

1. INTRODUÇÃO

1.1. Descrição da Espécie

A canela sassafrás (*Ocotea odorifera* Mez.) é uma espécie lenhosa que pertence à família *Lauraceae*, a qual é encontrada em todo o estado de Santa Catarina e em maior quantidade na Floresta Ombrófila Densa (Floresta Atlântica) e Floresta Ombrófila Mista (Floresta com Araucária), nesta última sendo menos freqüente. Ocorria com elevada freqüência no Alto Vale do Itajaí, onde foi bastante abundante, chegando a representar 1/3 da madeira das matas. No Brasil, esta espécie se encontra dispersa do sul da Bahia até o Rio Grande do Sul (Reitz *et al.*, 1978).

Segundo Salomão *et al.* (1992), a canela sassafrás ocorre entre as latitudes 8°45' (Pernambuco) a 31°12'S (Rio Grande do Sul) e de 33°52' a 59°09' de longitude oeste. Esta espécie se encontra em altitudes que variam de 10 a 1200 m, com temperaturas médias anuais variando de 12°C a 23°C (Carvalho, 1994). De hábito arbóreo perene, atinge 20 - 25 m de altura, com 50 - 70 cm de diâmetro a altura do peito com tronco geralmente tortuoso, escavado, com quinas pronunciadas e casca cinza escura (Reitz *et al.*, 1978). Apresenta abundante brotações de gemas, copa densa, flores hermafroditas e floração intensa que nem sempre corresponde a uma abundante frutificação (Carvalho, 1994).

Na área de ocorrência da canela sassafrás há uma grande quantidade de plantas jovens que são adaptadas e crescem no interior da mata úmida e sombria. Seu crescimento é relativamente lento nos primeiros anos, não se regenerando em matas secundárias e capoeirões, sendo que as tentativas de reflorestamento em campo aberto não tiveram êxito. Sua madeira foi muito utilizada para a fabricação de móveis, embarcações, construção civil, marcenaria, esquadria, caxilhos, enquanto a biomassa de raízes, casca e folhas foi amplamente utilizada para a extração do óleo essencial contendo safrol (Reitz *et al.*, 1978).

Na medicina popular a raiz, a casca, o caule, as folhas são usadas como sudoríficas, anti - reumáticas e diuréticas (Futuro *et al.*, 1998).

1.2. História da Extração de Óleo Sassafrás em Santa Catarina

A extração do óleo de sassafrás de *Ocotea odorifera* iniciou no Brasil em meados dos anos 40, no Estado de Santa Catarina, mais especificamente no município de Rio do Sul, pelo industrial Otto Grimm. O óleo extraído era comercializado no mercado externo com o nome de "essência de sassafrás brasileiro". Antes da entrada deste produto no mercado, o abastecimento dava-se a partir do óleo de sassafrás americano extraído da raiz da planta denominada Lauraca, a qual possuía pouca quantidade de safrol comparativamente a espécie brasileira (Rexter & Dobler, 1992).

Com o grande êxito do óleo no mercado a indústria de Otto Grimm não teve capacidade de atender a demanda, fato que permitiu a instalação de novas indústria de extração no estado Santa Catarina, chegando a 150 fábricas (Duarte da Silva, 1989). Segundo Rexter & Dobler (1992), durante a Segunda Guerra Mundial, a indústria brasileira de extração de óleo sofreu um grande impulso devido a necessidade de óleo de sassafrás, principalmente pelos Estados Unidos da América. A grande demanda deste óleo gerou a necessidade de criação de um processo de controle de qualidade. Em função disto, o produto era classificado em em dois grupos: óleo de primeira qualidade, restrito ao óleo de sassafrás americano, usado para a industria de produtos alimentícios, farmacêuticos e industria e óleo de segunda qualidade, considerado pelos EUA o óleo produzido no Brasil que era utilizado para a fabricação de inseticidas, fungicidas, perfumes e sabões.

Em 1942, encontravam-se instaladas nos municípios de Blumenau, Rio do Sul, Camboriú, Grão Pará, Itajaí, e Jaraguá do Sul 31 empresas de produção de óleo, sendo que 2/3 do total estavam sediados no município de Rio do Sul. No início de 1948, existiam 35 fábricas somente no município de Rio do Sul, porém em julho do mesmo ano este número foi reduzido para 31. Entre os anos de 1944 a 1947 não se tem conhecimento do número de fábricas existentes, porém as fábricas de Blumenau, Camboriú, Grão Pará, Itajaí, Jaraguá do Sul foram fechadas, havendo a abertura de novas fábricas nos municípios de Bom Retiro, Brusque, Concórdia, Ibirama, Indaial, Itaiópolis, Rodeio e Timbó. Possivelmente, o fechamento de fábricas nestes municípios ocorreu devido à falta de matéria prima, ocasionada pela grande devastação, aliada ao não repovoamento das áreas devastadas. Em 1970 se encontravam no estado 18 fábricas distribuídas em 11 comunidades: o municípios

de Ibirama contava com 4 fábricas, Benedito Novo com 3 fábricas e Taió com 3 fábricas. As demais comunidades apresentavam uma fábrica por local (Rexter & Dobler, 1992).

O levantamento efetuado pela CODESUL, no ano de 1970, mostra que a maioria das fábricas de extração de óleo de sassafrás se ocupava também do comércio de madeira. Com exceção de uma fábrica em Rio Negrinho, as demais se encontram no Vale do Itajaí, região que apresenta o maior índice da canela sassafrás no Estado (Duarte da Silva, 1989).

Santa Catarina foi durante muitos anos o maior exportador de safrol do Brasil, sendo que muitas áreas de mata foram exploradas irracionalmente pelas grandes indústrias de fabricação de óleo. Somente em 1992 o governo brasileiro decretou, através da Secretaria do Meio Ambiente - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e do Recursos Naturais Renováveis a Portaria Nº 06 - N, de 15 de Janeiro de 1992, Art.1º, que incluiu na Lista Oficial de Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção a *Ocotea pretiosa* (Nees) Mez. (canela sassafrás), inserindo-a na categoria : em perigo.

O registro da quantidade de madeira de canela sassafrás que foi explorada no Estado de Santa Catarina começou a ser especificado nas autorizações para desmatamento efetuadas pelo IBAMA de Florianópolis, a partir de 1981. Através de levantamento realizado no IBAMA (Florianópolis) pode-se obter informações da área de desmatamento, município onde ocorreu a exploração e quantidade de madeira explorada.

A exploração de canela sassafrás em Santa Catarina, para o período 1982-1989 ocorreu nos seguintes municípios: Ibirama, Rio Rosinha, Rio do Sul, Monte Carlo, Canoinhas, Botuverá, Gaspar, Atalanta, Angelina, Rio do Campo, Benedito Novo, Indaial, Presidente Nereu, Agrônômica, Itajaí, Blumenau, Itaiópolis, Trombudo Central, Brusque, Agrolândia, Papanduva, Major Vieira, Curitibanos, Apiúna, Irinópolis, Corupá, Timbó, Vidal Ramos, Leoberto Leal, Porto União e Mafra. Durante oito anos foram explorados 209.571,43 m³ de madeira em uma área correspondente a 12.890,23 ha, sendo que a média explorada de madeira por hectare era de 17,912 m³ (Tabela 1). Dados anteriores a 1982 não foram possíveis de ser obtidos, devido ao fato de que as autorizações para desmatamento não especificavam o tipo de espécie a ser explorada, constando somente como madeira de lei e de qualidade, a qual abrangia o corte de canela sassafrás. Nos anos de 1990 - 1992 não foram registradas autorizações para desmatamento. O Brasil passou a importar o safrol em 1991, depois da proibição da exploração da canela sassafrás (EMBRAPA, 1998).

Tabela 1. Dados referentes a quantidade de madeira explorada (m³), total da área explorada (ha) e a média de exploração de madeira/ha de canela sassafrás (*Ocotea odorifera* Mez.), durante os anos de 1982-1989*.

Ano	Total de Madeira Explorada (m ³)	Total da Área Exporada (ha)	Média de Madeira Explorada (m ³)/ ha
1982	2.922,89	124,17	23,539
1983	9.963,40	1.821,84	5,468
1984	35.725,43	2.157,87	16,555
1985	51.803,44	2.812,10	18,421
1986	32.691,49	1.713,53	19,078
1987	47.478,56	2.747,77	17,280
1988	19.173,85	1.136,91	16,864
1989	9.812,37	376,04	26,093
Total	209.571,43	12.890,23	17,912

* Obtidos através da investigação das autorizações de desmatamento efetuados no Estado de Santa Catarina pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), Florianópolis - 1997.

1.3. Estudo de Mercado

Durante os anos de 1942 a 1947, houve uma considerável flutuação na produção de óleo de sassafrás em Santa Catarina devido a Segunda Guerra Mundial. Neste período, os Estados Unidos foi o principal importador de óleo, principalmente devido ao fato de não poder importá-lo do oriente. O decréscimo da produção durante os anos de 1944-47 pode estar relacionado com a volta da abertura do comércio, principalmente com o Japão que era um grande fornecedor de óleo de cânfora (Tabela 2) (Dodsworth, 1948).

Para a extração de 1 Kg de safrol são necessários em média 3 m³ de madeira, (Tabela 2), sendo que em 10 anos, estima-se que Santa Catarina produziu 8103,32 ton. de safrol para abastecer o mercado externo, devastando um volume médio correspondente a 1.012.914,8 m³ de mata nativa.

TABELA 2. Quantidade (Kg) de safrol extraído de canela sassafrás (*Ocotea odorifera* Mez.) em Santa Catarina e exportado nos períodos 1942-47, agosto de 1969 a 1970, 1984, 1987 e de janeiro a setembro de 1988 e a quantidade média de madeira em m³ necessária para a extração do devido óleo.

Ano	Safrol (Kg)	Madeira explorada (m ³)
1942	124.260	15.532,5
1943	210.575	26.321,8
1944	591.947	73.993,4
1945	530.667	66.333,4
1946	367.665	45.958,1
1948	330.923	41.365,4
1969-1970	1799.000	224.875,0
1984	2.154.000	269.250,0
1987	1.302.362	162.795,25
1988	691.919	86.489,9
Total	8.103.318	1.012.914,8

? FONTE: ?

No contexto econômico, o preço do safrol (Tabela 3) produzido em Santa Catarina teve um aumento significativo, quando se compara os preços praticados nos anos 60 e 70 com os preços do final dos anos 80 e início dos anos 90. Possivelmente, este fato esteja relacionado com a baixa disponibilidade de matéria prima para a sua extração.

Tabela 3. Preços médios (US\$) de safrol Kg extraído da canela sassafrás (*Ocotea odorifera* Mez.) e exportado, para os anos de 1960, 1970, 1987, 1989, 1990, 1991, (Rexter & Dobler, 1992).

Ano	Preços médios (US\$)
1960	1,90
1970	1,00
1987	4,00 a 7,20
1989	3,43
1990	3,23
1991	4,20 a 8,50

Segundo pesquisa feita por Rexter & Dobler (1992), através dos dados obtidos na CACEX em 1992, as quantidades os países importadores de óleo de sassafrás brasileiro foram:

- De agosto de 1969 até junho 1970 foram exportados 1.799.000 Kg de óleo, para os EUA (48,9%), países mediterrâneos (28,2%), França (7,0%), Alemanha (6,6%), Holanda (2,4%) e outros (1,7%).
- De Janeiro a Dezembro de 1987, foram exportados 1.302.362 Kg, cerca de 500.000Kg a menos que em relação ao ano 69/70. Os maiores importadores foram: Japão (46,0%), EUA (27,7%), Itália (22,6%), Espanha (1,9%), Reino Unido (1,2%) e outros (0,6%).
- De Janeiro a Setembro de 1988, foram exportados 910.000 Kg de óleo para USA (43,4%), Itália (31, 2%), Japão (18,0%), Israel (5,0%) e França e Espanha (2,3%).
- De Janeiro a Dezembro de 1989, foram exportados 417.608 Kg de óleo para Itália (44,6%), Japão (30,8%), EUA (23,8%) e 0,8% para outros países.
- De Janeiro a Dezembro de 1990, foram exportados 306.222 Kg de óleo para o Japão (63,0%), Itália (30,0%) e EUA (6,0%) e 1,0% para outros países.
- De Janeiro a Novembro de 1991, foram exportados 255.073 Kg de óleo para o Japão (56,0%), Itália (34,0%) e USA (10,0%).

Entre os principais compradores do óleo de sassafrás brasileiro aparecem os EUA, Japão e Itália, sendo variável a quantidade de óleo importado por estes países de ano para

ano. Desde 1987 notou-se uma queda contínua de exportação de óleo, fato decorrente da escassez de matéria prima.

Dados oficiais de exportação foram fornecidos até o ano de 1992 pela CACEX. A partir deste ano, este órgão foi extinto, sendo transferida sua função para o Ministério do Comércio Exterior. Com a extinção da CACEX, grande parte dos dados de exportação de safrol tornou-se inacessível, devido à dispersão e/ou extravio dos dados estatísticos.

Nos últimos anos o preço do safrol vem sofrendo uma crescente valorização no mercado externo, aspecto que pode estar relacionado à escassez do produto no mercado, devido principalmente a ser um produto cujo sistema de produção baseia-se no extrativismo (Tabela 4).

Tabela 4. Dados da variação de preços (US\$) de safrol no mercado externo no período 1992-98.

ANO	PREÇO EM MÉDIO (US\$)
1992*	—
1993*	4,77
1994*	2,82
1995*	2,49
1996**	6,00
1997***	23,13
1998***	14,00

*Dados fornecidos pelo CNI (Sistema de Estatística de Comércio Exterior).

**Dados fornecidos pelo Orient Resources Company.

***Dados obtidos através do sistema ALICE (Importações Efetivas Dados Preliminares Consulta por Mercadoria) da SECEX (Secretaria do Comércio Exterior) - DECEX (Departamento de Operações de Comércio Exterior) - SERPRO (Serviço Federal de Processamento de Dados).

A partir da proibição do corte da canela sassafrás, o Brasil passou da condição de país exportador para importador de safrol, conforme os dados obtidos na FIESC (Federação das Indústrias do Estado de Santa Catarina), através do CNI (Sistema de Estatística de Comércio Exterior) e sistema ALICE (Importações Efetivas Dados Preliminares Consulta por Mercadoria) da SECEX (Secretaria do Comércio Exterior) - DECEX (Departamento de

Operações de Comércio Exterior). Não foi encontrado nenhum dado de exportação de safrol na consulta feita aos sistemas em Novembro de 1998.

A estatística de exportação de óleos essenciais (NBM/SH : 3301) de canela sassafrás registrado pelo Posto de Controle e Fiscalização de Despachos Aduaneiros do Sistema de Controle de Exportações de Produtos Florestais, pertencente ao Ministério do Meio Ambiente e da Amazônia Legal (IBAMA), tendo como base os despachos de exportação extraídos do SISCOMEX, no Estado do Paraná (Porto de Paranaguá), demonstraram que no ano de 1995 foram exportadas 37,62 ton. de safrol. No período de 1996-97 não houve exportação e em 1998 (Janeiro e Agosto) foram exportadas 14,96 toneladas, com um preço médio foi de US\$ 5,60 ao Kg no ano de 1995 e US\$ 6,65 no ano de 1998 (TABELA 5). Estes resultados foram levantados a partir de 1993, ano em que foi implantado o SISCOMEX (Sistema Integrado de Comércio Exterior).

Como pode ser observado na Tabela 5, o corte de canela sassafrás continua ocorrendo no Estado de Santa Catarina, pela Indústria de Óleo Safrobrás LTDA - CGC/MF: 77.150.696/0002-48 - CANOINHAS/SC e Udo Beltramini - Indústria Comércio de Madeiras LTDA - CGC/MF: 83.713.016/0001-79 - IBIRAMA/SC.

Durante muitos anos, o safrol contribuiu com uma grande arrecadação de impostos e gerou centenas de empregos, porém atualmente o óleo de sassafrás é importado da China e do Vietnã que o obtêm de *Cinnamomum camphora* (*Lauraceae*). No entanto, há a possibilidade do governo chinês proibir sua exploração, devido ao risco de extinção da espécie. A pesquisa para descobrir formas alternativas de produção de safrol sem depender do extrativismo poderá vir a ser futuramente uma solução para abastecer o mercado.

TABELA 5. Total de exportação de safrol de Canela Sassafrás (*Ocotea odorifera* Mez.) realizado no Porto de Paranaguá no Estado do Paraná, registrado pelo Posto de Controle e Fiscalização de Despachos Aduaneiros do Sistema de Controle de Exportações de Produtos Florestais pertencente ao Ministério do Meio Ambiente e da Amazônia Legal, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis.

Data do Produto	Número Despacho	Registro Exportação	Exportador	País Importador	Preço (US\$)	Unidade	Quantidade	Valor (US\$)
27/01/95	00801/95	95/0067577-001	Ind. de Óleo Safr ¹	Japão	6,00	TON	5,50	33.000,00
19/05/95	040098/95	95/036859-001	Udo Beltramini ²	Japão	5,20	TON	32,12	167.024,00
28/01/98	00352/98	98/00670540-001	Ind. e Com de Óleos ³	Estados Unidos	6,65	TON	14,96	99.484,00

¹ Indústria de Óleo Safrobrás LTDA - CGC/MF: 77.150.696/0002-48 - Rua Jacob Schever, 167 - Caixa Postal 351 - CANOINHAS/SC.

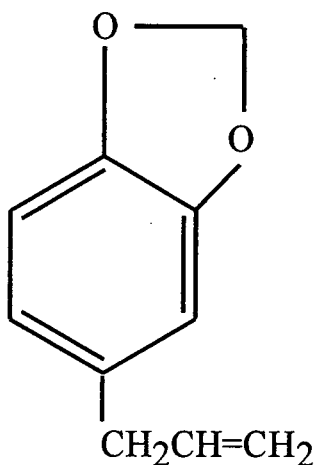
² Udo Beltramini - Indústria Comércio de Madeiras LTDA - CGC/MF: 83.713.016/0001-79-Rua 25 de Julho , 1767 - Caixa Postal 17 - IBIRAMA/SC.

³ Indústria e Comércio de Óleos Irati LTDA - CGC/MF: 77.015.931/0001-98- Rua Benedito Moraes, 406 - IRATI/PR.

1.4. Propriedades do Safrol

Safrol é um composto natural alilbenzênico, incolor, ligeiramente amarelo com um odor de sassafrás. É insolúvel em água e muito solúvel em álcool. Tal composto é combustível quando exposto ao aquecimento. É um componente que ocorre naturalmente em mais de 70 óleos essenciais derivados de fontes botânicas (por exemplo, *Ocotea odorifera*, *Sassafras albidum*, *Cinnamomum camphora*) (IARC, 1976).

A fórmula estrutural do safrol pode ser observada abaixo:



Safrol : 5-(2-Propenyl)-1,3-benzodioxole; 4-allyl-1,2-methylenedioxybenze

O valor econômico do safrol pode ser medido com base em dois de seus derivados, a heliotropina, que é um fixador de aroma e o butóxido de piperolina, elemento essencial na produção de inseticidas biodegradáveis. A heliotropina fixa aroma em produtos como: perfumes, xampus, batons, loções de barbear, amaciantes de roupa e detergentes líquidos. O butóxido de piperolina é capaz de acelerar a ação do princípio ativo chamado piretro, encontrado em plantas de crisântemo, muito eficiente no combate a insetos (EMBRAPA, 1998).

O safrol é uma substância que foi usada em medicamentos, bebidas, alimentos, inseticidas e na fabricação de heliotropina, sendo também usado em sabão e perfumes e como agente flavorizante em drogas (IARC, 1976).

O uso de safrol em alimentos foi proibido por ser carcinogênico e hepatotóxico, sendo seu uso em produtos de banho controlado. É esperado que esta substância química induza vômitos, alucinações e convulsões.(IARC, 1976).

1.5. Cultura de Tecidos

A propagação vegetativa convencional de *Ocotea odorifera*, baseada na estaquia apresenta baixa eficiência (Molinari, 1989). O poder germinativo apresenta resultados aleatórios de 30 a 70 % (Carvalho, 1994). Tendo em vista estas limitações, técnicas de cultura de células e tecidos vegetais se constituem em ferramentas que podem ser aplicadas para a micropropagação clonal massal, bem como no desenvolvimento de linhagens celulares com potencial de produção de safrol *in vitro*.

Com exceção da canela (*Cinnamomum* sp.), do louro (*Laurus* sp.) e do abacate (*Persea* sp.), a família Lauracea é constituída de poucas espécies de destaques agrônômicos, sendo a maioria florestais, com escassa literatura em métodos de propagação , notadamente *in vitro*.

Técnicas de cultura de células e tecidos têm possibilitado a obtenção de excelentes resultados com espécies florestais. Todavia, no caso da canela sassafrás há necessidade de se desenvolver métodos de propagação eficientes para que se possa repovoar áreas onde esta espécie já foi praticamente extinta, bem como estabelecer linhagens celulares de comportamento superior, no que se refere à biossíntese do metabólito em tela.

A obtenção de compostos de interesse, via culturas de células e tecidos, apresenta-se como alternativa. Culturas de células *in vitro* têm permitido não apenas a realização de estudos relativos à síntese de compostos, como também o incremento na produção destes, quando comparados com a planta inteira, em condições específicas de cultivo. Independente de condições climáticas, ou circunstâncias políticas, um fluxo constante de produtos de qualidade é assegurado, sem o risco de extinção da espécie de interesse como decorrência de uma ação extrativista exacerbada (Maraschin, 1998).

Estudos de biossíntese de metabólitos secundários utilizando modelos de culturas celulares tem apresentado sucesso, uma vez que a taxa de incorporação de precursores marcados mostra-se usualmente maior neste sistema, em relação à planta intacta (Wijnsma, 1986).

Exemplos de produção *in vitro* de metabólitos secundários que lograram sucesso, na medida em que os níveis de síntese foram superiores em relação à planta intacta, são mostrados na Tabela 6.

Tabela 6. Metabólitos secundários produzidos por cultura de tecidos de plantas em concentrações superiores àquelas encontradas em plantas intactas.

Compostos	Espécies	Teor (g/l)	Razão cultivo/ planta intacta
Antraquinonas	<i>Gallium aparine</i>	0,43	20
	<i>Morinda citrifolia</i>	2,5	8
Berberina	<i>Coptis japonica</i>	1,4	2,6
	<i>Thalictrum minus</i>	0,8	1000
Cafeína	<i>Coffea arabica</i>	-	92
Saponinas	<i>Panax ginseng</i>	-	6,7
Jatorrizina	<i>Disocoreophyllum</i>	-	100
	<i>cumminsii</i>		
Ác. Rosmarínico	<i>Coleus blumei</i>	3,6	5
Chiconina	<i>Lithospermum</i>	1,5 - 4,0	14
	<i>erythrorhizon</i>		
Tripdiolida	<i>Tryterigium wilfordii</i>	0,004	36
Ubiquinona 10	<i>Nicotiana tabacum</i>	-	173
Vomileína	<i>Rauwolfia serpentina</i>	0,057	51

(Fontanel & Tabata, 1987).

1.6. Culturas Celulares como Produtoras de Metabólitos Secundários

O potencial biossintético de culturas celulares derivadas de tecidos distintos pode ser variável em função da totipotência bioquímica das células vegetais. Tal conceito foi introduzido por Zenk (1978) e refere-se à existência do potencial genético e fisiológico necessários à síntese dos metabólitos por parte da célula, independentemente do tecido de origem. Nesse contexto, o potencial biossintético é expresso quando as células são cultivadas em condições semelhantes àquelas encontradas no tecido de origem. Tal afirmação considera, de modo implícito, que a expressão gênica envolvida na biossíntese de metabólitos secundários encontra-se sob um mecanismo de controle do tipo repressão-desrepressão (Mantell & Smith, 1983).

A variação somaclonal existente nas populações celulares de plantas, de ocorrência espontânea, tem sido observada em vários sistemas de cultivo *in vitro*, incluindo cultura de protoplastos (Shepard *et al.*, 1980), calos, suspensões celulares (Smith & Street, 1974) e órgãos (Earle & Gracen, 1984), podendo ter sua origem em fatores genéticos ou epigenéticos (Hadi & Bridgen, 1996). No primeiro caso, mutações pontuais (Evans & Sharp, 1983), alterações de número (poliploidia e aneuploidia) ou de arranjo cromossomal (recombinação), de número de cópias de gens, bem como as variações citoplasmáticas (Tabata *et al.*, 1978) têm sido relatados, sendo estes transmitidos à progênie (Scowcroft & Larkin, 1988). A poliploidia se mostra como o fenômeno de maior frequência de ocorrência nos cultivos *in vitro*, sendo dependente do tipo e concentração de citocininas utilizadas. O aparecimento de células aneuplóides parece ter relação direta com o envelhecimento das culturas (Evans *et al.*, 1987).

Variações de causa epigenética surgem a partir de agentes de meio, bióticos ou abióticos, sendo fenotipicamente estáveis, mas não sexualmente transmitidas às próximas gerações. Como exemplo, a biossíntese de metabólitos secundários é dependente do índice mitótico, o qual é diretamente afetado pela presença de reguladores de crescimento no meio de cultivo. A natureza auxínica ou citocinínica e a concentração destes compostos pode levar a alterações significativas na produção de compostos de interesse. Zenk *et al.* (1975) observaram incrementos significativos na produção de antraquinonas, em suspensões celulares de *Morinda citrifolia*, por ação do ácido naftalenoacético (ANA), enquanto o ácido 2, 4 diclorofenoxiacético (2,4-D) suprimiu totalmente a síntese do composto em tela.

Em estudos posteriores, foram observadas variações amplas na taxa de síntese de antraquinonas em meio contendo variantes químicas do ácido 2,4-D. O substituinte na posição *para* neste composto expressou um drástico efeito no desencadeamento da biossíntese de antraquinonas e no crescimento celular (Zenk, 1978).

Uma terceira e mais simples abordagem das causas da heterogeneidade celular *in vitro*, a considera como resultante de diferenças cinéticas no processo de diferenciação (assincronia), em dado momento da cultura (Petiard *et al.*, 1987). Estudos mais detalhados dos efeitos de fatores envolvidos na biossíntese de metabólitos secundários foram revisados por Butcher (1977), Staba (1980), Mantell & Smith (1983) e Fowler *et al.* (1985), todavia, independente da origem da variação somaclonal, pouco se conhece a respeito das causas e dos mecanismos envolvidos na expressão desse fenômeno (Hadi & Bridgen, 1996).

O estudo do incremento da variabilidade genética em cultivos celulares decorrente da variação somaclonal tem despertado o interesse científico de forma mais intensa a partir do início dos anos 80 e vem sendo alvo de várias análises, sob enfoques moleculares, genéticos, bioquímicos e fisiológicos (Larkin & Scowcroft, 1981; Benzion *et al.*, 1986; Evans *et al.*, 1987; Ohta & Verpoorte, 1992; Mantell *et al.* 1994). Contudo, a despeito do enfoque dado, ressalta-se a importância da estabilidade do padrão característico de uma linhagem selecionada, expresso ao longo das gerações de cultivo. A variabilidade genética em cultivos celulares mostra-se interessante num primeiro momento, todavia, passa a ser um fator negativo em etapas subsequentes à seleção de uma linhagem com alto potencial produtivo (Petiard *et al.*, 1987).

1.7. Vantagens do Sistema de Culturas de Células em Suspensão

No contexto prático, estudos da variabilidade genética de somaclones podem ser melhor desenvolvidos quando se trabalha com culturas celulares em suspensão. Tal sistema possui vantagens sob o cultivo em meio semi-sólido que incluem: rápida taxa de crescimento, contato direto entre meio de cultura e a maioria das células, remoção da polaridade tissular em relação à gravidade, facilidade de remoção/alteração do meio de cultivo e eliminação de gradientes de concentração de nutrientes no meio de cultivo e superfície celular. Resultados experimentais demonstram que este sistema evidencia

maiores taxas de limitação de crescimento, como consequência de uma maior taxa de difusão de nutrientes em relação ao cultivos estáticos. Além disso, não há justificativa econômica para a manutenção de centenas de cultivos em meio semi-sólido, quando a mesma biomassa pode ser cultivada em biorreatores de forma mais simples (Staba, 1980). Parece consenso que cultivos celulares em suspensão são, eventualmente, mais acessíveis à manipulação experimental em relação aquelas mantidos em meio semi-sólido (Reinert & Yedman, 1982). A exploração da variabilidade somaclonal de populações celulares tem nos cultivos em suspensão maior probabilidade de sucesso.

De grande importância vem a ser a definição do momento mais propício para a coleta de biomassa em cultivo, uma vez que nem sempre há coincidência entre a máxima taxa de acúmulo de biomassa e o maior nível de síntese/liberação de compostos de interesse nas culturas *in vitro*. Essa afirmação baseia-se na existência de uma relação inversa entre taxa de crescimento celular e síntese de metabólitos secundários, de modo que as maiores concentrações de metabólitos têm sido encontradas, usualmente, ao final da fase exponencial de crescimento e/ou início da fase estacionária. Modelos de cultivo que envolvem dois estágios têm sido propostos como os mais adequados à produção de metabólitos secundários. No primeiro estágio, as células são cultivadas em condições que priorizam o incremento de biomassa, enquanto no segundo estágio as condições de cultivo favorecem a síntese dos compostos de interesse. Do ponto de vista bioquímico, a geração e o acúmulo de metabólitos secundários, em dado momento da cultura, é função de um balanço que envolve os processos de biossíntese, transformação e degradação (Mantell & Smith, 1983).

Atualmente, existe pelo menos um sistema comercial (Mitsui Petrochemical Industries, Japão) para a produção de chiconina através do cultivo *in vitro* de suspensões celulares de *Lithospermum erythrorhizon*, a uma taxa de 1,5 g.L⁻¹, o que representa um índice 15 vezes superior aquele encontrado na planta intacta (Fujita *et al.*, 1981). Todavia, este exemplo ainda configura uma exceção quanto à exploração comercial de metabólitos secundários oriundos de culturas celulares. O patenteamento de processos biotecnológicos de produção de esteviosídeo (*Stevia rebaudiana*), berberina (*Coptis japonica*), reserpina (*Raulwolfia serpentina*) e ágar (algas), via culturas celulares tem sido requerido no Japão. No Reino Unido, a produção de nicotina a partir de culturas de raízes de *Nicotiana tabacum*

também encontra-se patenteada (Staba, 1980). Além dos sucessos e vantagens comerciais, culturas *in vitro* de células vegetais têm gerado significativas contribuições ao entendimento dos processos de biossíntese de compostos de interesse científico e têm firmado seu potencial como fonte de enzimas de significativo valor econômico, tais como papaína, bromelina, ficina e α e β amilases (Hay *et al.*, 1988).

A utilização de linhagens celulares como fonte de metabólitos secundários deve levar em conta, de modo corrente, a possibilidade de que clones de alta produtividade isolados e subcultivados podem, ao longo do tempo, expressar um declínio em seus níveis de produtividade após uma série de repicagens, fazendo-se necessária uma constante resseleção. Contudo, em muitos destes casos, os clones não derivaram de uma célula única (Funk *et al.*, 1987). A clonagem de células baseia-se em dois métodos amplamente usados : a clonagem de células isoladas (single-cell cloning) e a clonagem de pequenos agregados celulares (Fontanel & Tabata, 1987). A seleção de células isoladas com alto potencial produtivo visa reduzir a possibilidade de heterogeneidade nos subcultivos, porém não a elimina (Ohta & Verpoorte, 1992). Este método, quando comparado à seleção de agregados celulares têm gerado um menor índice de variação somaclonal, ao menos nas primeiras gerações. Stafford (1986) e Evans *et al.* (1987) sugerem que a instabilidade genética observada em linhagens celulares, independente do método de seleção, advém do fato de que o material de origem é intrinsecamente instável. De fato, a instabilidade na produção de metabólitos secundários nos cultivos celulares parece ser a regra. Como exceções, uma linhagem estável de *Euphorbia milli* foi selecionada por Yamamoto *et al.* (1982), acumulando antocianinas em concentrações sete vezes superiores àquela encontrada no calo de origem. Sato & Yamada (1984) selecionaram uma linhagem celular com alta produção de berberina em cultivos de *Coptis japonica*, a qual se manteve estável mesmo após 27 subcultivos. A manutenção de características agronomicamente importantes em somaclones de tomateiro e cana-de-açúcar foi viabilizada através da propagação vegetativa (multiplicação) de materiais selecionados *in vitro* (Evans *et al.*, 1987).

Considerando-se esse fato, a exploração da variabilidade genética contida nos somaclones requer instrumentos de identificação bastante precisos para ser mais eficientemente avaliada. Os processos de seleção de linhagens comumente empregados em culturas celulares são de eficiência relativa, devido às ocorrências de falta de uniformidade

comportamental observadas. Além disso, essas práticas demandam tempo, trabalho intenso e custo econômico elevado. A referida heterogeneidade de comportamento ocorre porque uma linhagem vem a ser uma população de células que expressa algumas características definidas, ainda que cada célula possa não ser idêntica a outra (Staba, 1980).

1.8. Condições de Cultivo e Meio de Cultura

O meio de cultura pode ser influenciado por diversos fatores, entre os mais importantes podem ser considerados: o balanço e tipos de nutrientes minerais, associados à diferentes tipos e concentrações de fitorreguladores (Preece, 1995); as fontes e concentrações de nitrogênio reduzido e/ou oxidado (Durzan, 1985, 1987; Smith & Krikorian, 1990; Niedz, 1994; Halperin, 1995); fontes de carbono (Attree & Fowke, 1983; Schripsma *et al.*, 1990; Carrier *et al.*, 1997; Marachin, 1998); vitaminas, aminoácidos e os complexos orgânicos (George, 1993); o pH (Smith & Krikorian, 1990; George, 1993); as condições ambientais externas como a luz, fotoperíodo, umidade relativa (Robertz, *et al.*, 1990; , Schripsma *et al.*, 1990) e internas, como o tamanho do frasco, tampa, a constituição física e o volume do meio e as trocas atmosféricas (Schripsema *et al.*, 1990; Tulecke, 1997).

Desta forma, quando se pretende trabalhar com uma nova espécie, para se obter a indução da morfogênese *in vitro*, Preece (1995) recomendou testar três diferentes formulações minerais: uma com altas concentrações, uma intermediária e uma de baixa concentrações de sais.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivos a geração de informações relativas a análise do perfil de exportação e importação de óleo sassafrás/safrol, o comportamento celular *in vitro* e a heterogeneidade genética de populações celulares de *Ocotea odorifera*. No que se refere ao último aspecto, os resultados obtidos deverão constituir suporte básico para o direcionamento de futuros trabalhos visando a seleção de linhagens celulares com alto potencial de produção de safrol.

2.1. Objetivos Específicos

2.1.1 - Obter informações da quantidade de madeira de canela sassafrás que foi explorada, através da consulta das autorizações de desmatamento fornecidas pelo IBAMA/SC.

2.1.2 - Levantamento de dados de exportação e importação de safrol.

2.1.3 - Definir a melhor combinação da formulação mineral, para o desenvolvimento de linhagens em meio de cultura semi-sólido e líquido.

2.1.4 - Determinação do padrão de crescimento das culturas celulares em meio líquido e semi-sólido.

2.1.5 - Análise citoquímica e estudos de variabilidade genética das células cultivadas *in vitro*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Condições de Cultivo

As etapas laboratoriais foram desenvolvidas no Laboratório de Morfogênese Vegetal e no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (Departamento de Fitotecnia – CCA- Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC).

Utilizaram-se como fontes de material para elaboração dos experimentos calos de folhas e raízes de canela sassafrás cultivados *in vitro* em meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) adicionado de 32 μM de 2,4-D.

Para os ensaios com cultura de células em meio semi-sólido, foram utilizadas placas de Petri, contendo 25 ml de meio de cultura por placa. Para a multiplicação das culturas em suspensões celulares foram utilizados Erlenmeyers de 250 ml com 25 ml de meio de cultura e mantidas em agitador rotatório orbital a 1 rpm (aparato de Steward). Os valores de biomassa inoculada em cada frasco foram determinados em balança Metteer Toledo PB 302 (amplitude : 310g - min: 0,2) e todas as culturas permaneceram em sala de crescimento na ausência de luz, com temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$.

A análise dos dados foi realizada através de software *Wagen* desenvolvido na Divisão de Farmacognosia da Leiden University -Holanda.

3.1.1. Culturas de células em suspensão

Com o objetivo de definir o meio de cultura basal padrão a ser utilizado para o crescimento celular, biomassa de calos (0,1 g) de culturas de células de raízes mantidas em meio semi-sólido foram inoculadas em meios de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), LPm (von Arnold & Eriksson, 1981) e WPM (Lloyd & McCown, 1980), com base nas considerações sobre o balanceamento dos constituintes salinos feitas por Preece (1995). Aos meios de cultura basais foi adicionado Picloram (Ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico) (10 μM) em combinação com Cinetina -KIN (1 μM). Testou-se também a formulação salina MS suplementada com ácido 2,4-diclorofenoxiacético - 2,4-D (9,04 μM), 6-benzilaminopurina -

BAP (8,88 μM) e Cinetina - KIN (13,95 μM) (Queiroz & Maraschin, 1992). Estes meios de cultura foram suplementados com sacarose (3%) e vitaminas de Morel (Morel & Wetmore, 1951). O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem do meio de cultura.

Após 45 dias, algumas culturas foram filtradas em peneira metálica com diâmetro de poro de 0,2 mm, centrifugadas e colocadas em estufa a 60°C durante uma semana para obtenção do peso seco.

Análises da taxa crescimento celular de cada tratamento em suspensão foram realizadas através da obtenção das curvas de dissimilação (Schripsema, 1991), utilizando-se 4 Erlenmeyers de 250 ml, contendo 25 ml de meio de cultura, nos quais células de raízes. Estes frascos foram fechados com folhas de alumínio e pesados em intervalos de 24 horas. Como controle, foram usados 2 frascos idênticos, contendo somente o meio de cultura.

3.1.2. Cultura de células em meio semi-sólido

Para avaliar o efeito e composição de diferentes meios de cultura, calos de folhas de canela sassafrás com biomassa de 0,8 g foram inoculados nos meios de cultura MS, LPm e WPM. Ao meio de cultura basal foi adicionado Picloram (10 μM) em combinação com KIN (1 μM). Testou-se também o meio de cultura MS suplementado com 2,4-D (9,04 μM), BAP (8,88 μM) e KIN (13,95 μM) (Queiroz & Maraschin, 1992). Estes meios de cultura foram suplementados com sacarose a 3% (p/v), vitaminas de Morel (Morel & Wetmore, 1951) e ágar a 0,7% (p/v). O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem do meio de cultura.

A taxa crescimento celular de cada tratamento em meio semi-sólido foi determinada através da obtenção das curvas de dissimilação, utilizando-se 6 placas de Petry, contendo 25 ml de meio de cultura. Estas placas foram vedadas com parafilme e pesadas em intervalos de 24 horas. Como controle, foram usados 2 placas idênticas, contendo o mesmo volume de meio de cultura.

3.1.3. Variação somaclonal e análise citoquímica

Análise da ocorrência de somaclones variantes foram realizados por microscopia ótica, utilizando-se amostras de células cultivadas em meios de cultura MS, LPm e WPM, adicionados de Picloram (10 μ M) em combinação com KIN (1 μ M) e MS suplementado com 2,4-D (9,04 μ M), BAP (8,88 μ M) e KIN (13,95 μ M) (Queiroz & Maraschin, 1992). As avaliações foram feitas aos 15 e 30 dias após a inoculação. Utilizou-se microscópio ótico Olympus BX40, com câmara fotográfica Olympus PM-C350X.

Paralelamente, estudos citoquímicos foram realizados, empregando-se a técnica de dupla coloração em Azul de Evans (0,1%) e Carmin Acético(2%), para a detecção de proteínas e de seus conjugados (Durzan, 1988). A identificação de clones celulares contendo grãos de amido e corpos lipídicos foi realizado marcando as células com solução de Lugol e Sudam III, respectivamente (Johansen, 1940).

4. RESULTADO E DISCUSSÃO

4.1. Culturas de células em suspensão

A evolução das fases de crescimento das cultura de células em suspensão de *O. odorifera*, nos diferentes meios de cultura e reguladores de crescimento, podem ser observados na Tabela 7.

A curva de crescimento da população LP2 (Figura 1), em meio de cultura LPM adicionado de Picloram (10 μM) e KIN (1 μM), caracterizou-se por uma fase inicial, exponencial e estacionária com 10 dias de duração em cada período. Este comportamento diferiu daquele observado para a população LP4, a qual apresentou fase inicial inferior a 24 horas, fase exponencial de 8 dias e fase estacionária de 24 dias (Figura 2). A integral da área correspondente a curva de dissimilação foi de 35,45 unidades no frasco LP2 e de 36,24 unidades no LP4, indicando uma taxa metabólica similar para as populações em tela. Em ambas as curvas foi observado um padrão quadrático de dissimilação de carbono ($r^2 = 0,96048$ e $0,97005$, para LP2 e LP4, respectivamente).

As populações LP2 e LP4 apresentaram um pequeno incremento de biomassa biomassa em função do tempo, para as condições utilizadas. Muitas vezes a diminuição da intensidade de crescimento pode ser atribuída à existência de condições limitantes ao crescimento, impostas pelo esgotamento dos nutrientes no meio de cultura, podendo ainda ocorrer a acumulação de compostos inibitórios ao crescimento celular (Mantell et al., 1994). A seleção de clones com taxas de crescimento reduzidas pode ser interessante, quando objetiva-se a produção de metabólitos secundários. Tal afirmação tem sido frequentemente encontrada na literatura, a qual indica a existência, em vários casos, de uma relação inversa entre os parâmetros incremento de biomassa e taxas de síntese/acúmulo de metabólitos secundários em cultivos celulares (Ohta & Verpoorte, 1992). A utilização de clones com as características acima referidas poderá ser interessante quando se pensa em um sistema de cultivo em dois estágios, como estratégia de produção/otimização de metabólitos secundários (Maraschin, 1998).

Populações celulares mantidas em meio de cultura MS adicionado de 2,4-D (9,04 μM), BAP (8,88 μM) e KIN (13,95 μM), apresentaram comportamentos distintos

quanto a duração das fases de crescimento das populações MC2, MC3 e MC5 e variação do conteúdo final de biomassa acumulada, refletindo padrões metabólicos diferenciados entre as populações, também neste meio de cultura.

A população MC2 apresenta uma fase inicial longa, com 12 dias, fase exponencial de 10 dias e 18 dias de fase estacionária, este padrão de crescimento proporcionou maior perda de peso por dissimilação de carbono, apresentou uma área de 230,62 unidades, descrita pela integral da área da curva de dissimilação (Figura 3). A população MC3 apresentou uma fase inicial de curta duração (menor que 24 horas), e 8 e 4 dias para as fases exponencial e estacionária, respectivamente (Figura 4). A população MC5 evidenciou um comportamento semelhante para a fase inicial, diferindo quanto às fases exponencial (5 dias) e estacionária (25 dias), respectivamente (Figura 5). O acúmulo de biomassa nas últimas duas populações foi menor, comparativamente a população MC2, demonstrando uma área para correspondente a integral da curva de dissimilação de 66,23 para o meio MC3 e 81,56 para o meio MC5 (Figuras 4 e 5).

População celular cultivada em meio de cultura MS, adicionado de Picloram (10 μM) e KIN (1 μM) (MP7), apresentou uma fase inicial menor que 24 horas, fase exponencial de 7 dias e um fase estacionária de 22 dias (Figuras 6). A integral da área da curva de dissimilação referente à população foi de 128,93 unidades.

A formulação salina MS tem sido amplamente utilizada em sistemas de produção de metabólitos secundários *in vitro*. Segundo Whitmer et al. (1998), o meio de cultura MS adicionado de auxinas, promove acúmulo de alcalóides em células cultivadas em meio líquido de *Catharanthus roseus*. A produção do antifúngico espirostano (saponina) foi obtida a partir de suspensões celulares de *Solanum chrysitrichum* em meio de cultura MS, com uma concentração de sacarose de 30 a 45 g/l (Villarreal et al., 1997). Já formulação salina LPM é largamente utilizada na indução de embriogênese somática em sistemas de suspensões celulares em coníferas, principalmente em *Picea glauca* e *P. engelmannii* (Roberts et al., 1990), *P. rubens* (Harry & Torpe, 1991).

O padrão de crescimento de calos em meio de cultura WPM (WP2) adicionado de Picloram (10 μM) e KIN (1 μM) (WP2), apresentou uma fase inicial menor que 24 horas, 9 dias para a fase exponencial e uma fase estacionária que prolongou-se por um período de 21

dias (Figura 7). A área da curva de dissimilação obtida para esta população foi de 72,04 unidades.

A população celular cultivada no meio WPM apresentou menor perda de dissimilação de carbono, em relação ao meio MS, para uma mesma composição de reguladores de crescimento. Esta diferença pode se justificada devido, principalmente, à composição salina do meio WPM que apresenta menor concentração total de nitrogênio (15,5 mM), comparativamente à solução salina MS (60mM).

Os compostos que suplementam os meios de cultura, principalmente os reguladores de crescimento, exercem influências na taxa mitótica e na síntese de metabólitos secundários (George & Sherrington, 1984). Muitas vezes, auxinas como o 2,4-D agem como fortes repressoras do metabolismo secundário em culturas de células, bem como moduladoras do processo de crescimento de células e diferenciação celular (Lindsey & Yeoman, 1987; Sakuta & Komamine, 1987). Já o Picloram não é um regulador de crescimento comumente utilizado em plantas, tendo sido usado para a promover incrementos na taxa de crescimento de *Taxus* sp. (Ketchum & Gibson, 1996). Segundo Furmanowa et al. (1997), a utilização de Picloram (10 μ M) melhorou o crescimento de calos em meio de cultura WR e B5, porém não mostrou efeitos sobre a taxa biossintética de taxol.

A determinação do tempo de residência de uma população celular em um meio de cultura é de fundamental importância nos cultivos de células em suspensão, porque otimiza o sistema de produção de compostos com potencial comercial. A análise de crescimento *in vitro* assume importância na medida em que se define o intervalo de repicagens, a uniformidade genética das populações em cultivo, define a taxa de incremento de incremento de biomassa na unidade de tempo e possibilita o estudo relativo deste último parâmetro com a síntese de metabólitos de interesse (Maraschin, 1998).

Tabela 7. Duração das fases de crescimento de culturas células em suspensão de *Ocotea odorifera*, nos meios MS, WPM e LPm, adicionados de Picloram - (P) (10 µM) e Cinetina - (K) (1µM) e MC24 (MS adicionado de 2,4-D (9,04 µM), BAP (8,88 µM), cinetina (13,95 µM), trinta dias após a inoculação.

Meios de cultura	Nº frasco	Duração das fases de crescimento (dias)
MC24	2	- inicial: 12 - exponencial: 13 - estacionária: 18 $y = 4,28019 - 0,26614x + 0,02722x^2 - 0,00063x^3 + 3,9106E-6x^4$ $r^2 = 0,92216$
MC24	3	- inicial: < 24 horas - exponencial: 8 - estacionária: 21 $y = 1,36034 + 0,25601x - 0,02617x^2 + 0,00108x^3 - 0,00002x^4$ $r^2 = 0,96718$
MC24	5	- inicial: < 24 horas - exponencial: 4 - estacionária: 25 $y = 2,55918 + 0,06399x - 0,0768x^2 + 0,00035x^3 - 5,2886E-6x^4$ $r^2 = 0,76681$
MS P10K1	7	- inicial: < 24 horas - exponencial: 7 - estacionária: 22 $y = - 4,69898 + 0,11549x - 0,00959x^2 + 0,00032x^3 - 3,6893E-6x^4$ $r^2 = 0,97273$
WPM P10K1	2	- inicial: < 24 horas - exponencial: 9 - estacionária: 21 $y = 0,56458 + 0,28274x - 0,0748x^2 - 0,00019x^3 + 7,1213E-6x^4$ $r^2 = 0,93672$
LPm P10K1	2	- inicial: 10 - exponencial: 10 - estacionária: 10 $y = 0,87396 - 0,09486x + 0,01173x^2 - 0,00029x^3 + 8,6206E-7x^4$ $r^2 = 0,96048$
LPm P10K1	4	- inicial: < 24 horas - exponencial: 8 - estacionária: 24 $y = 0,79148 + 0,12356x - 0,01052x^2 + 0,00036x^3 - 4,3646E-6x^4$ $r^2 = 0,97005$

Os parâmetros de peso fresco e peso seco foram usados na avaliação do incremento de biomassa e são mostrados na Tabela 8. O maior peso fresco (370,0 mg) foi encontrado nas células cultivadas em meio de cultura MS, adicionado de Picloram (10 μ M) e KIN (1 μ M), porém, o maior peso seco (25,10 mg) foi encontrado nas células cultivadas em meio LPm adicionado de Picloram (10 μ M) e KIN (1 μ M), seguido por 14,00 mg das células cultivadas em meio MS. O nível de hidratação celular é muitas vezes fonte de significativa variação e erro em análises que consideram o peso fresco como referência. O peso seco, por sua vez, tem sido muito utilizado porque é considerado mais preciso que os demais, todavia constitui-se em um método destrutivo das amostras.

Tabela 8. Peso fresco e peso seco de células de *Ocotea odorifera*, cultivadas em meio líquido, tendo como fonte de inóculo 0,1 g de células, após 40 dias em meio de cultura.

Meio de Cultura	Nº Frasco	Peso fresco (mg)	Peso seco (mg)
WPM P10K1	2	310,0	13,30
MS P10K1	7	370,0	14,00
LPm P10KI	2	350,0	25,10
MC24	3	240,0	8,80

4.2. Cultura de células em meio semi-sólido

Conforme a Figura 8, a curva de dissimilação obtida no meio de cultura WPM (WP2), adicionado de reguladores de crescimento, apresentou um comportamento de incremento de biomassa segundo um modelo exponencial, o qual se estendeu durante todo o período de cultivo, não atingindo a fase estacionária. Este meio de cultura promoveu um grande incremento de biomassa, descrevendo uma área de 181,22 unidades, calculada a partir da integral da área da curva de perda de peso por dissimilação (Tabela 9). As populações celulares, cultivadas nesse meio nutritivo, obtiveram um maior acúmulo de biomassa, avaliada através da dissimilação de carbono, comparativamente com os demais meios utilizados.

Valores da área da curva de perda de peso por dissimilação das colônias de células cultivadas em meio de cultura MS, suplementado de Picloram (10 μM) mais cinetina (1 μM) (MP), apresentaram valores de áreas para as curvas de dissimilação similares nas diferentes placas, sendo que o maior valor foi observado na placa MP6 (98,24 unidades de área). Esta combinação de reguladores de crescimento apresentou valores menores de incremento da biomassa em relação aquele obtido em meio de cultura WPM e superiores aos obtidos em meio MC24, conforme pode ser observado na Tabela 9.

Populações celulares do meio MP1 apresentaram um padrão de crescimento segundo um modelo quadrático ($r^2=0,91087$), não atingindo a fase estacionária. Este dado pode estar diretamente ligado à capacidade de sustentação do crescimento celular do meio de cultura utilizado (Figura 9). Resultados similares foram observados nas populações MP2 (Figura 10) e MP5 (Figura 11). A população MP6 apresentou uma fase inicial menor que 24 horas e uma fase exponencial com grande crescimento nos primeiros 10 dias. Após este período, o crescimento mostrou-se mais lento, sendo que a fase estacionária não foi alcançada ao final do experimento (Figura 12).

Na Figura 13, pode-se observar o aspecto dos calos mantidos em meio MS e WPM adicionados de reguladores de crescimento.

Calos cultivados em meio de cultura MC24 (MC) apresentaram padrões lineares de crescimento, revelando a existência de soma clones com cinéticas distintas de incremento de biomassa, em relação àquelas já descritas para outros meios de cultura avaliados. Na

população MC2, o comportamento da curva de dissimilação apresentou um pico de crescimento aos 35 dias (Figura 14); comportamento este que também pode ser observado nas populações MC4 (Figura 15) e MC6 (Figura 16). Já a população MC5 alcançou a fase estacionária em momentos anteriores, 30 dias após a inoculação (Figura 17). Conforme pode ser observado na Tabela 10, as taxas de dissimilação das populações MC2, MC4 e MC5, mensurada através da integral da área das curvas de crescimento, mostraram-se menores, comparativamente ao meio MC4, a qual obteve um maior acúmulo de biomassa ao longo do tempo. Segundo Maraschin (1998), fatores limitantes ao crescimento presentes no meio de cultivo podem estimular a síntese de metabólitos de interesse, na medida em que geram uma condição de estresse celular, porém, sistemas de cultivo em meio semi-sólido são de menor interesse quando se objetiva a produção em grande escala de metabólitos secundários.

Como podemos observar na Figura 18, população mantida em meio de cultura LPm (LP4), suplementado com Picloram (10 μM) e KIN (1 μM), apresentou um padrão de crescimento segundo um modelo quadrático ($r^2 = 0,95791$). A curva de crescimento mostrou-se exponencial durante todo o período de cultivo, não atingido a fase estacionária. Após 35 dias em meio de cultura a curva de dissimilação apresentou uma área de 48,23 unidades.

Embora as interações entre as formulações salinas e os reguladores de crescimento não apresentaram evidências claras nas variações na duração das fases de crescimento, é importante ressaltar que a otimização dos nutrientes salinos nos meios de cultura pode tornar possível a redução da concentração dos reguladores de crescimento adicionados nos meios (Preece, 1995).

Verificou-se uma grande incidência de material contaminado, após 7 dias nos meio de cultura LPm e WPM adicionados de Picloram (10 μM) e KIN (1 μM), fato que pode estar relacionado com a incidência de contaminação endógena do material utilizado como explante.

Tabela 9. Valores de unidades de área das curvas de dissimilação de colônias de células de *Ocotea odorifera*, cultivadas em meio de cultura MS semi-sólido, suplementado com Picloram (10 μM) e cinetina (1 μM) – MSP10K1- e MS suplementado com 2,4-D (9,04 μM), BAP (8,88 μM), cinetina (13,95 μM) – MC24 - , após 35 dias em meio de cultura.

Meios de Cultura	Nº do frasco	Perda de peso por dissimilação (mg)	Área da curva de dissimilação(unidades)
WPM P10K1	2	1,93	181,22
MS P10K1	1	2,12	69,84
MS P10K1	2	1,97	89,18
MS P10K1	5	1,88	80,59
MS P10K1	6	1,89	98,24
MC24	2	1,98	17,68
MC24	4	2,49	64,09
MC24	5	1,94	4,54
MC24	6	1,97	30,97
LPm P10K1	4	2,14	48,23

4.3. Variação somaclonal e análise citoquímica

Os resultados obtidos nos experimentos descritos indicam níveis de variabilidade genética consideráveis nas populações celulares originárias de folhas e raízes de *Ocotea odorifera*, independente do sistema de cultivo. Tipos celulares apresentando variações morfológicas foram frequentemente encontrados, havendo uma predominância de células com formato elipsoidal, em relação à forma globular, aspecto este dependente da constituição de meio de cultura. Da mesma forma, uma condição de assincronia de ciclo mitótico foi observada nas populações celulares estudadas, independente do meio de cultura utilizado, reforçando a existência de somaclones em estágios distintos de crescimento/diferenciação. No contexto subcelular, este fato pode ser demonstrado pela presença não uniforme de estruturas indicativas de especialização celular (vacúolos, e.g.) no que concerne ao metabolismo celular. Somaclones evidenciando a presença de vacúolos são encontrados concomitantemente à presença de células desprovidas desta organela, indicando a existência de níveis distintos de diferenciação a nível subcelular nas populações estudadas. Tal fato é relevante, quando se considera como enfoque principal o estabelecimento de cultivos celulares como sistemas produtores de metabólitos secundários de interesse (Maraschin, 1998).

As análises do padrão de crescimento celular revelaram modelos matemáticos distintos, sendo o clássico padrão sigmoideal de crescimento celular *in vitro* encontrado de forma predominante. Variantes de cinética de incremento de biomassa e dissimilação foram observados, notadamente segundo um padrão linear, indicando a ocorrência de clones com atividades metabólicas distintas.

4.3.1 - Caracterização citoquímica de células cultivadas em meio semi-sólido

Meios de cultura desprovidos de reguladores de crescimento, as celulares apresentaram-se com maior densidade citoplasmática, ocorrendo também a formação de um grande número de agregados celulares e tipos celulares, os quais variam entre globulares e alongados (elipsoidais) em todos os tratamentos (Figura 19). O tamanho de agregados é um importante fator determinante do comportamento das células, uma vez que o micro-

ambiente celular é alterado pela variação do número de células formadoras do agregado. Tem sido observado com frequência algum nível de organização morfológica, ou função especializada, com a fotossíntese, em culturas de agregados compactos (Ohta & Verpoorte, 1992).

A ocorrência simultânea de tipos celulares em cultivos *in vitro* foi observada em vários estudos, sendo considerado um fenômeno esperado e de frequência relativamente alta. O surgimento de variantes genéticas em culturas de células vegetais com alto rendimento produtivo induz a instabilidade e, via de regra, à perda dos clones em utilização (Ohta & Verpoorte, 1992).

Culturas celulares mantidas em meios WPM, MS e LPm apresentaram-se altamente oxidadas nos primeiros 15 dias de cultivo, este fato impossibilitou a visualização clara dos grãos de amido (Fig 20 A-C-E). Aparentemente, o meio WPM, 15 dias após o subcultivo, induziu a formação de grande número de grãos de amido, localizados em estrutura vacuolar. Este fenômeno mostrou um decréscimo aos 30 dias de cultivo, o que pode indicar a ocorrência de mobilização/metabolização do material de reserva (Figura 20 C-D). Após 30 dias, as células no meio MS e LPm apresentaram 5-20 grãos de amido /célula, em média, porém nem todas continham tais grânulos (Figura 20 B-F). O amido é um polissacarídeo de reserva, formado por dois componentes a amilose e a amilopectina, que estão presentes em quantidades variáveis. A amilose dá cor azul característica no tratamento com iodo, devido ao fato do iodo se intercalar em uma posição específica no interior da estrutura helicoidal que tal macromolécula assume quando suspensa em água (Conn & Stumpf, 1977).

Conforme a Figura 21, células mantidas em meio de cultura semi-sólido, na ausência de reguladores de crescimento, não apresentaram formação de corpos lipídicos definidos. A medida em que houve o envelhecimento das células, verificou-se um aumento na frequência de ocorrência de corpos lipídicos, possivelmente pelo aumento da taxa de síntese, principalmente nos meios WPM e LPm (Figura 21 A-B; E-F).

A marcação das células com Azul de Evans e Carmin Acético aos 15 não possibilitou uma boa resposta de coloração (Figura 22 A-C-D). Aos trinta dias, células cultivadas nos meios WPM e LPm apresentaram forte reação ao Carmin Acético no citoplasma (Figura 22 B-C), contrariamente ao resultado obtido no meio MS, onde as células coraram com Azul de Evans (Figura 22 E-F). A medida que o envelhecimento das culturas celulares ocorreu, uma

maior excreção de proteínas, conjugados, glicoproteínas e lipoproteínas, que são coradas por Azul de Evans, foi observada. Possivelmente, o material protéico e seus conjugados estejam envolvidos no processo de agregação celular, notadamente pelo fato de que uma intensa coloração de matriz extracelular foi observada neste material.

O meio MS (Picloram 10 μM e KIN 1 μM) não promoveu acúmulo de grãos de amido nas células independente da idade (Figura 23 A-B). Células no meio MC24, aos 15 dias, apresentaram-se escurecidas e com grande número de agregados, não sendo possível a visualização do citoplasma (Fig 23C-D). Todavia, aos 30 dias, as células apresentaram um pequeno acúmulo de grãos de amido. No meio LPm e WPM (Picloram 10 μM e KIN 1 μM) observou-se uma distribuição maior de grãos de amido aos 30 dias (5-20 grão de amido/células) em relação ao meio MS e MC24.

Conforme pode ser observado na Figura 24, a medida que as células envelhecem, a quantidade de corpos lipídicos aumentou, independente do meio utilizado. Comportamentos distintos foram observados no que se refere ao componente subcelular utilizado no armazenamento de corpos lipídicos. Em populações celulares crescidas em meio LPm (Picloram 10 μM e KIN 1 μM) os lipídeos se acumularam principalmente no vacúolo (Figura 25), enquanto no meio WPM (Picloram 10 μM e KIN 1 μM) os lipídeos foram encontrados dispersos no meio intracelular (Figura 26).

Na Figura 27 D, pode-se observar um padrão de marcação dos componentes protéicos e conjugados, os quais refletem uma imobilização do material protéico no vacúolo. Este resultado requer maior detalhamento para sua análise, uma vez que proteínas e lipídeos são acumulados em organelas no retículo endoplasmático e nas mitocôndrias (Salisbury & Ross, 1994). Corpos violáceos, provavelmente derivados de fenômenos de oxidação, foram observados em meio MS e WPM - Picloram (10 μM e KIN 1 μM) aos 15 dias (Fig 27 C-G).

A identificação de organelas que funcionam como locais de síntese de metabólitos secundários é de sobremaneira importante para o melhor entendimento das etapas desenvolvidas no anabolismo destes compostos, principalmente quando se consideram os fenômenos de compartimentalização e/ou sub-compartimentalização (Schlienger, 1987).

Os resultados obtidos nos estudos de citoquímica de células cultivadas em meio semi-sólido comprovam a existência de uma alta variabilidade celular nas populações, em função dos perfis de acúmulo/distribuição das entidades bioquímicas estudadas. Estes dados

estão de acordo com aqueles obtidos nas análises de crescimento via dissimilação de carbono.

4.3.2 - Caracterização citoquímica em suspensões celulares

Análises de diferentes tipos celulares em microscopia ótica em células em suspensão, na presença e ausência de reguladores de crescimento, revelaram características celulares semelhantes. As células apresentaram de forma predominante uma coloração marrom e formato alongado (Figura 28). A presença de grande número de agregados celulares foi observada, principalmente nos meios MC24 (Fig 29 E), LPm (Picloram 10 μ M e KIN 1 μ M) (Figura 30 F), WPM (Picloram 10 μ M e KIN 1 μ M) (Figura 30 F) e LPm (Figura 29 G).

Células na ausência de reguladores de crescimento, quando expostas em lugol, revelaram quantidades variáveis de grãos de amido e em diferentes estágios de crescimento. Em meio MS pode-se observar maior concentração de grãos de amido aos 15 dias (Figura 29 A) e menor aos 30 dias. Possivelmente, este polissacarídeo de reserva foi mobilizada/metabolizado quando da depleção das fontes de carbono do meio de cultura (Figura 29 B). Células em meio LPm e WPM, quando avaliadas aos 15 dias, não apresentaram grãos de amido (Figura 29 E-F), todavia, aos 30 dias foram detectados grãos de amido em alguns somaclones. O número de grãos em meio LPm variou de 10-20 grãos/célula (Fig 29 C-D) e o aspecto destas estruturas pode ser observado na Figura 30.

Corpos lipídicos foram observados nas formulações de MS e LPm aos 15 e 30 dias (Figura 31 E-F e Figura 31 c-d, respectivamente), evidenciado um padrão de distribuição uniforme no meio intracelular. Ambos os tratamentos diferiram do meio WPM, o qual não induziu a formação de corpos lipídicos (Figura 31 A-B). Em todos os meios de cultura o citoplasma das células apresentou-se pouco denso, indicando pequena atividade celular.

Como pode ser observado na Figura 32, as células em diferentes meios de cultura, desprovidos de reguladores de crescimento reagiram aos corantes, principalmente indicando a ocorrência de estruturas localizadas mais intensamente nos vacúolos.

Células do meio MS (Picloram 10 μ M e KIN 1 μ M), aos 15 dias, coradas com lugol, possuíam pouco material de reserva (grãos de amido) (Figura 33 A) e aos 30 dias o

citoplasma dessas células apresentou-se pouco denso. A ocorrência de morte celular neste material foi considerada (Figura 33 B).

Em meio LPM (Picloram 10 μM e KIN 1 μM), aos 15 dias, foi detectado a presença de grãos de amido, os quais variaram em número médio de 10 a 20 grãos/célula (Figura 33 C). Já, aos 30 dias, o número médio de grãos de amido foi reduzido a 1-10 grãos/célula, sendo que estas células apresentavam citoplasma denso e material constituinte de matriz extracelular pronunciado. O aspecto dos grãos de amido no meio LPM pode ser observado na Figura 34. No meio MC24 e WPM, aos 15 dias, as células apresentaram poucos grãos de amido (Figura 33 E-G), porém, em ambos os casos, a quantidade de material de reserva aumentou ao longo do cultivo - 30 dias - (Figura 33 F-H), constatando-se uma média de 10-20 grãos de amido por célula neste meio.

Segundo Emons (1994), as células embriogênicas de *Ducus carota*, apresentaram-se com aspecto pequeno, tendo contato em todas as faces com muitos plasmodesmas, possuindo pequenos vacúolos, muitos grãos de amido (5-25 por células), muitas configurações exocitosas na membrana plasmática e das paredes. As células não embriogênicas, foram maiores, arredondadas, com espaços intracelulares e poucos plasmodesmas, vacúolos grandes (80% do volume celular), poucos grãos de amido (1-2 por célula).

A presença de corpos lipídicos em meios líquido com reguladores de crescimento teve grandes variações. Foram observados corpos lipídicos em meios: MS (Picloram 10 μM e KIN 1 μM) aos 30 dias (Figura 35 B), LPM (Picloram 10 μM e KIN 1 μM) aos 15 dias (Figura 35 C), WPM (Picloram 10 μM e KIN 1 μM) aos 30 dias (Figura 35 E) e MC24 aos 30 dias (Figura 35 G). Nas primeiras duas semanas as células cultivadas nos meios MS (Figura 35 A), WPM (Figura 35 E) e MC24 (Figura 35 G) não formaram corpos lipídicos, contrariamente ao comportamento das células cultivadas em meio LPM, as quais aos 15 dias apresentaram grande número de agregados celulares com alta quantidade de lipídeos. Em muitos casos a acumulação de lipídeos em linhagens celulares embriogênicas é observado em estágios precoces do desenvolvimento de embriões somáticos (Tulecke, 1987).

Como podemos observar na Figura 36, células em meios MS, WPM e LPM adicionados de reguladores de crescimento apresentaram reação positiva ao Carmin Acético.

Maiores quantidades de material protéico glicoproteínas e lipoproteínas foram detectadas no meio MS (Picloram 10 μ M e KIN 1 μ M) e MC24 (Figura 36 B-H).

5. PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem a necessidade de estudos aprofundados no que concerne ao comportamento celular *in vitro* de *Ocotea odorifera*. Entre as perspectivas interessantes para a continuidade destes estudos pode-se citar:

1. Estudar o efeito de diferentes fontes de explantes, como: segmentos nodais, segmentos caulinares, meristemas apicais sobre a síntese de metabólitos secundários *in vitro*.
2. Definir as melhores combinações e concentrações de reguladores de crescimento.
3. Seleção de linhagens celulares com grande acúmulo de biomassa e/ou síntese de metabólitos secundários.
4. Avaliar o grau de estabilidade de linhagens celulares selecionadas ao longo das gerações de cultivo.
5. Analisar a biossíntese de metabólitos secundários produzidos *in vitro*, e.g. safrol.
6. Aprofundar os estudos citoquímicos e melhor caracterizar a variação somaclonal celular, através de microscopia eletrônica de varredura.
7. Analisar o metabolismo do carbono em linhagens celulares utilizando diferentes fontes de carbono, no que se refere à taxa de incremento de biomassa e biossíntese de metabólitos secundários de interesse.

6. CONCLUSÃO

- a) A exploração da canela sassafrás foi realizada durante mais de 40 anos de forma irrestrita por parte dos órgãos governamentais. Este fato, aliado ao pouco conhecimento do manejo desta espécie e ao preço atrativo do safrol no mercado, foram os principais agentes causadores de um extrativismo exacerbado no Estado de Santa Catarina, colocando esta espécie em perigo de extinção.
- b) O melhor meio de cultura para o cultivo de células em suspensão, em função dos dados obtidos pela perda de peso por dissimilação foi o meio MS adicionado de 2,4-D ($9,04\mu\text{M}$), BAP ($8,88\mu\text{M}$) e KIN ($13,95\mu\text{M}$) (Queiroz & Maraschin, 1992).
- c) O meio de cultura WPM semi-sólido, adicionado de Picloram ($10\mu\text{M}$) e KIN ($1\mu\text{M}$) foi o que viabilizou as melhores taxas de incremento de biomassa para as populações celulares;
- d) O intervalo de repicagens para as células cultivadas em suspensão é de 22 dias, sendo que as culturas em meio semi-sólido não atingiram a fase estacionária de crescimento para as condições estudadas;
- e) Variações morfológicas e assincronia de ciclo mitótico foram os principais indicativos da existência de variantes somaclonais nas populações celulares em todos os tratamentos.
- f) Os resultados obtidos nos estudos de citoquímica de células cultivadas em meio semi-sólido comprovam a existência de uma alta variabilidade celular nas populações, em função dos perfis de acúmulo/distribuição de grãos de amido, lipídeos e proteínas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Attree, S.; Fowke, L. Embryogeny of gymnosperms: advances in synthetic seed technology so conifers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. n.35, p.1-35, 1993.
- Benzion, G.; Phillips, R. L. & Rines, H. W. Cases histories of genetic variability *in vitro* : oats and maize. In : *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*. Vasil, I. K. (Ed.), New York, Academic Press, v. 3, p. 4-25, 1986.
- Brasil. Portaria n.006/92-N, de 15 de Janeiro de 1992. Lista oficial de espécies da flora brasileira ameaçada de extinção. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, Jan. 1992.
- Butcher, D. N. Secondary products in tissue cultures. In : *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. Reinert, J.& Bajoj, Y.P.S. (Ed.) Berlin, Springer-Verlag, 668-693p., 1997.
- Carrier, D.J.; Cunnigham, J.E; Taylor, D.C.; Dunstan, D.I. Sucrose requirements and lipid utilization during germination of interior spruce (*Picea glauca engelmannii* complex) somatic embryos. *Plant Cell Report*, n.16, p.550-554, 1997.
- Carvalho, P.E.R. *Espécies florestais brasileiras recomendações: Silviculturais, potencialidades e uso da madeira*. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisas Florestais. Colombo: EMBRAPA - CNPF; Brasília - SPI, 1994, 640p.
- Conn, E.C.; STUMPF, P.K. Introdução a bioquímica. EUA, Ed. Edgard Bluücher Ltda. 1975, 430p.
- Dosworth, M.R. Zitiert nach Ministério da Agricultura - Instituto de Óleos: Sassafrás notas sobre o óleo essencial, Boletim n.6, Rio de Janeiro, 1948.
- Durzan, D.J. Process control in somatic polyembryogenesis. In: Frans Kempe Symposium Molecular Genetics of Forest Trees, 8, 1988, Sweden, *Proceeding...* Sweden: J.-E. Hällgren, p.147-186,1988.
- Durzan, D.J. Ammonia: its Analogues, metabolic products and site of action in somatic embryogenesis. In.: Bonga, J.M; Durzan, D. J. (eds.) *Cell and Tissue culture in Forestry*. v.2, Dordrecht: Martinus Nijhoff Pu. p.92-136, 1987.
- Durzan, D.J., Nitrogen Metabolism and vegetative propagation of forest trees. In.: Bonga, J.M; Durzan. D. J. (eds.) *Cell and Tissue culture in Forestry*. Dordrecht: Martinus Nijhoff Pu. p.257-324, 1985.

- Earle, E. D. & GRACEN, V. E. Somaclonal variation in progeny of plants from corn tissue cultures. In : *Tissue Culture in Forestry and Agriculture*. Henke, R. R.; Hughes, K. W.; Constantin, M. J. & Hollaender, A. (Eds.). Plenum Press, New York, p.139-152, 1984.
- EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), Embrapa identifica pimenta que produz safrol. *Boletim semanal de divulgação científica*. Ano VI, 13 de novembro de 1998.
- Evans, D. A. & Sharp, W. R. Single gene mutations in tomato plants regenerated from tissue culture. *Science*, n.221, p.949-951, 1983.
- Evans, D. A.; Sharp, W. R. & Bravo, J. E. Plant somaclonal variation and mutagenesis. *Nestlé Research News 1986/87*. Le Mont, Lausanne, Jean Genoud SA, p.63-71, 1987.
- Fontanel, A. & Tabata, M. Production of secondary metabolites by plant tissue and cell cultures. Present aspects and prospects. *Nestlé Researches News*. p.69-75. 1986/1987.
- Fowler, M. W. & Stepan-Sarkissian, G. Carbohydrate source, biomass productivity and natural product yield in cell suspension cultures. In : *Primary and Secondary Metabolism in Plant Cell Cultures*, Neumann, K. H. & Reinhard, E. (Eds.). Berlin, Springer-Verlag, p.66-73, 1985.
- Furmanowa, M.; Glowniak, K.; Sykłowska-Baranek, K.; Zgórkowa, Z.; Józefczyk, A. Effect of the picloram and methyl jasmonate on growth and taxane accumulation in callus culture of *Taxus x media* var. *Hatfieldii*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. n.49, p.75-79, 1997.
- Futuro, D.O.; Figueiredo, M. R. Lignanas e neulignanas de Lauraceae: Diversidade química e potencial de biodiversidade. In: XV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Águas de Lidóia. *Resumos*, p.165, 1998.
- George, E.F. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Part 1. The Technology. 2. Ed., Edington: Exegetics, 1993, 574 p.
- George, E. F. & Sherrington, P. D. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Eastern Press, Reading, Berks, 709p. 1984.
- Hadi, M. Z. & Bridgen, M. P. Somaclonal variation as a tool to develop pest resistance plants to *Torenia fournieri* "Compacta Blue". *Plant cell, tissue and organ culture*, n.46, p.43-50, 1996.
- Halperin, W. *In vitro* embryogenesis: Some historical issues and unresolved problems. In: Thorpe T. A. (ed.). *In vitro embryogenesis in plants*. Dordrecht: Kluwer Academic Pu. p.1-16, 1995.
- Harry, I.S.; Thorpe, T.A.. Somatic embryogenesis and plant regeneration from mature zygotic embryos of red spruce. *Botanical Gazette*, v.152, n.4, p.446 - 452, 1991.

- Hay, C. A.; Anderson, L. A.; Roberts, M. F.; Phillipson, J. D. Alkaloid production by plant cell cultures. In: *Biotechnology in Agriculture*. Alan R. Liss Inc. London. p.97-140. 1988.
- IARC - Working Group. V.10, 1976. In: Reasonably anticipated to be carcinogen: safrole (Cas. No. 94-59-7). Disponível na Internet via WWW.URL: <http://ntp-sever.niehs.nih.gov/htdocs/ARC/ARC-RAC/safrole.html>. Arquivo capturado em 5 de março de 1998.
- Johansen, D.A.. *Plant microtechnique*. New York, McGraw-Hill. 1940, 523 p
- Ketchum, R. E. B.; gibson, D.M. Paclitaxel production in suspension cell cultures of *taxus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, n.46, p.9-16, 1996.
- Larkin, P. J. & Scowcroft, W. R. Somaclonal variation - a novel source of variability from cell culture for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.*, v.60, p.197-214, 1981.
- Lindsey, K.L.; Topping, J.F. Embryogenesis: a Question of Pattern. *Journal Experimental of Botany*. v. 44, n.259, p.359-374, 1993.
- Lloyd, G. & McCown, B. Commercially-flasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture. *Comb. Proc. Intl. Plant Prop. Soc.* n.30, p.421-427, 1980.
- Mantell, S. H. & Smith, H. Cultural factor that influence secondary metabolites accumulations in plant cell and tissue cultures. In : *Plant Biotechnology*. Mantell, S. H. & Smith, H. (Ed.), Cambridge, Cambridge University Press, p.75-108, 1983.
- Mantell, S. H.; Matthews, J. A. & Mckee, R. A. *Princípios de Biotecnologia de Plantas - Uma introdução à engenharia genética de plantas*. Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética, 1994, 344p.
- Maraschin, M. Variação somaclonal, metabolismo secundário de carbono e caracterização bioquímica e imunológica nos cultivares de *Mandevilla velutina* (MART) WOODSON (*Apocynaceae*). Tese de Doutorado, Curitiba, 1998, 191p.
- Matsumoto, T.K.; Webb, D.T.; Kuehnle, A.R. Histology and origin of somatic embryos derived from *Anthurium andraeanum* Linden ex André Lamina. *J. Amerc. Soc. Hort. Sci.* v.121, n.3, p.404-407, 1996.
- Molinari, O. L. A cultura da sassafrás (*Ocotea pretiosa* Mez.). Tese de Graduação, Pelotas, 1989, 116p.
- Morel, G.M.; Wetmore, R.H. Fern callus tissue culture. *American Journal Botany*, n.38, p.41-143, 1951.
- Niedz, R. P. Growth of embryogenic sweet orange callus on media varying in the ratio of nitrate to ammonium nitrogen. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. n.39, p.1-5, 1994.

- Ohta, S. & Verpoorte, R. Some accounts of variation (heterogeneity and/or instability) in secondary metabolites production by plant cell cultures. *Ann. Rep. Nat. Sci. Home Economics*, n.32, p.9-23, 1992.
- Petiard, V.; Baubault, C.; Bariaud, A.; Hutin, M. & Courtois, D. Studies on variability of plant tissue cultures for alkaloid production in *Catharanthus roseus* and *Papaver somniferum* callus cultures. *Nestlé Research News 1986/87*. Le Mont, Lausanne, Jean Genoud SA, p.117-120, 1987.
- Preece, J.E. Can nutrient salts partially substitute for plant growth regulators? *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, v. 1, n.1, p. 26-36, 1995.
- Queiroz, F. P. & Maraschin, M. Cultura de células em suspensão de *Mandevilla velutina* - Cerrado. In: XII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil/TU-UFPR. Curitiba/PR. *Resumos*. p.211. 1992.
- Reitz, R.; Klein, R.M.; Reis, A. *Projeto madeira de Santa Catarina*. Sellowia, Itajaí, 1978, 320p.
- Reinert, J.; Yeoman, M. M. *Plant Cell and Tissue Culture*. Springer-Verlag. New York. 1982, 297p.
- Rexter, U.; Dobler, G. Untersuchungen über die baumart canela sassafrás (*Ocotea pretiosa* MEZ.). Tese de doutorado, Weihenstephan, 1992, 276p.
- Roberts, D.R.; Sutton, B.C.S.; Flinn, B.S. Synchronous and high frequency germination of interior spruce somatic embryos following partial drying at high relative humidity. *Can. J. Bot.* n.68, p.1086-1090, 1990.
- Sato, F. & Yamada, Y. High berberine producing cultures of *Coptis japonica* cells. *Phytochemistry*. N.23, p.281-285, 1984.
- Salisbury, F.B.; Ross, C.W. *Fisiología Vegetal*. Ed. Iberoamérica. 1994, 759p.
- Salomão, A.N.; Brandão, J.E.M.; Silva, J.A. Distribuição geográfica de seis espécies florestais como subsídeo para a escolha de conservação "in situ". In: CONGRESSO NACIONAL SOBRE ESSÊNCIAS NATIVAS, 2., 1992, São Paulo. *Anais*: São Paulo: Instituto Florestal, 1992. P.1237-1240. Publicado na Revista do Instituto Florestal, v.4, parte 4, edição especial, 1992.
- Schlienger, C. Microscopy as a tool for plant biotechnology. *Nestlé Research News 1986/87*. Le Mont, Lausanne, Jean Genoud SA, p.105-114, 1987.
- Schripsema, J. Factor involved in the alkaloid production of *Tabernaemontana divaricata* plant cell suspension cultures. Ph.D. Thesis, Leiden University. 160 p. 1991.
- Schripsema, J.; Erkenlens, C. & Verpoorte, R. Intra- and extracellular carbohydrates in plant cell cultures investigated by ¹H-RMN. *Plant Cell Rep.*, n.9, p.527-530, 1991.

- Scowcroft, W. R. & Larkin, P. J. Somaclonal variation. In : *Applications of plant cell and tissue culture*. Ciba Foundation Symposium 137, John Wiley and Sons, Chichester, p.21-35, 1988.
- Shepard, J. F.; Bidney, D. & Shahin, E. Potato protoplast in crop improvement. *Science*, n.28, p.17-24, 1980.
- Silva, T.S. Relatório de estágio - Laboratório de Cultura de Tecido, Universidade Federal de Santa Catarina, 1989.
- Smith, D.L.; Krikorian, A D. Somatic embryogenesis of carrot in hormone-free medium: external pH control over morphogenesis. *Am. J. Bot.*, v.77, n.12, p.1634-1647, 1990.
- Smith, S. M.; & Street, H. E. The decline of the embryogenic potential as callus and suspension cultures of carrot (*Daucus carota* L.) are serially subcultured. *Ann. Bot.*, n.38, p.233-241, 1974.
- Staba, E. J. *Plant Tissue Cultures as a Source of Biochemicals*. Boca Raton, USA, CRC Press, 1980, 285p.
- Stafford, A. Genetic basis of instability in cell cultures. In : *Secondary Metabolism in Plant Cell Culture*. Morris, P.; Scraag, A. H.; Stafford, A. & Fowler, M. W. (Eds). Cambridge, Cambridge University Press, p.219-223, 1986.
- Tabata, M.; Ogino, T.; Yoshioka, K; Yoshikawa, N. & Hiraoka, N. Selection of cell lines with higher yield of secondary products. In : *Frontiers of Plant Tissue Culture*. Thorpe, T. A. (Ed.). Calgary, Alberta, University of Calgary, p.213-222, 1978.
- Tulecke, W. Somatic embryogenesis in woody perennials. In: Bonga, J.M; Durzan, D.J. *Cell and Tissue culture in Forestry*. v.2, Dordrecht: Martinus Nijhoff Pu. p.61-91, 1987.
- Von Arnold, S.; Ericksson, T. *In vitro* of adventitious shoot formation in *Pinus contorta*. *Can. J. Bot.*, n.59, p.870-874, 1981.
- Verpoorte, R. The production of plant secondary metabolites. In: *Agricultural Biotechnology in focus in the Netherlands*. Dekkers, J. J.; Plas, H. C. van der & Vuijk, D. H. (Ed.). Pudoc, Wageningen, p.1-16, 1990.
- Villarreal, M.L.; Arias, C.; Feria-Velasco, A.; Ramírez, O.T. Cell suspension culture of *Solanum chrysotrichum* (Schldl.) - a plant producing na antifungal spirostanol saponin. *Pant Cell, Tissue and Organ Culture*, n.50, p.39 - 44, 1997.
- Zenk, M. H.; El-Shagi, H.; Arens, H.; Stöckigt, J.; Weiler, E. W. & Deus, B. Formation of the indole alkaloids serpentine and ajmalicine in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. In : *Plant Tissue Culture and Its Biotechnological Applications*, Barz, W.; Reinhard, E. & Zenk, M. H. (Eds.), Springer-verlag, Berlin, p.27-32, 1977.

- Yamamoto, Y.; Mizuguchi, R. & Yamada, Y. Selection of high and stable pigment producing strain in cultured *Euphorbia milli* cells. *Theoret. Appl. Genet.*, v.61:113-116, 1982.
- Wijnsma, R. Anthraquinones and alkaloids in cell and tissue cultures of *Cinchona* species. Ph. D. Thesis, Leiden University. 132p, 1986.
- Wijnsma, R.; Verpoorte, R.; Harkes, P. A. A.; Vliet, T. B. V.; Hoopen, H. J. G. T. & Vendsen, A. B. The influence of initial sucrose and nitrate concentrations on the growth of *Cinchona landgeriana* cell suspension cultures and the production of alkaloids and anthraquinones. *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.*, n.7, p.21-29, 1986.
- Whitmer, S.; Verpoorte, R.; Canel, C. Influence of auxins on alkaloid accumulation by a transgenic cell line of *Catharanthus roseus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, n.53, p.135-141, 1998

ANEXO 1

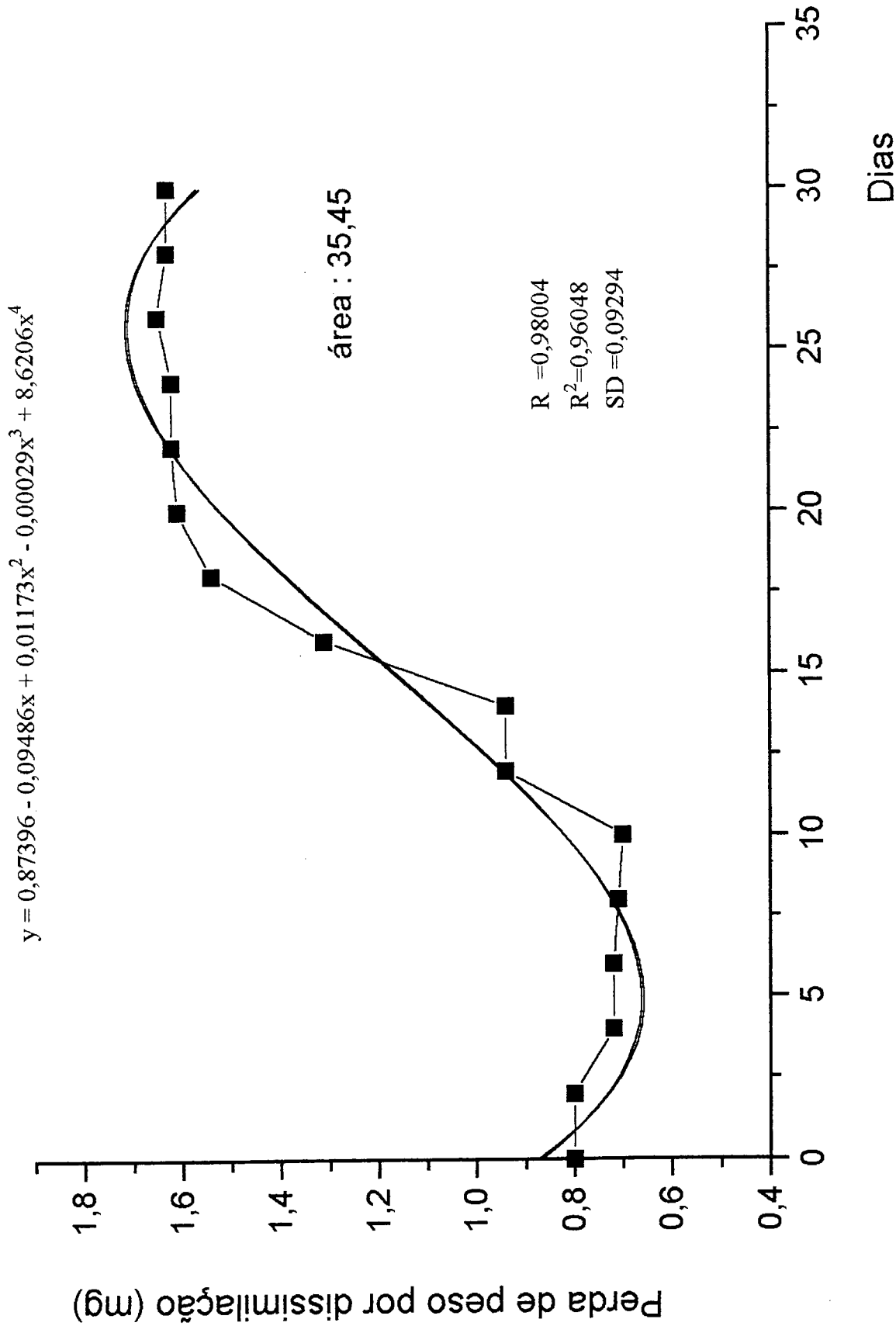


Figura 1. Curva de dissimilação de suspensão celulares de *Orotea odorifera* em meio de cultura LPM adicionado de Picloram (10 µM) e KIN (1 µM) (LP2).

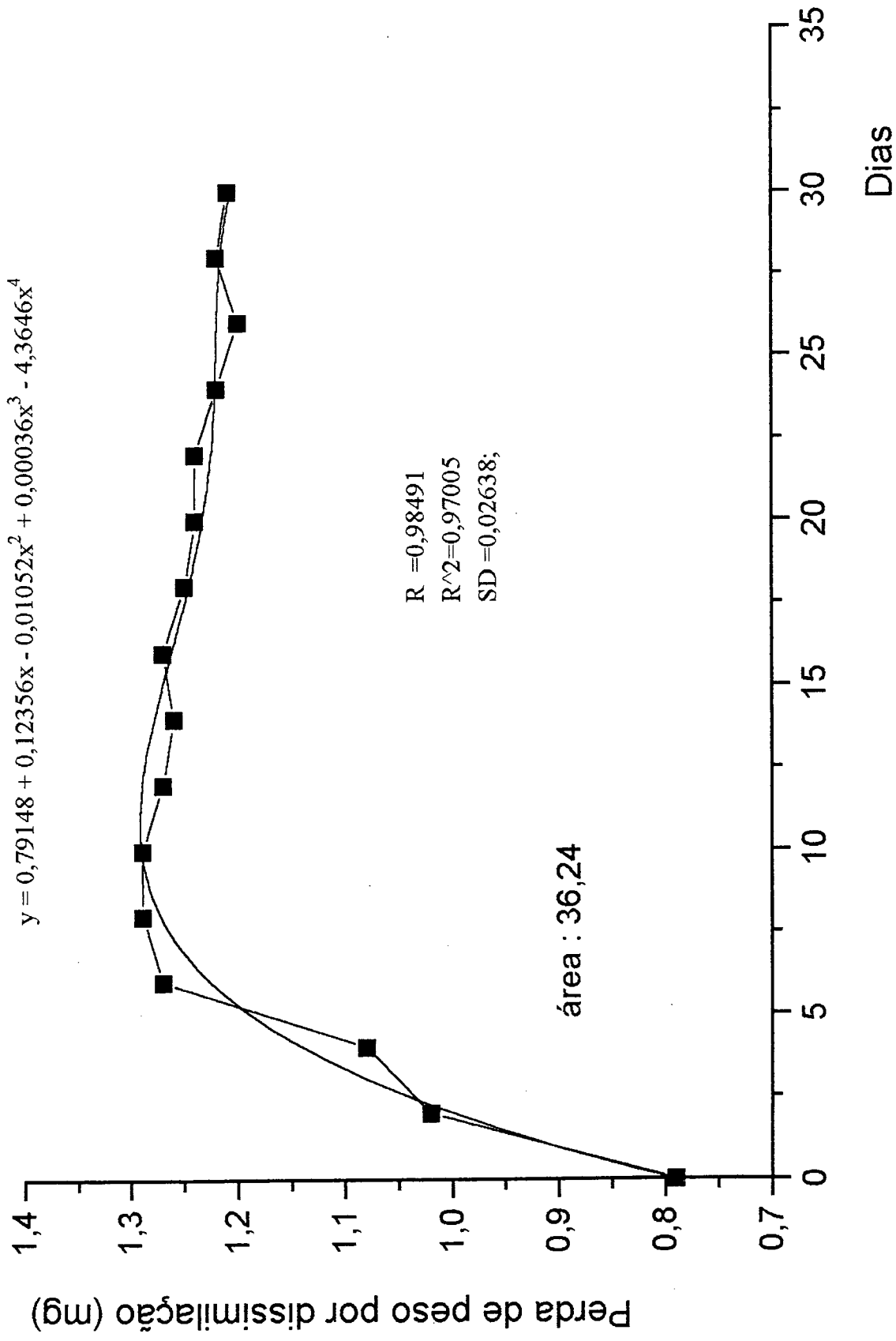


Figura 2. Curva de dissimilação de suspensão celulares de *Orotea odorifera* em meio de cultura LPm adicionado de Picloram (10 µM) e KIN (1µM) (LP4).

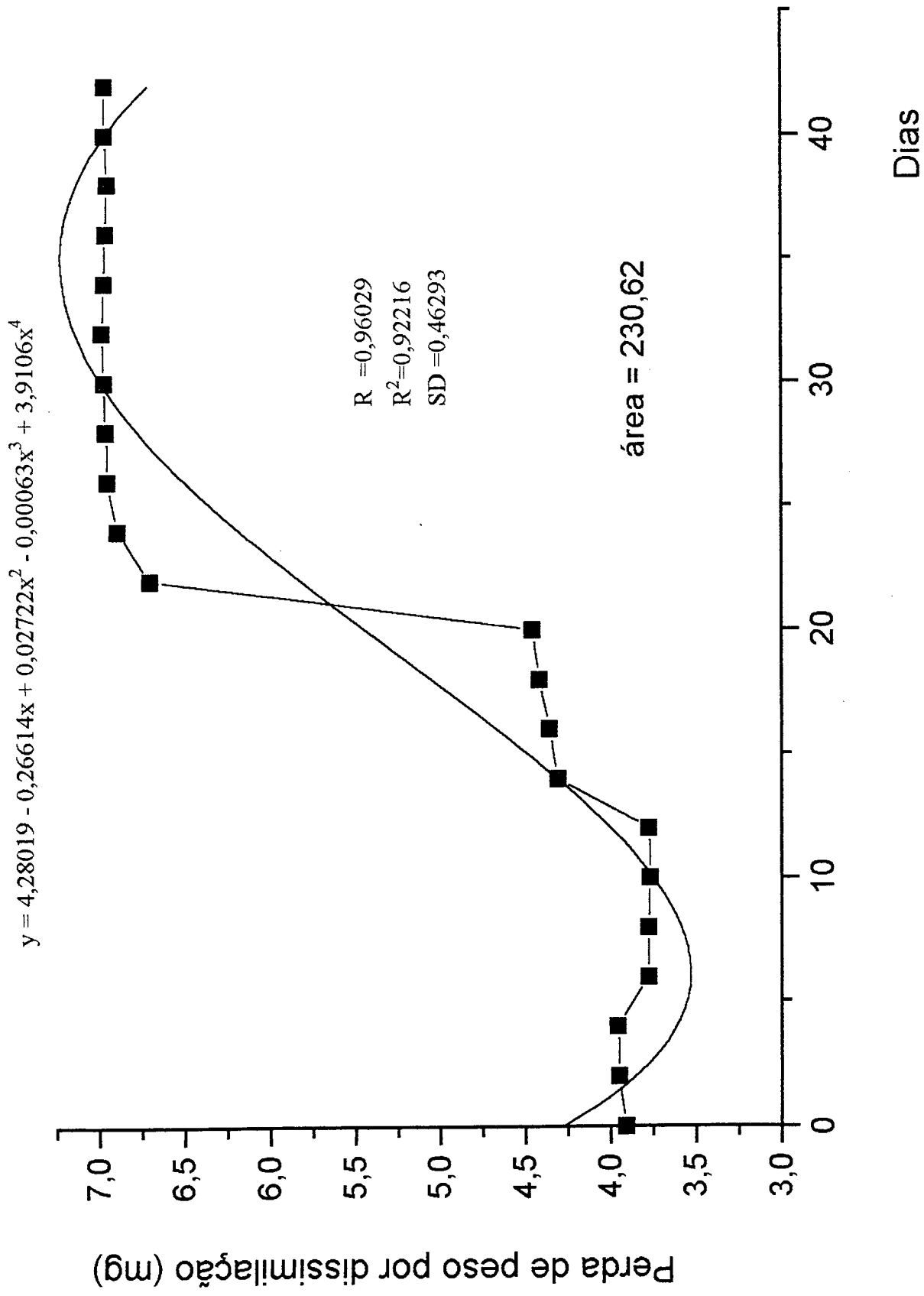
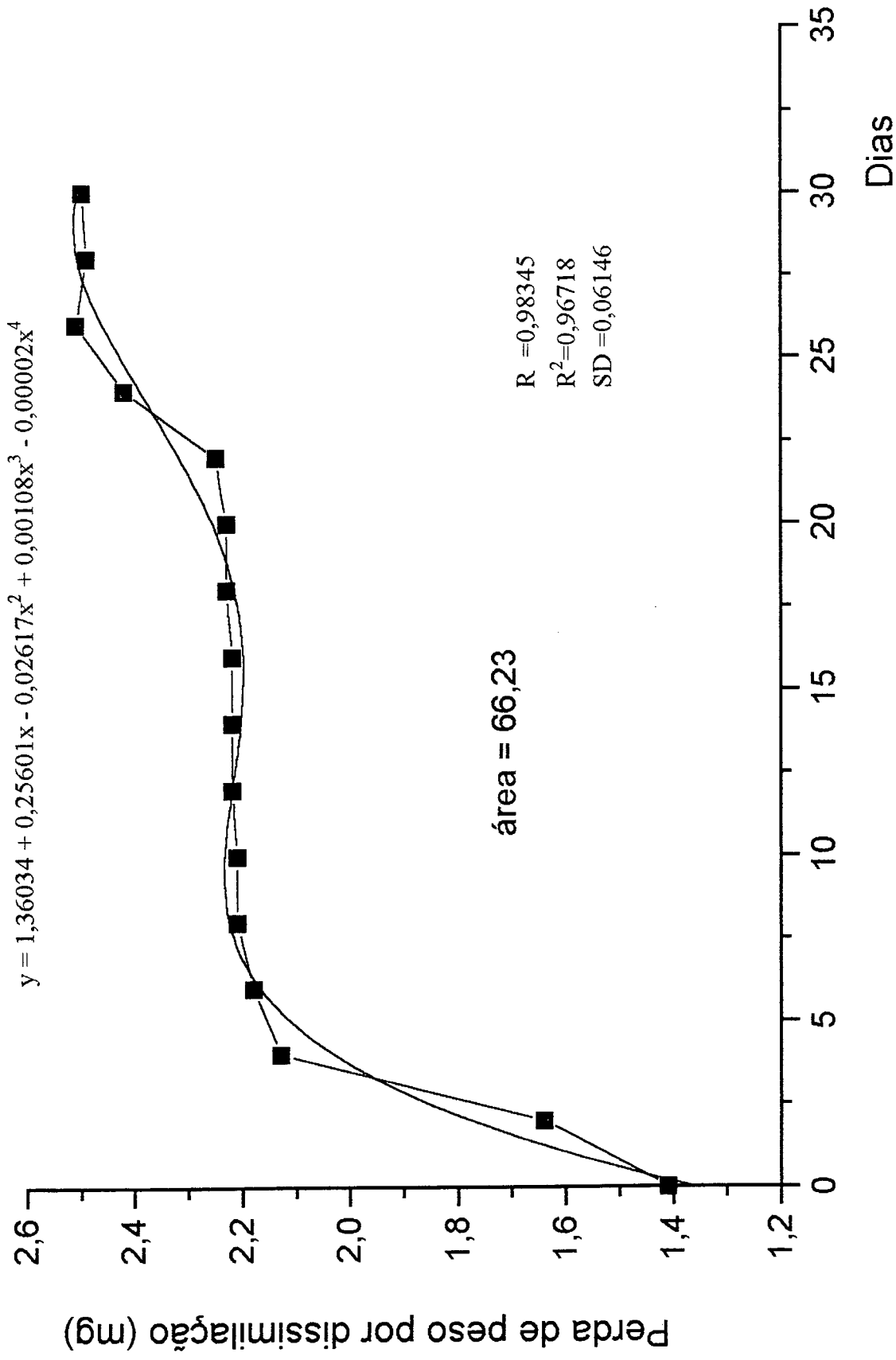


Figura 3. Curva de dissimilação de suspensão celulares de *Ocoetea odorifera* em meio de cultura MS adicionado de 2,4-D (9,04µM), BAP (8,88µM) e KIN (13,95 µM) (MC2).



-/ Figura 4. Curva de dissimilação de suspensão celulares de *Ocotea odorifera* em meio de cultura MS adicionado de 2,4-D (9,04µM), BAP (8,88µM) e KIN (13,95 µM) (MC3).

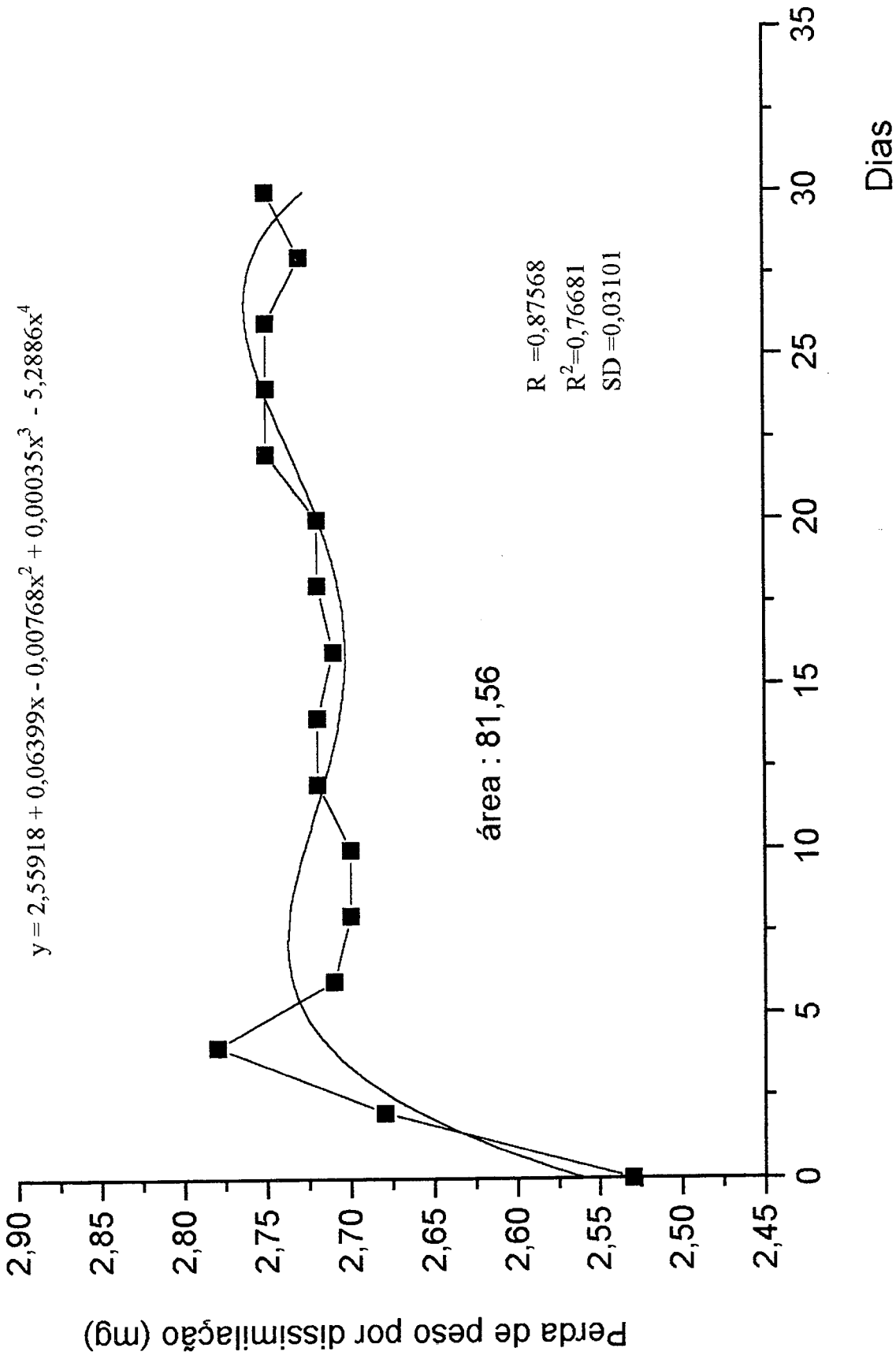


Figura 5. Curva de dissimilação de suspensão celulares de *Ocoetea odorifera* em meio de cultura MS adicionado de 2,4-D (9,04µM), BAP (8,88µM) e KIN (13,95 µM) (MC5).

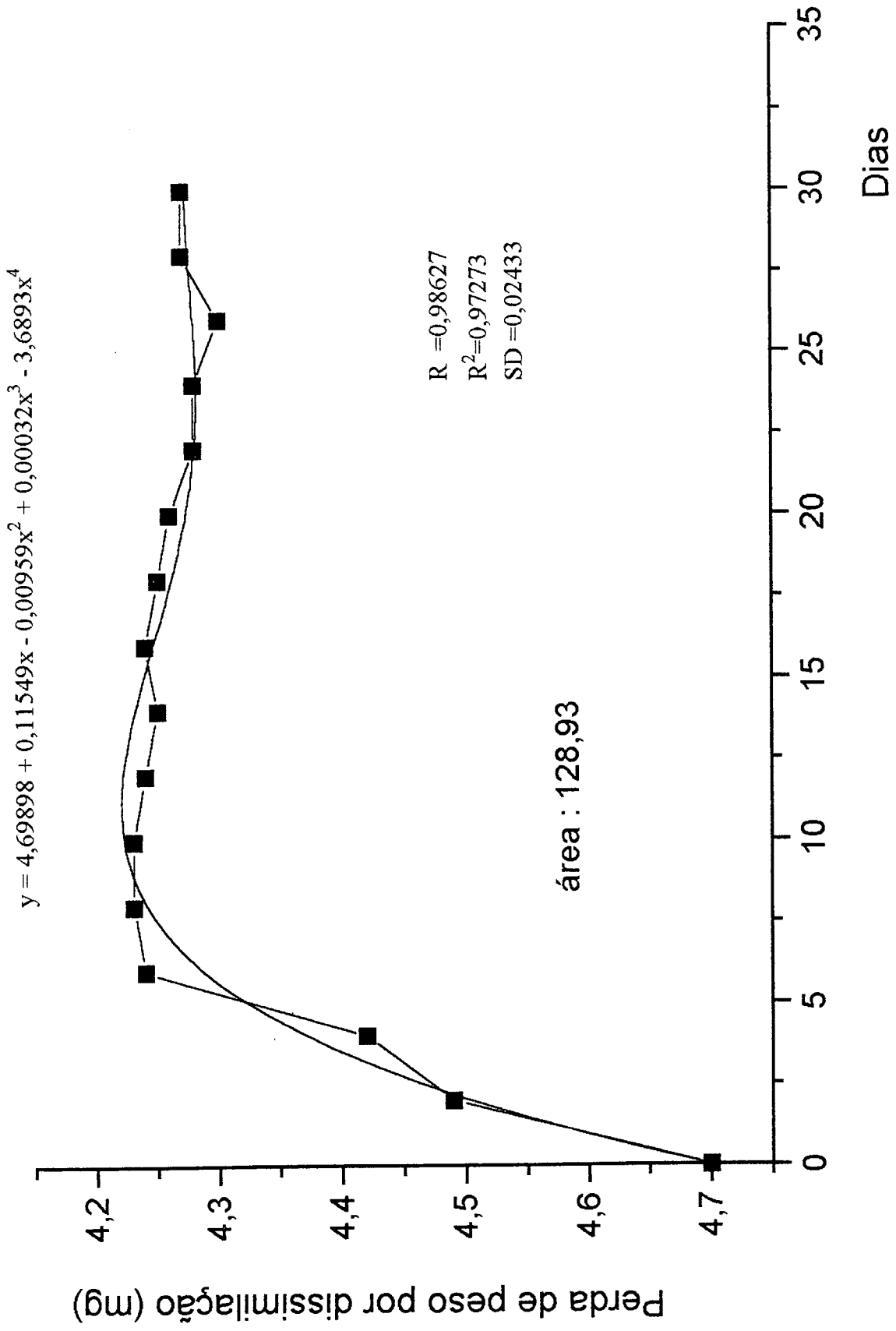


Figura 6. Curva de dissimilação de suspensão celulares de *Ocotea odorifera* em meio de cultura MS adicionado de Picloram (10 µM) e KIN (1 µM) (MP7).

$$y=0,56458+0,28274 x-0,00748 x^2-0,00019 x^3+7,1213x^4$$

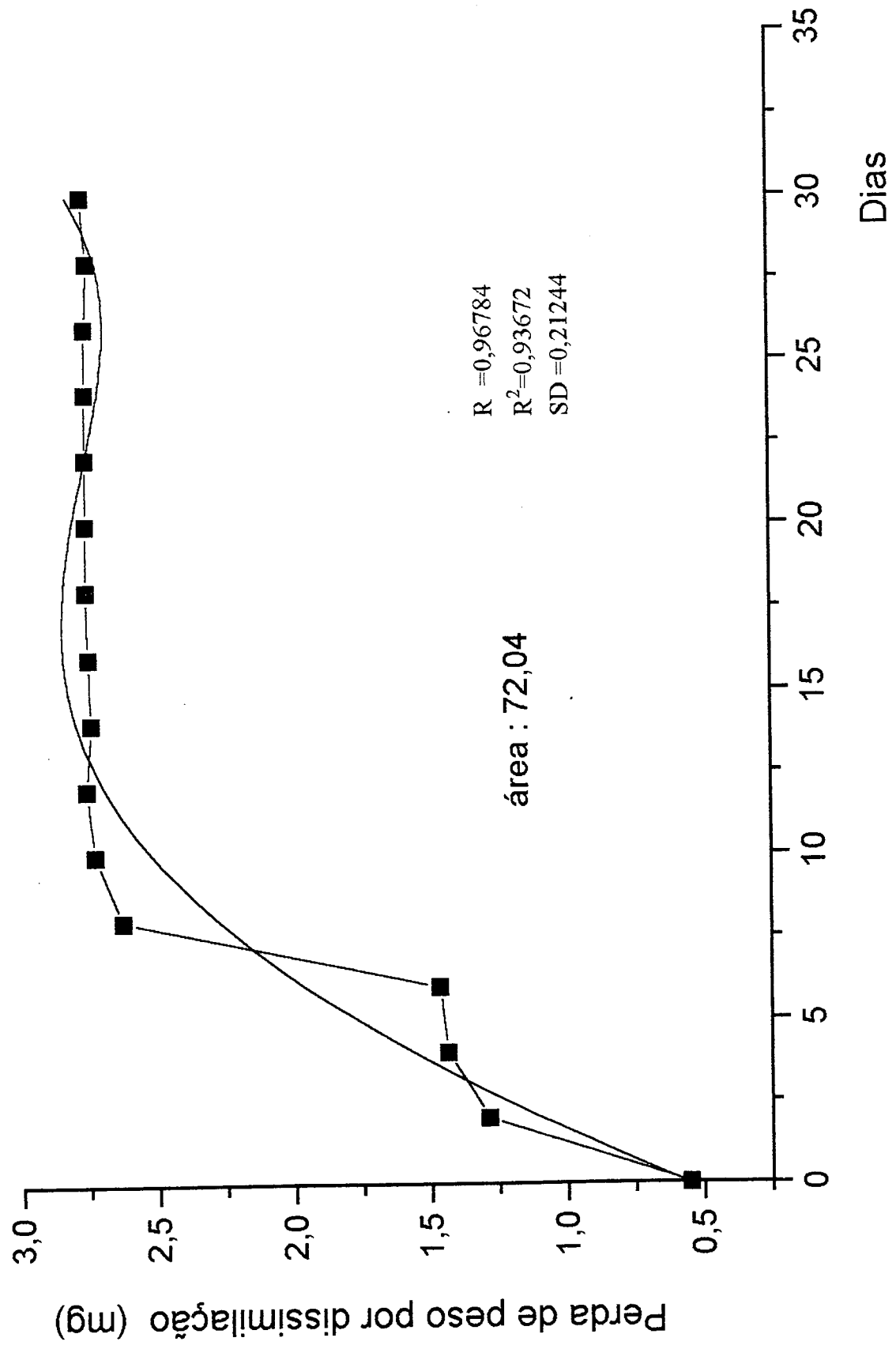


Figura 7. Curva de dissimilação de suspensão celulares de *Ocoetea odorifera* em meio de cultura WPM adicionado de Picloram (10 µM) e KIN (1µM) (WP2).

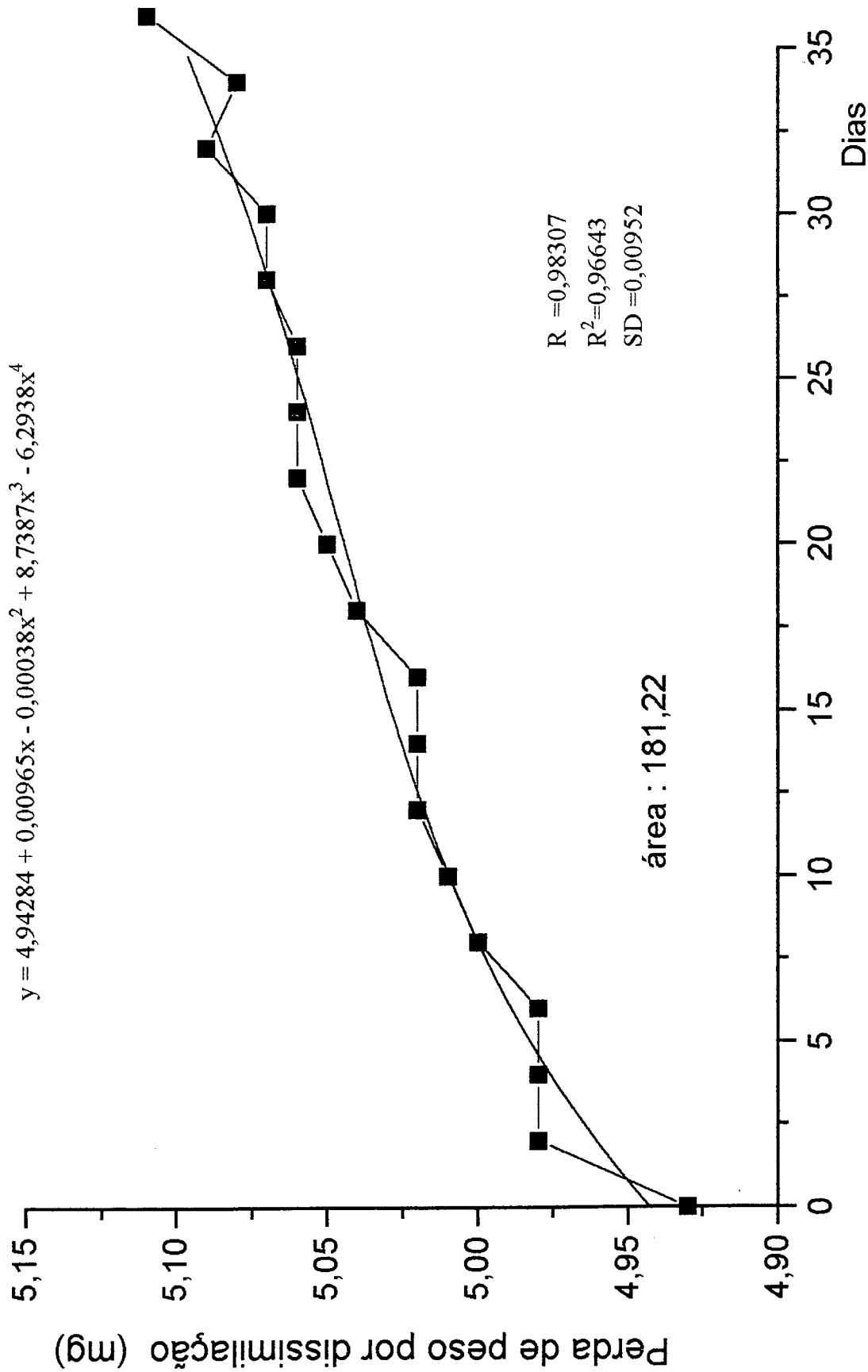


Figura 8. Curva de dissimilação em meio semi-sólido de cultura de células de *Ocolea odorifera* em meio de cultura WPM adicionado de Picloram (10 µM) e KIN (1µM) (WP2).

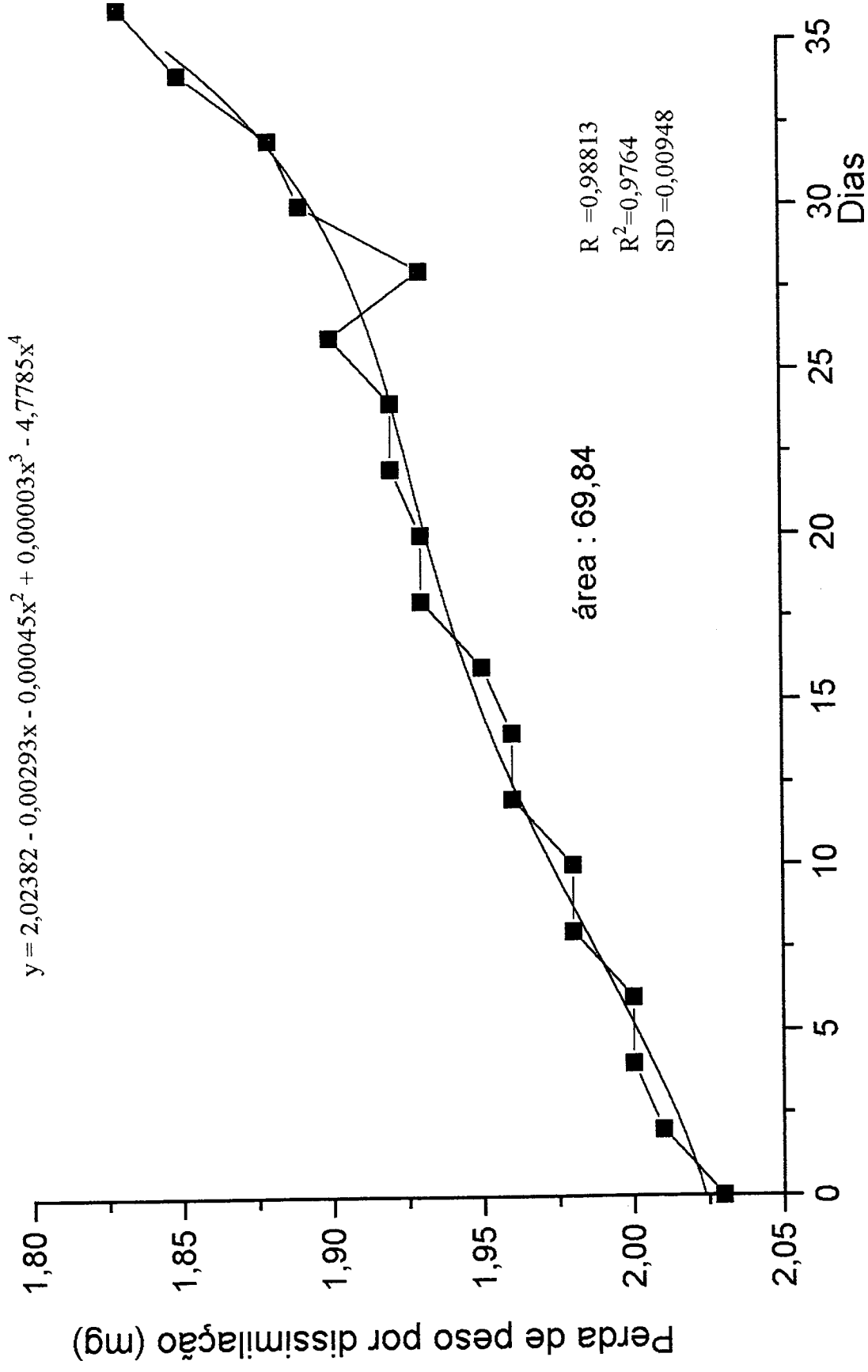


Figura 9. Curva de dissimilação em meio semi-sólido de cultura de células de *Ocolea odorifera* em meio de cultura MS (MPI) adicionado de Picloram (10 µM) e KIN (1µM).

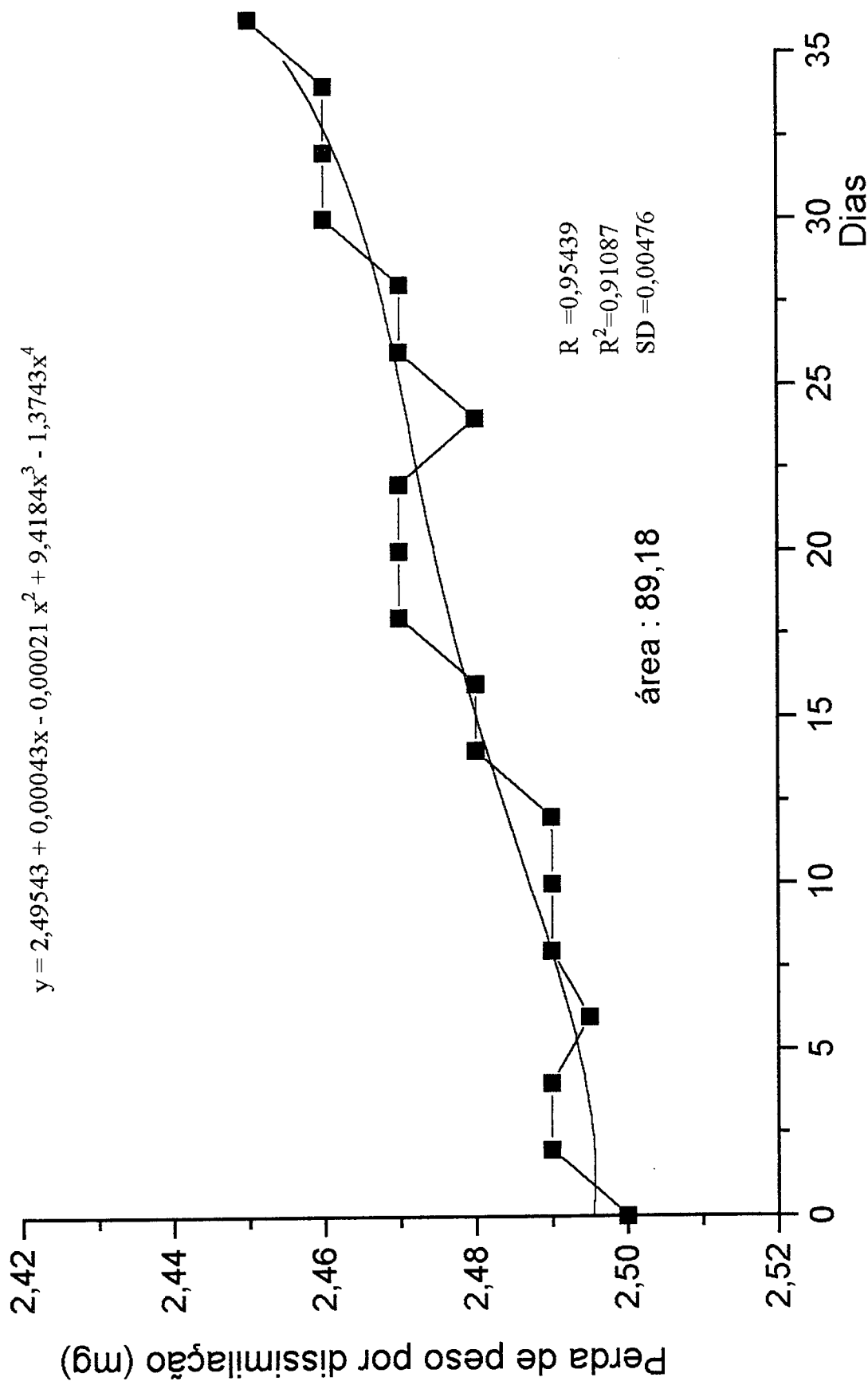


Figura 10. Curva de dissimilação em meio semi-sólido de cultura de células de *Ocotea odorifera* em meio de cultura MS (MP2) adicionado de Picloram (10 µM) e KIN (1µM).

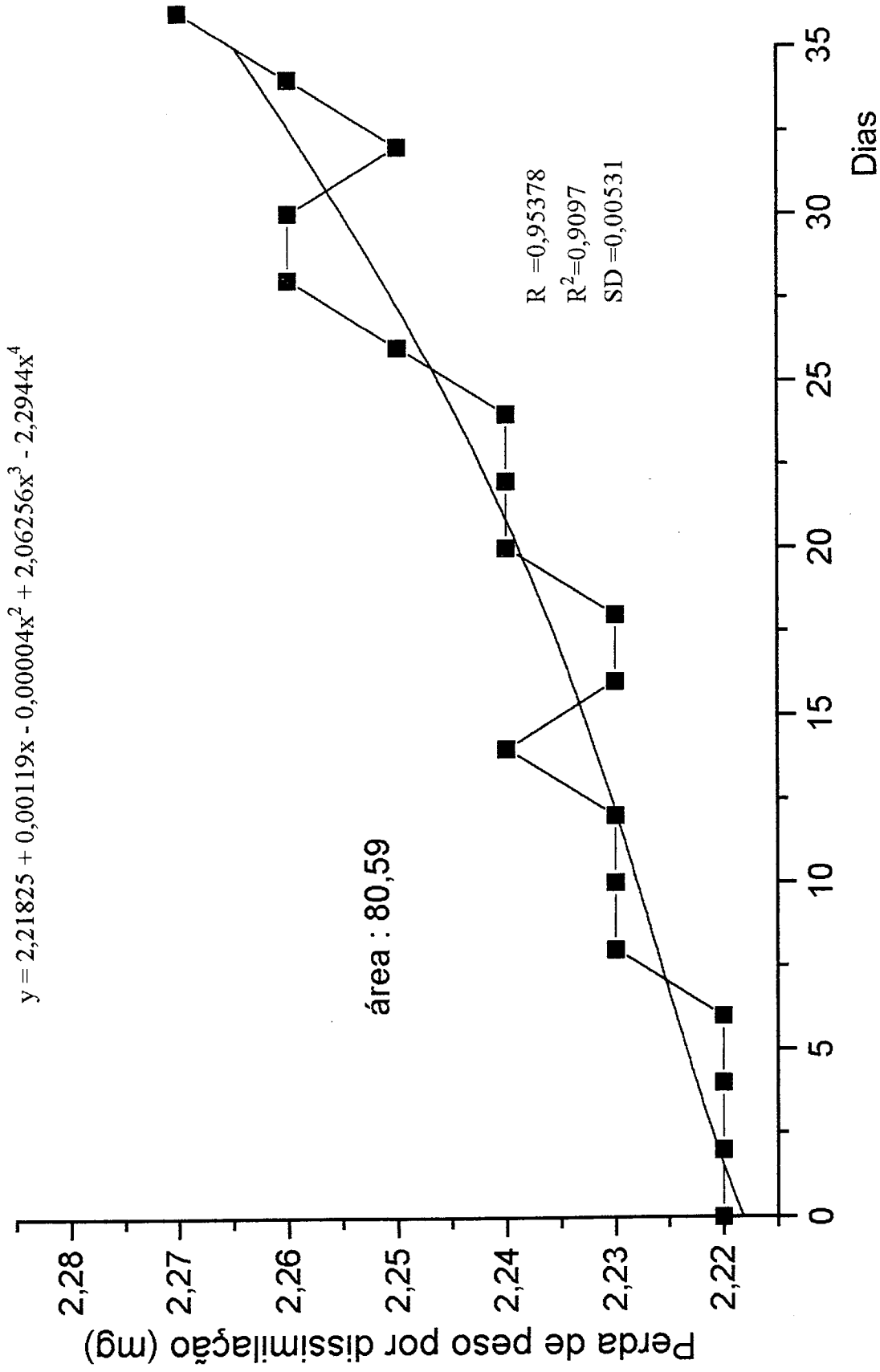


Figura 11. Curva de dissimilação em meio semi-sólido de cultura de células de *Ocoteca odorifera* em meio de cultura MS (MP5) adicionado de Picloram (10 μ M) e KIN (1 μ M).

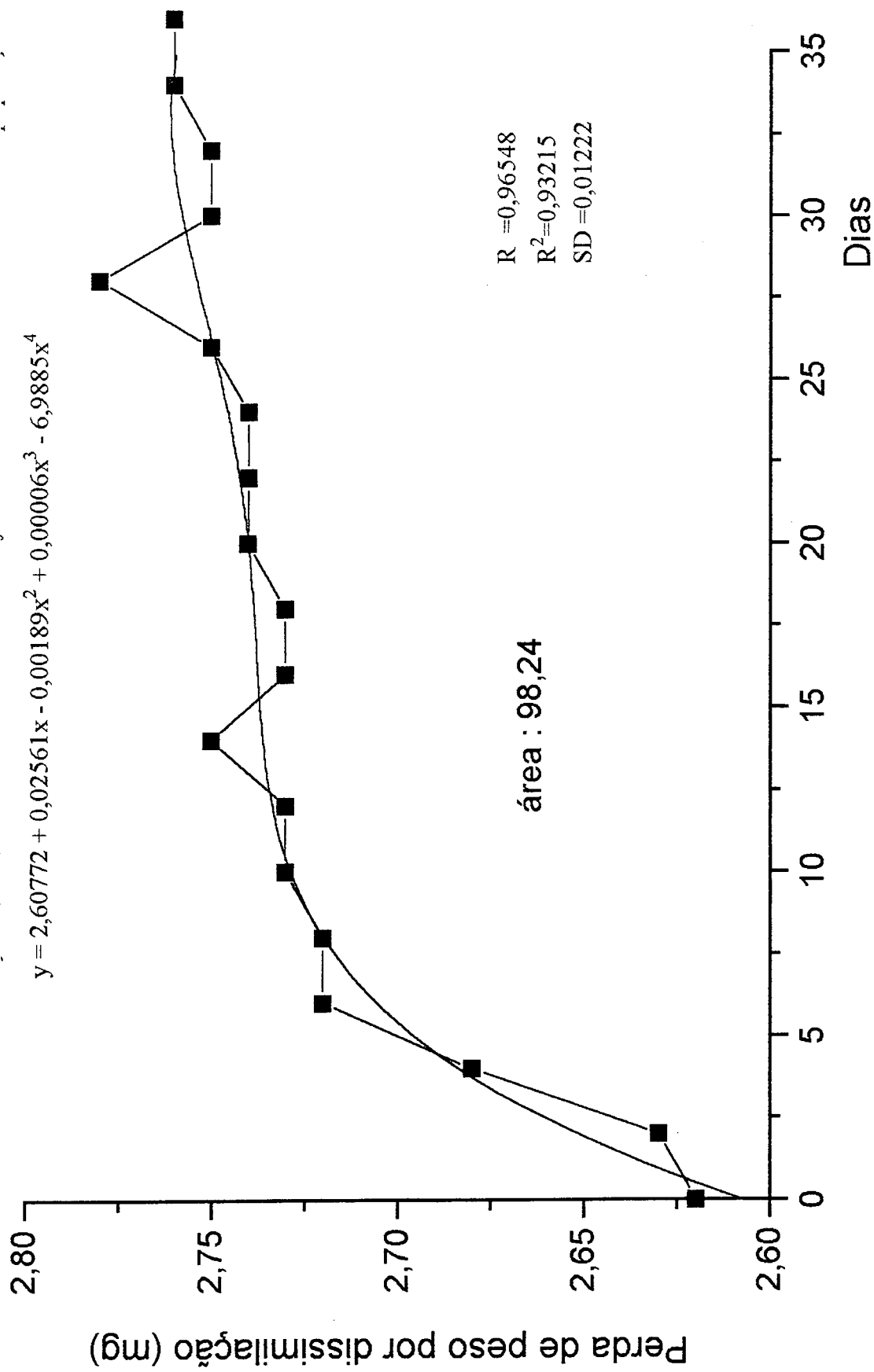


Figura 12. Curva de dissimilação em meio semi-sólido de cultura de células de *Ocoteca odorifera* em meio de cultura MS (MP6) adicionado de Picloram (10 µM) e KIN (1µM).

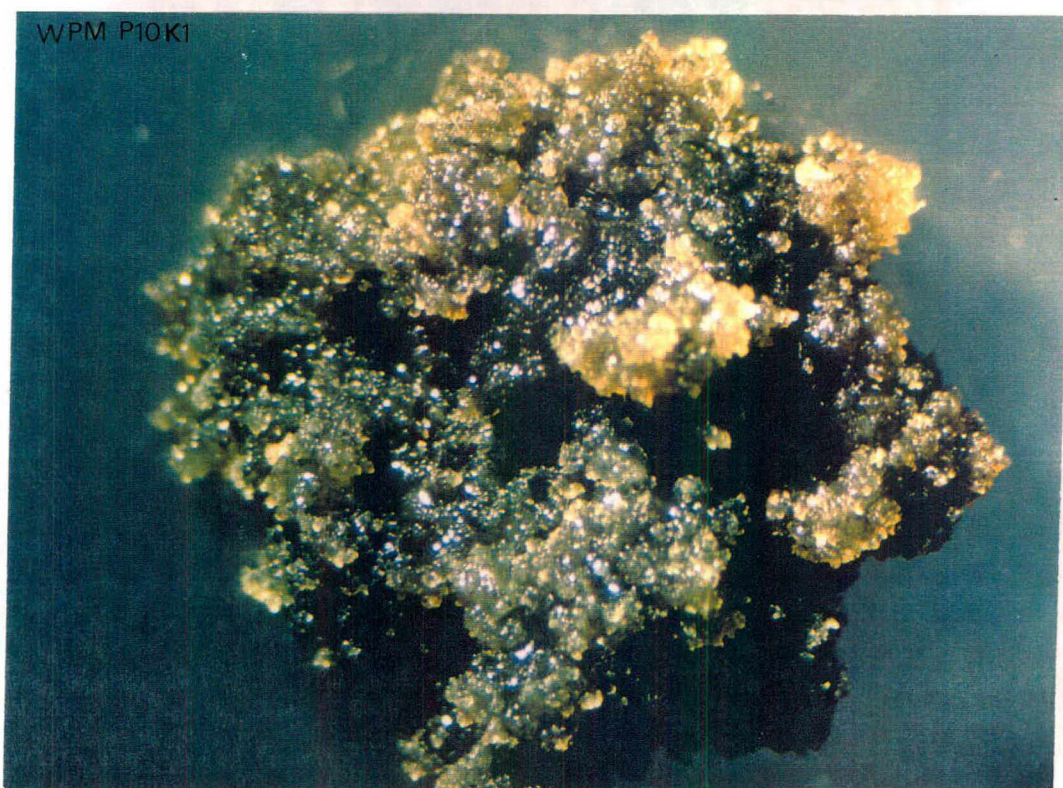
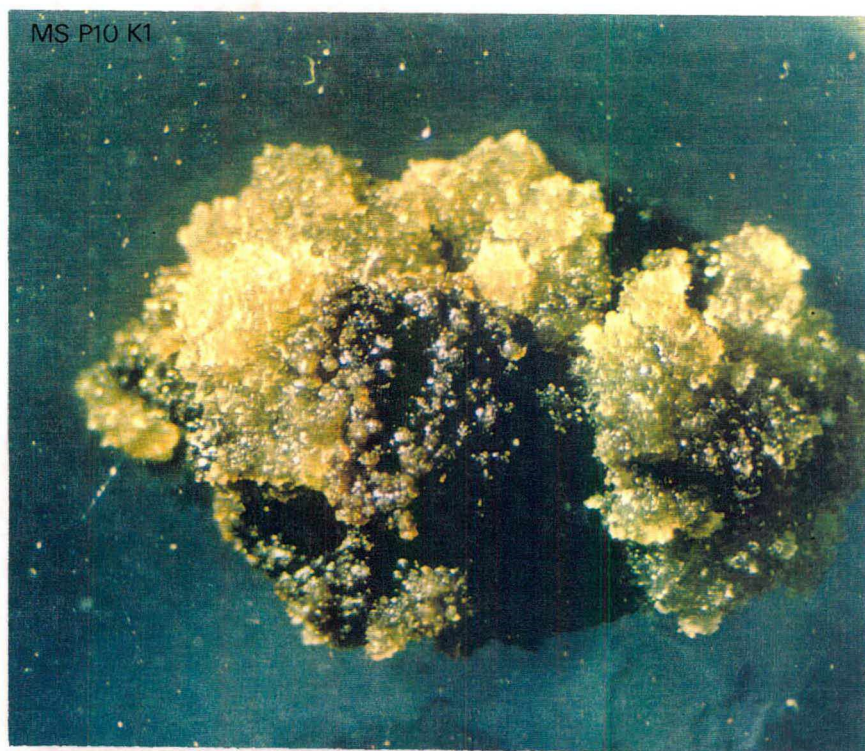


Figura 13. Aspecto dos calos de folha de *Ocotea odorifera* cultivados em meio de cultura MS e WPM, adicionados de Picloram ($10 \mu\text{M}$) e KIN ($1 \mu\text{M}$).

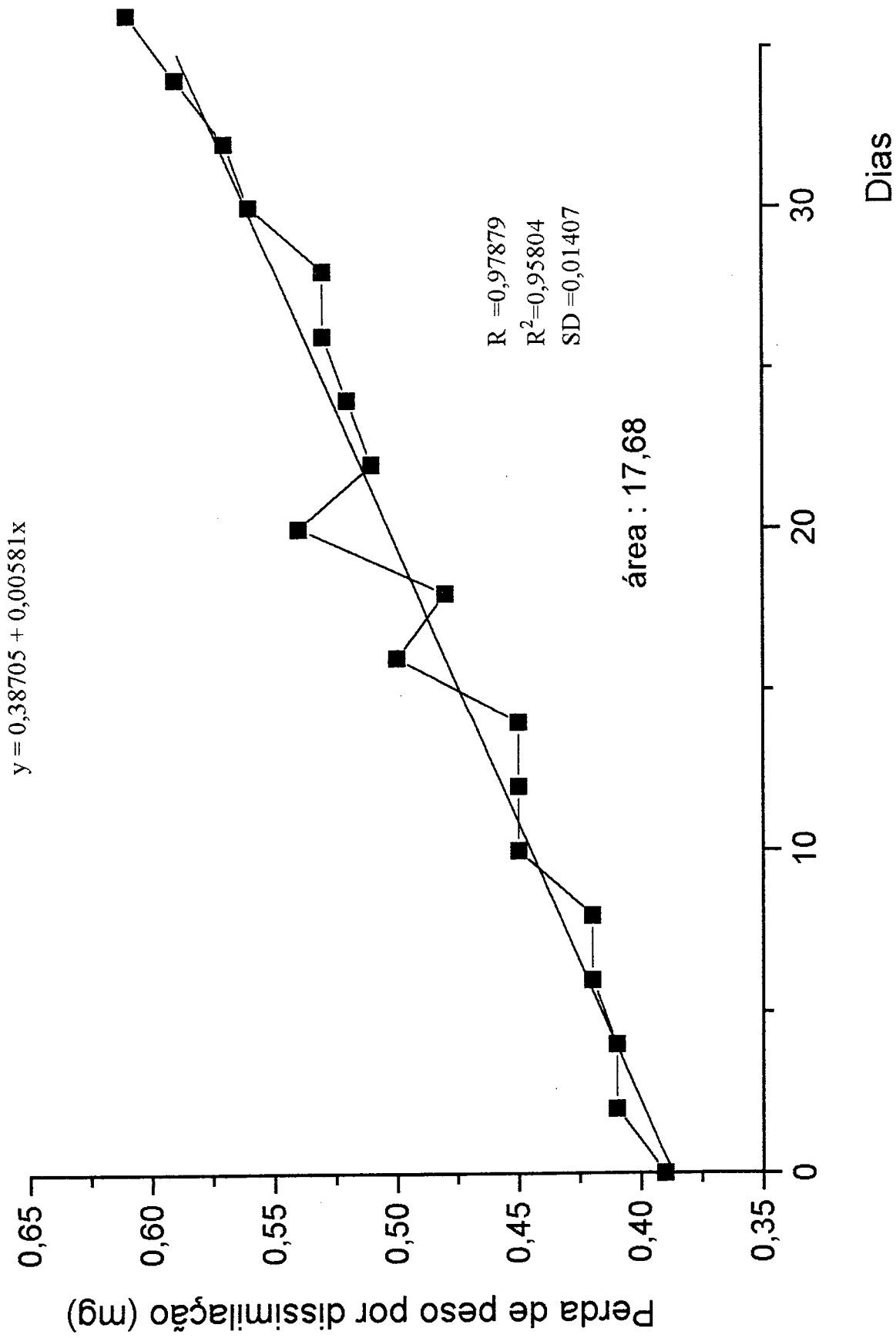


Figura 14. Curva de dissimilação em meio semi-sólido de cultura de células de *Ocoteca odorifera* em meio de cultura MC24 (MC2) adicionado de 2,4-D (9,04 μ M), BAP (8,88 μ M) e KIN (13,95 μ M).

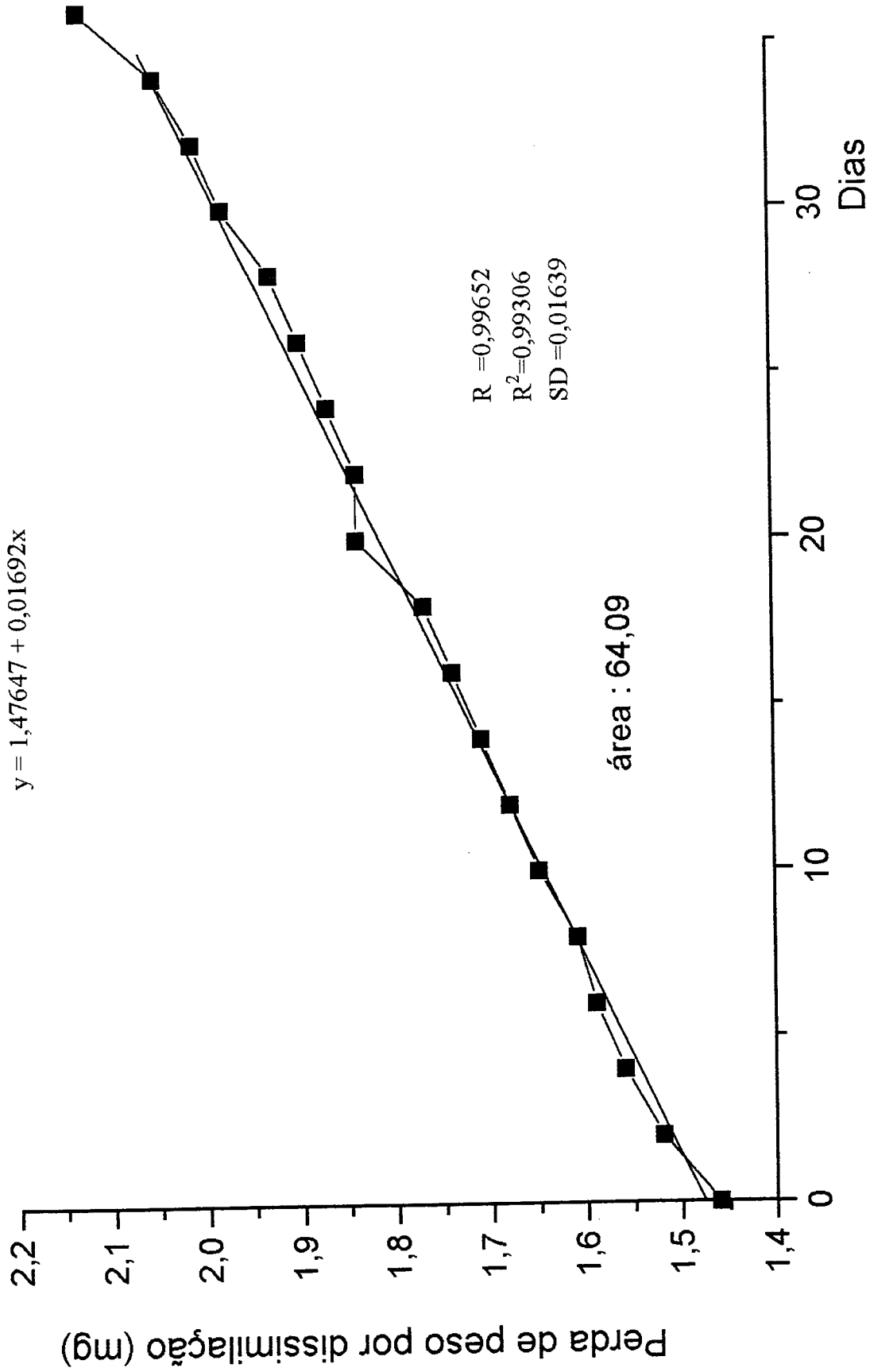


Figura 15. Curva de dissimilação em meio semi-sólido de cultura de células de *Ocoteca odorifera* em meio de cultura MC24 (MC4) adicionado de 2,4-D (9,04µM), BAP (8,88µM) e KIN (13,95 µM).

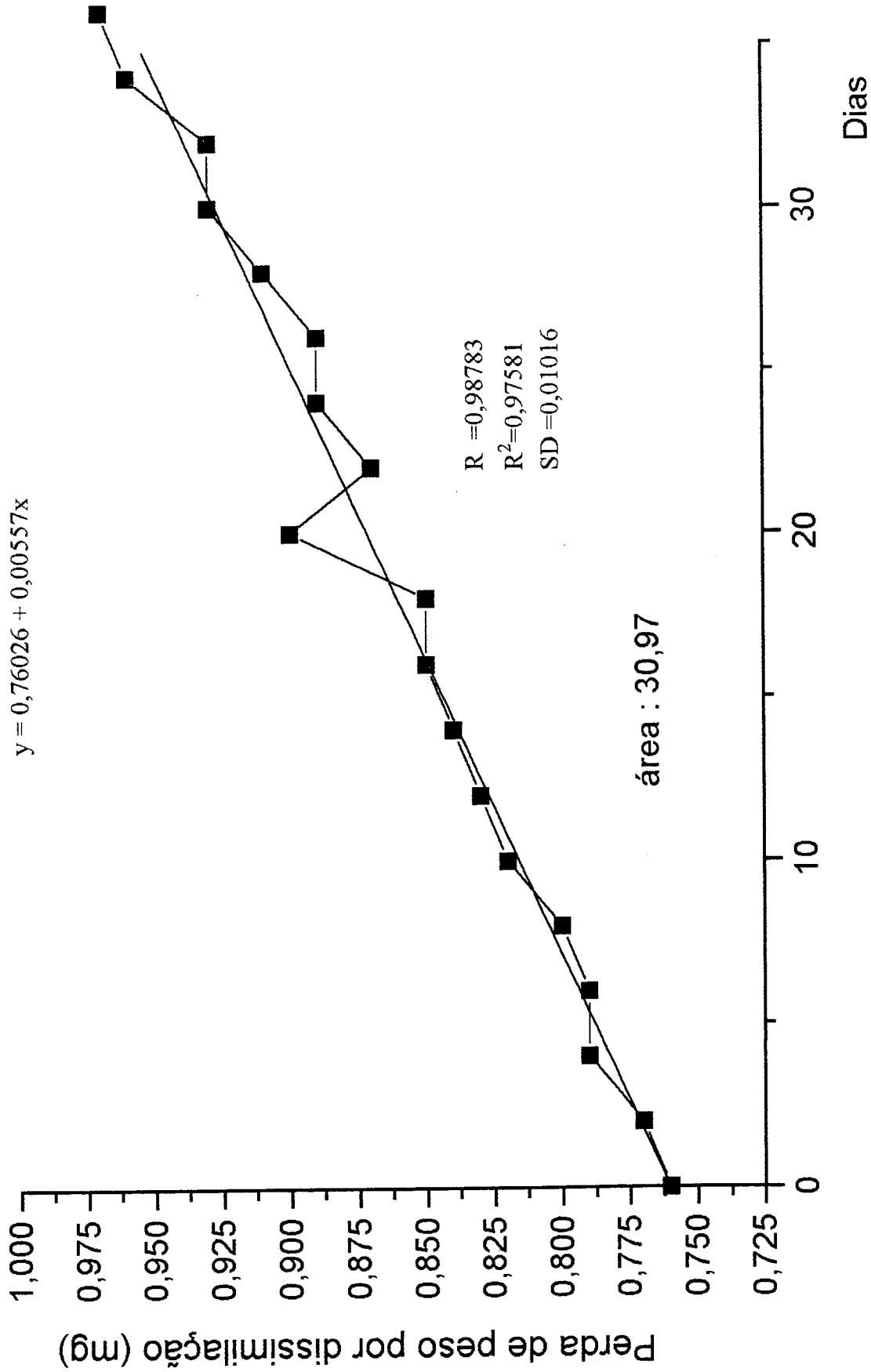


Figura 16. Curva de dissimilação em meio semi-sólido de cultura de células de *Ocotea odorifera* em meio de cultura MC24 (MC6) adicionado de 2,4-D (9,04 μM), BAP (8,88 μM) e KIN (13,95 μM).

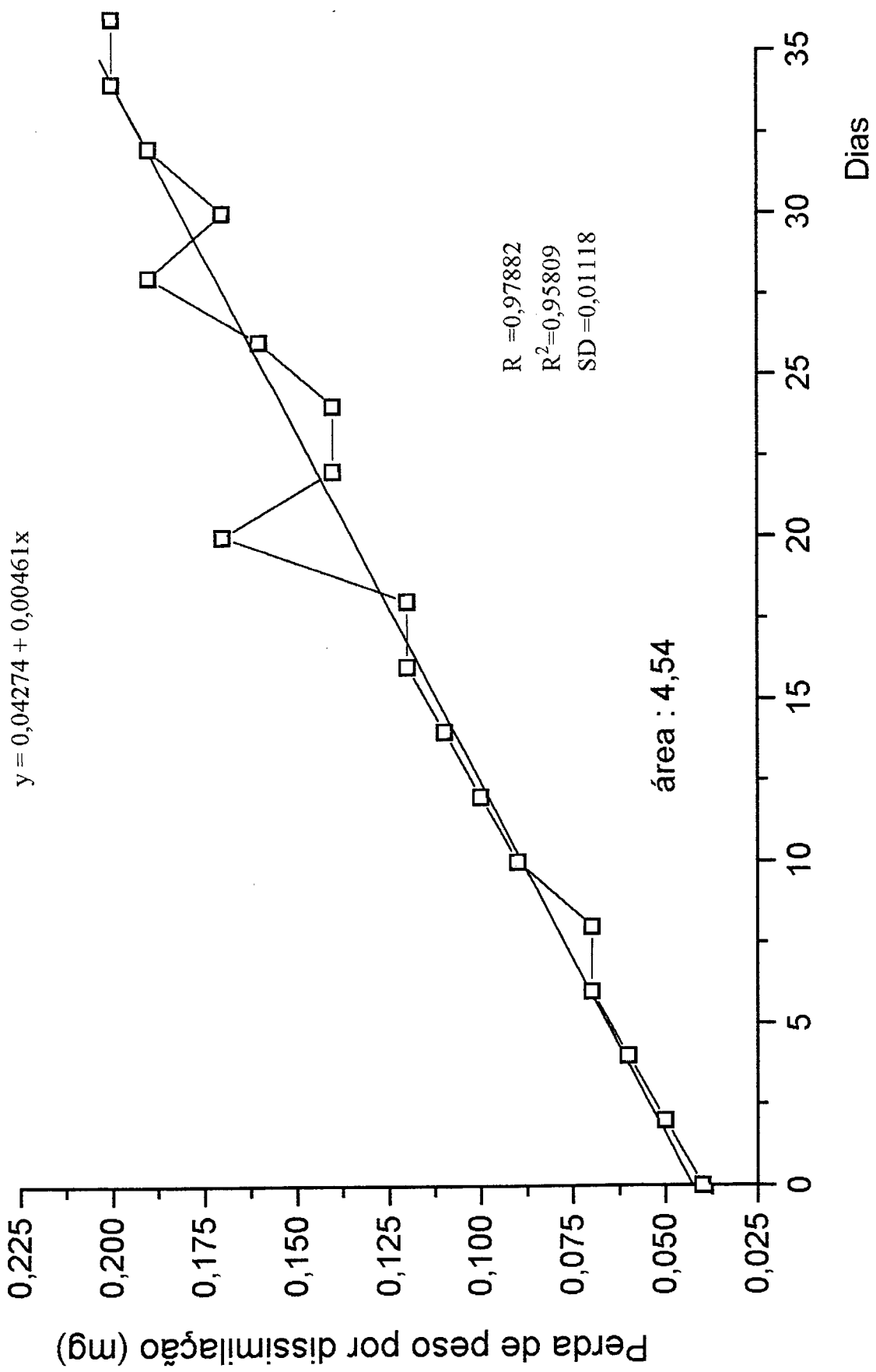


Figura 17. Curva de dissimilação em meio semi-sólido de cultura de células de *Ocotea odorifera* em meio de cultura MC24 (MC5) adicionado de 2,4-D (9,04µM), BAP (8,88µM) e KIN (13,95 µM).

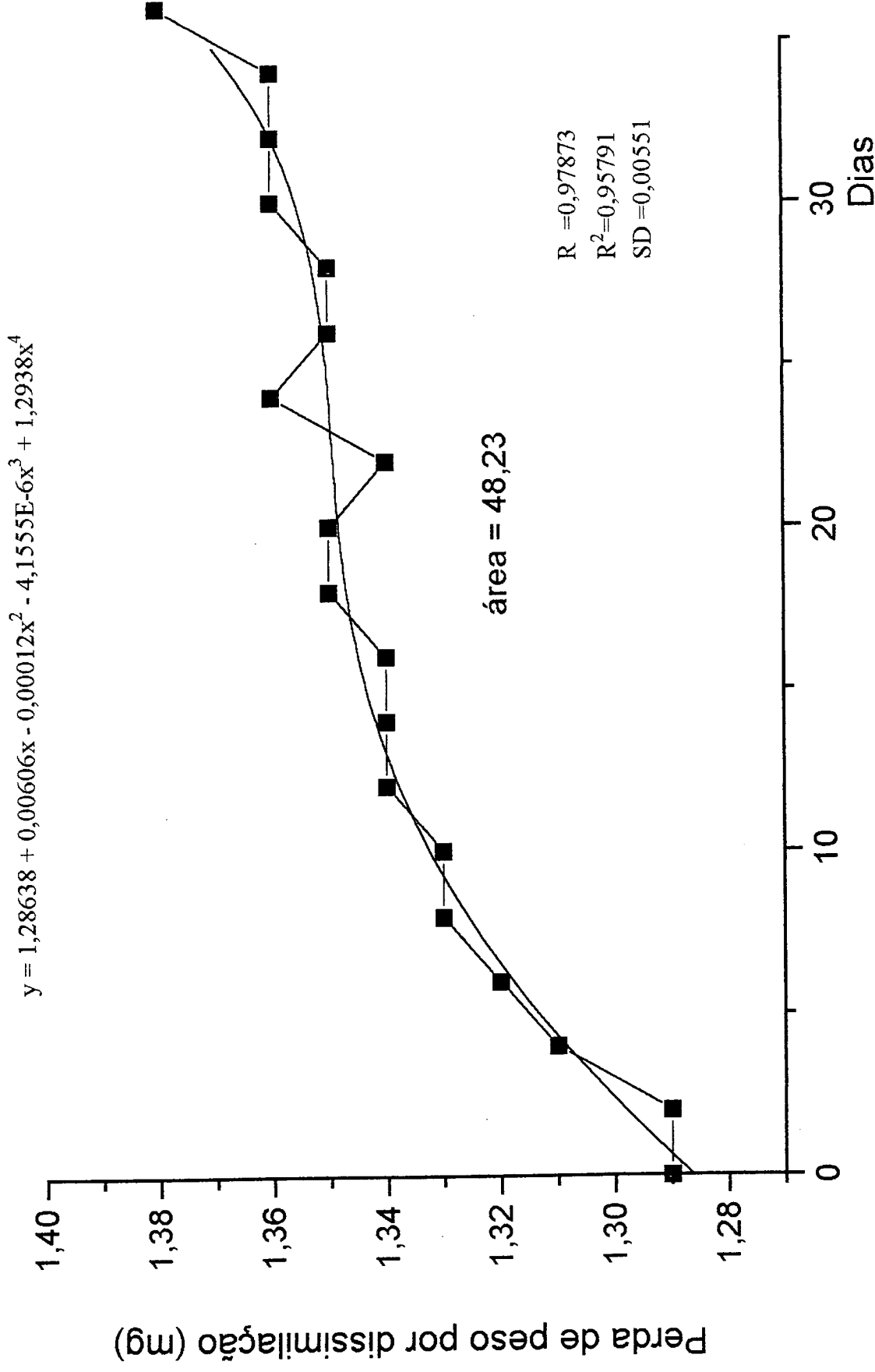


Figura 18. Curva de dissimilação em meio semi-sólido de cultura de células de *Orotea odorifera* em meio de cultura LPM (L_P) adicionado de Picloram (10 μM) e KIN (1 μM).

Figura 19. Aspecto das populações celulares cultivadas em meios de cultura semi-sólidos desprovidos de corante aos 15 dias após a inoculação; **A)** Células em meio de cultura MS isenta de regulador de crescimento (200x); **B)** Células em meio de cultura MS adicionado de Picloram (10 μM) e KIN (1 μM) (200x); **C)** Células em meio MC24 (200x); **D)** Células em meio de cultura WPM Picloram (10 μM) e KIN (1 μM) (200x); **E)** Células em meio de cultura WPM desprovidos de reguladores (200x); **F)** Células em meio de cultura LPm isenta de reguladores (200x); **G)** Células em meio de cultura LPm mais Picloram (10 μM) e KIN (1 μM) (200x). Me = Matriz extracelular; Pc = Parede celular; Vc = Vacúolo.

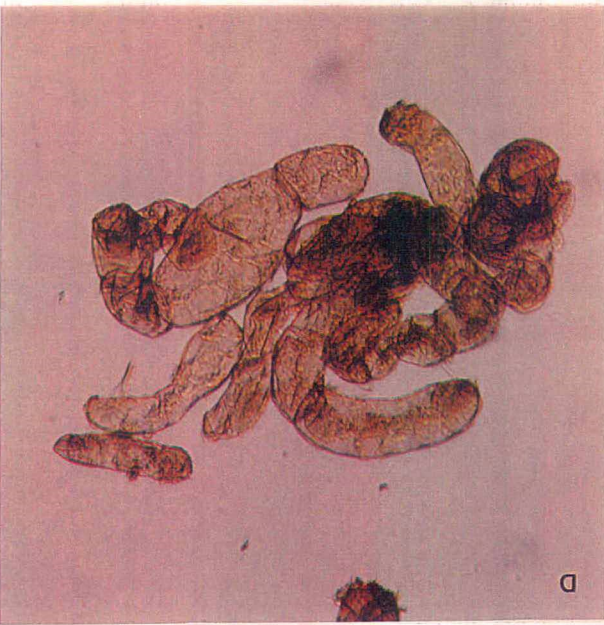
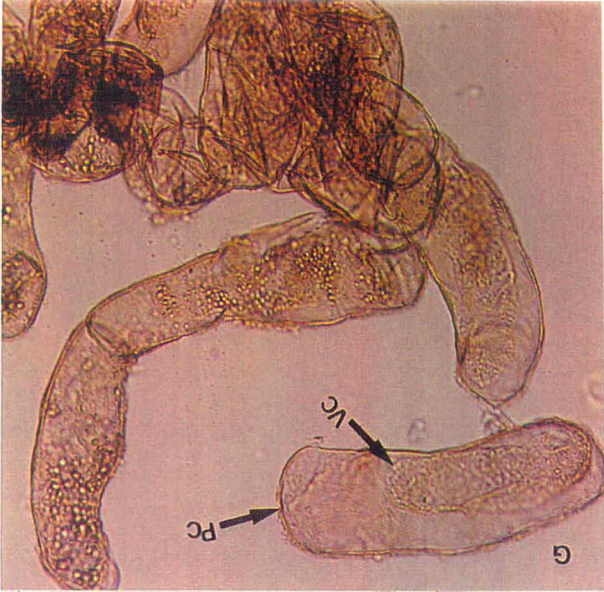
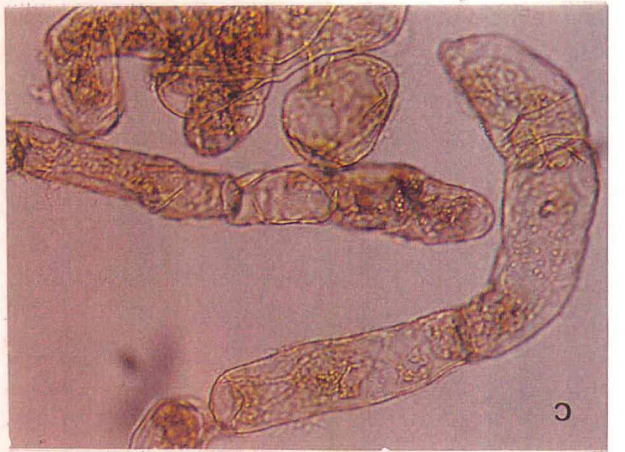
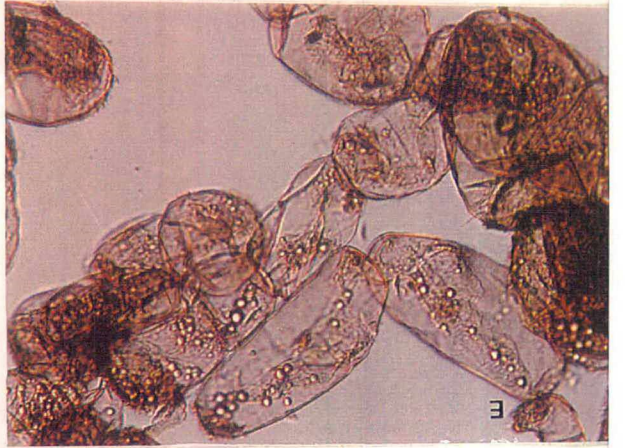


Figura 20. Análise citoquímica das populações celulares em meios de cultura semi-sólidos ausentes de reguladores de crescimento coradas com lugol (200x); **A)** Células em meio de cultura MS aos 15 dias (200x); **B)** Células em meio de cultura MS aos 30 dias (200x); **C)** Células em meio WPM aos 15 dias (400x); **D)** Células em meio de cultura WPM aos 30 dias (200x); **E)** Células em meio de cultura LPm aos 15 dias (200x); **F)** Células em meio de cultura LPm aos 30 dias (200x). Pc = Parede celular; Vc = Vacúolo; Am = Amido.

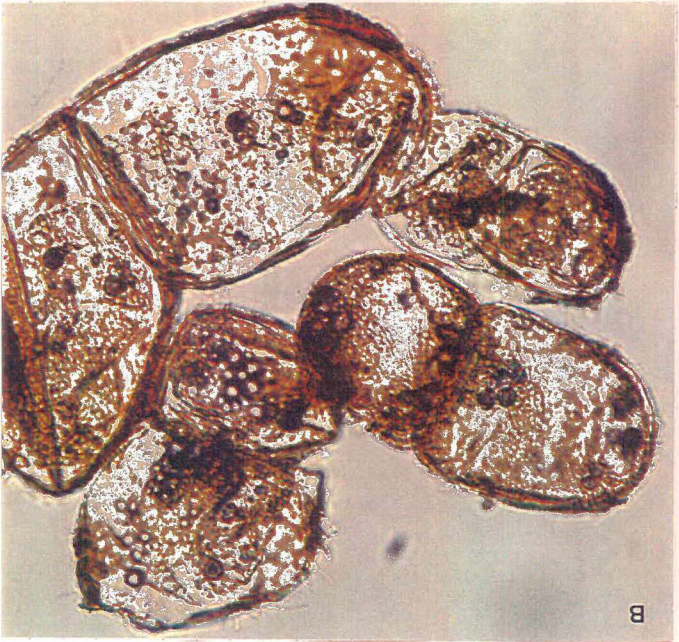
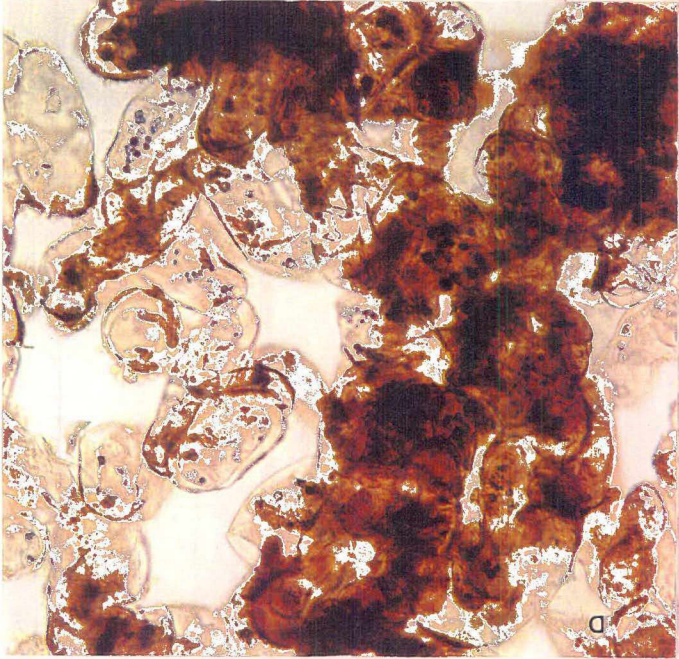
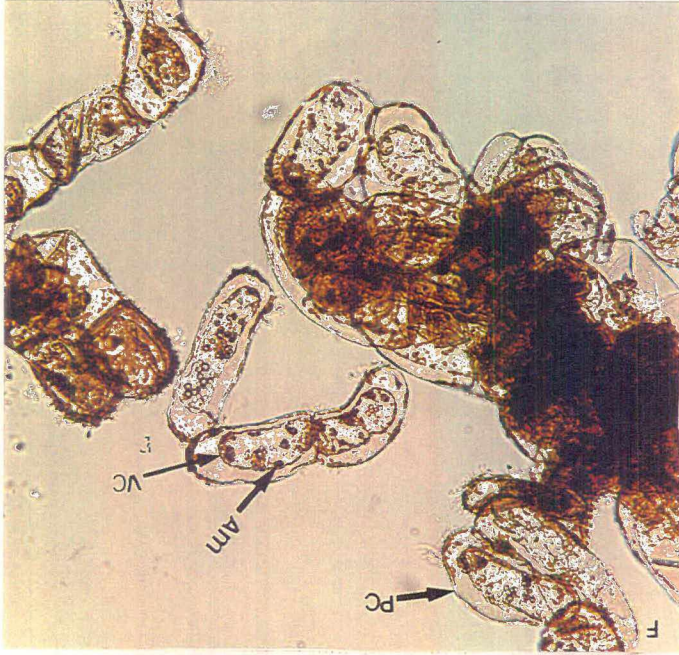
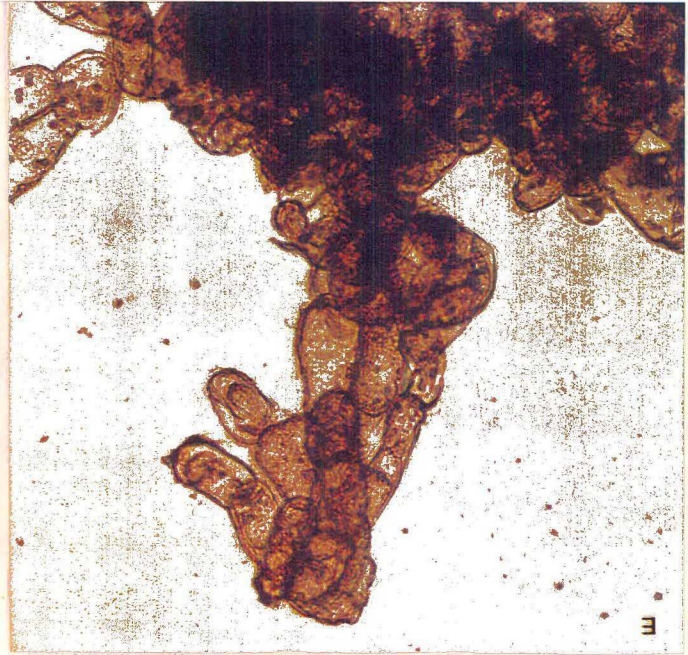


Figura 21. Análise citoquímica das populações celulares em meios de cultura semi-sólidos ausentes de reguladores de crescimento coradas com Sudam. **A)** Células em meio de cultura WPM aos 15 dias (200x); **B)** Células em meio de cultura WPM aos 30 dias (200x); **C)** Células em meio MS aos 15 dias (200x); **D)** Células em meio de cultura MS aos 30 dias (200x); **E)** Células em meio de cultura LPm aos 15 dias (200x); **F)** Células em meio de cultura LPm aos 30 dias (200x). Me = Matriz extracelular; Pc = Parede celular; Vc = Vacúolo.

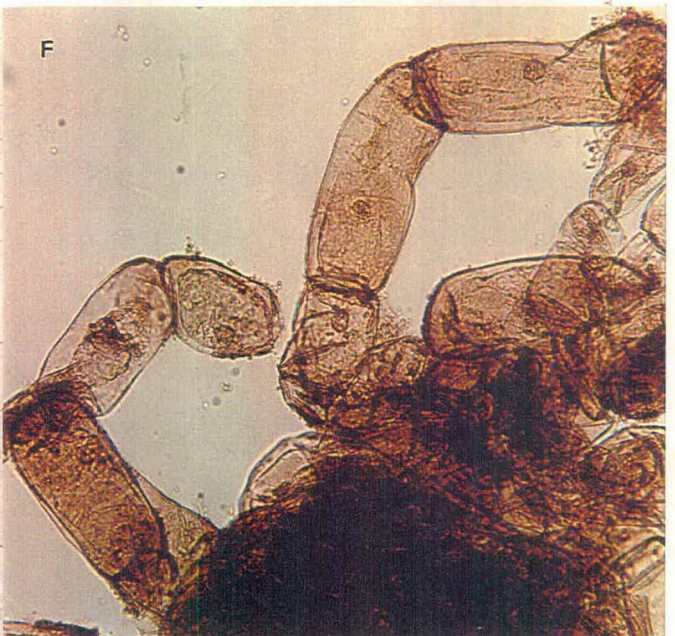
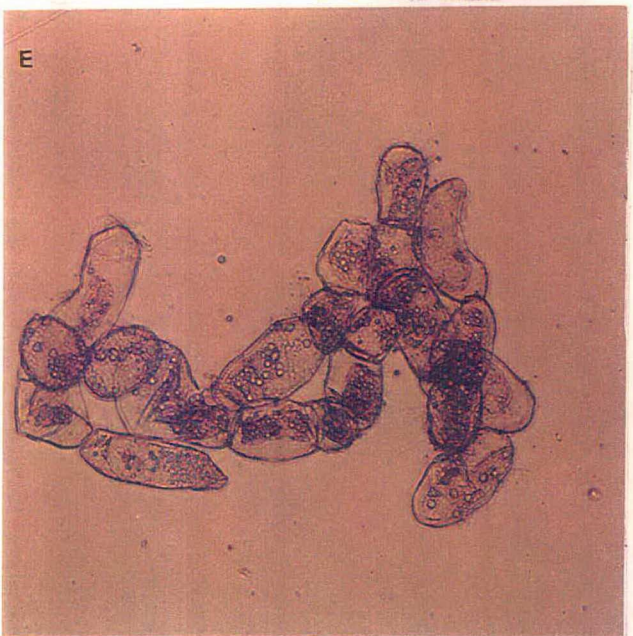
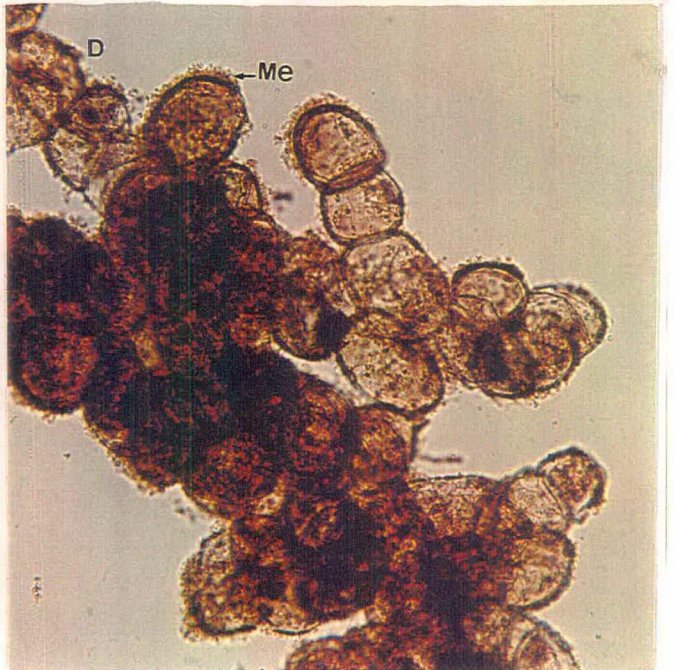
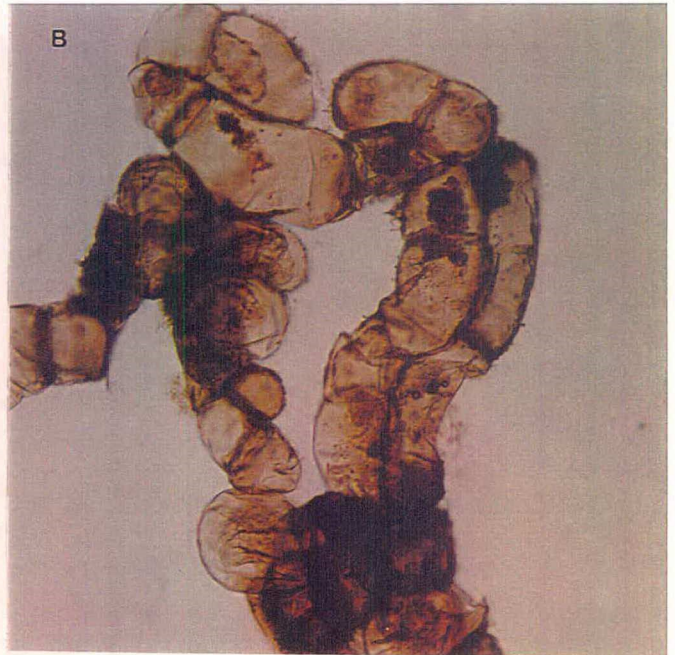
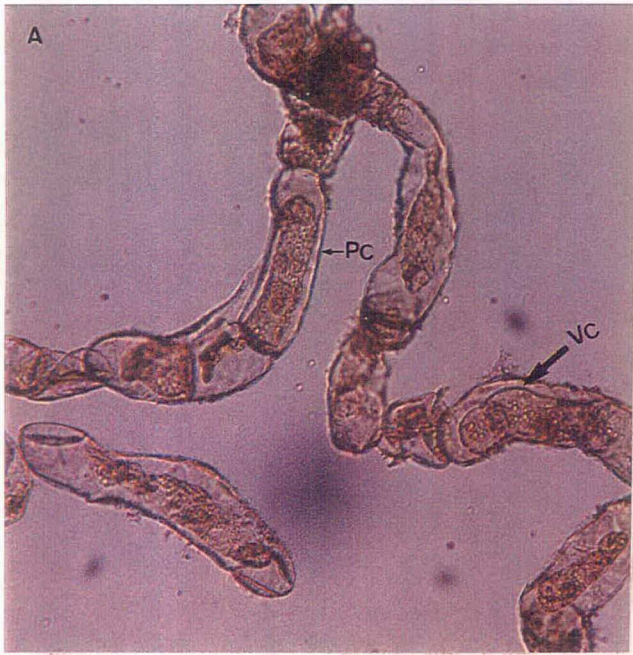


Figura 22. Análise citoquímica das populações celulares em meios de cultura semi-sólidos ausentes de reguladores de crescimento coradas Azul de Evans e Carmin Acético. **A)** Células em meio de cultura LPm aos 15 dias (200x); **B)** Células em meio de cultura LPm aos 30 dias; **C)** Células em meio WPM aos 15 dias (200x); **D)** Células em meio de cultura WPM aos 30 dias (200x); **E)** Células em meio de cultura MS aos 15 dias (200x); **F)** Células em meio de cultura MS aos 30 dias (400x). Pc = Parede celular; Vc = Vacúolo; Mb = Membrana.

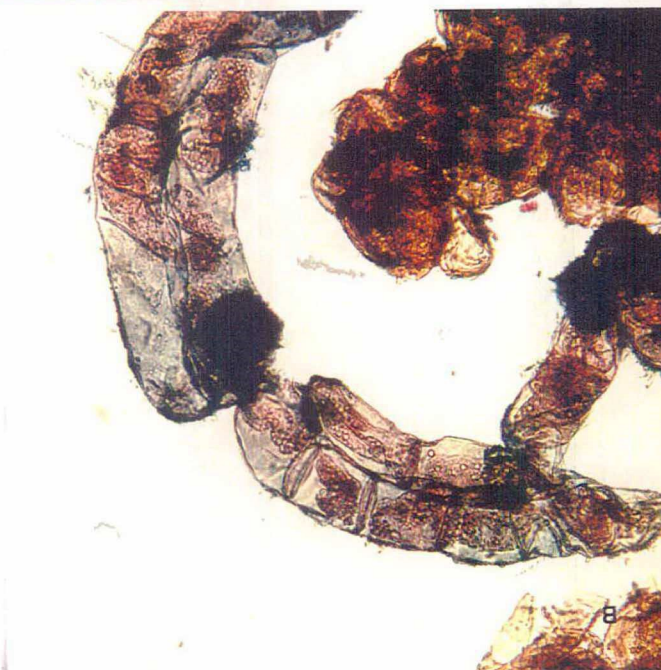
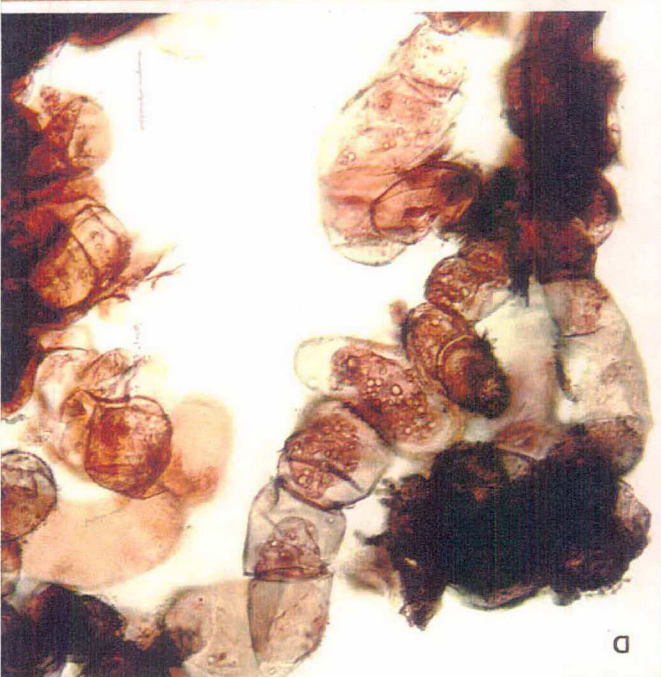
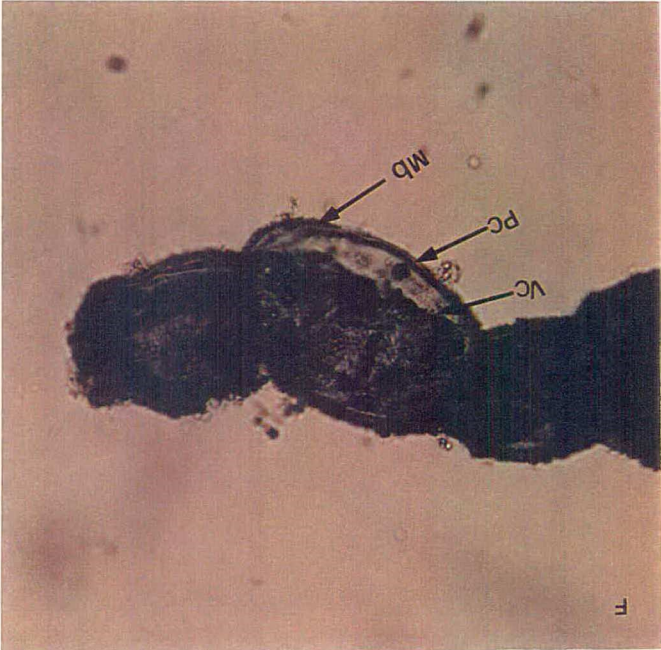
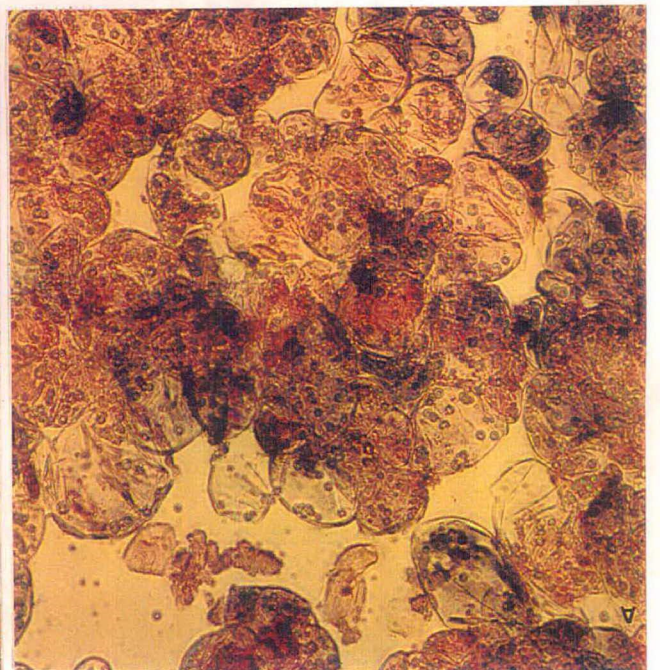
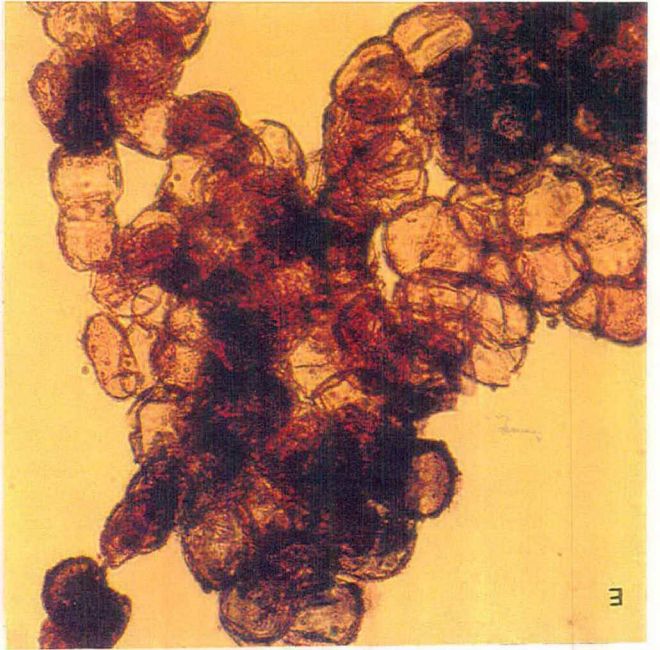


Figura 23. Análise da presença de grãos de amido nas populações celulares cultivadas em meios de cultura semi-sólidos, na presença de reguladores de crescimento Picloram (10 μM) e KIN (1 μM) e 2,4-D (9,04 μM), BAP (8,88 μM) e KIN (13,95 μM) - MC24; **A**) Células em meio de cultura MS com aos 15 dias (200x); **B**) Células em meio de cultura MS aos 30 dias; **C**) Células em meio MC24 aos 15 dias (200x); **D**) Células em meio de cultura MC24 aos 30 dias; **E**) Células em meio de cultura LPm aos 15 dias (200x); **F**) Células em meio de cultura LPm aos 30 dias (200x); **G**) Células em meio de cultura WPM aos 15 dias; **H**) Células em meio de cultura WPM aos 30 dias (200x). Pc = Parede celular; Vc = Vacúolo; Am = Amido.

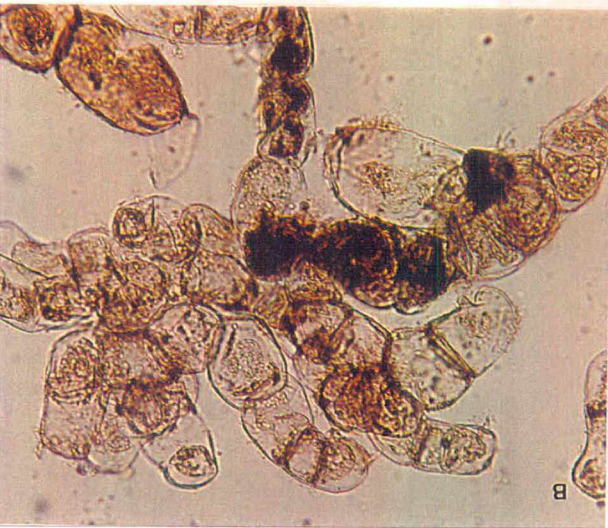
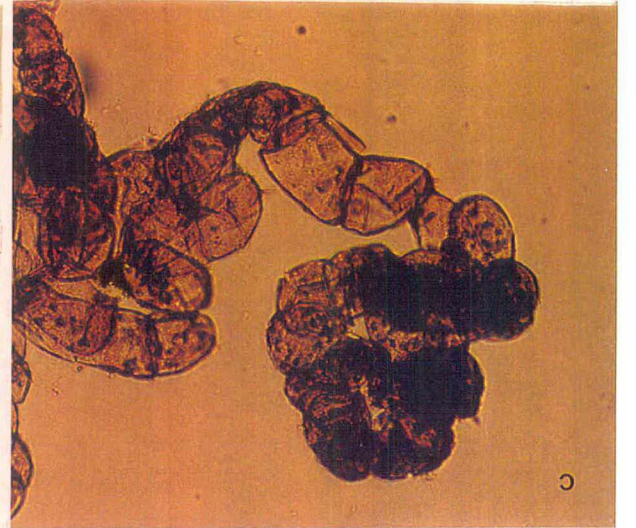
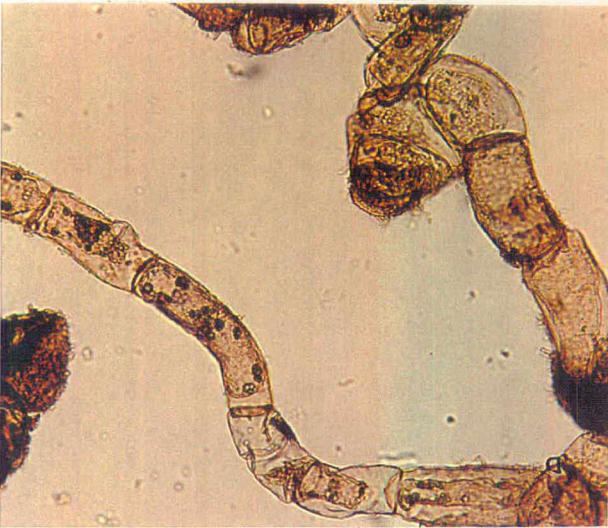
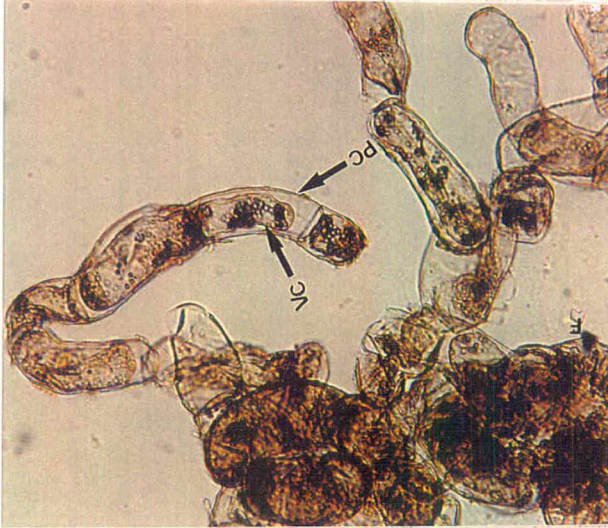
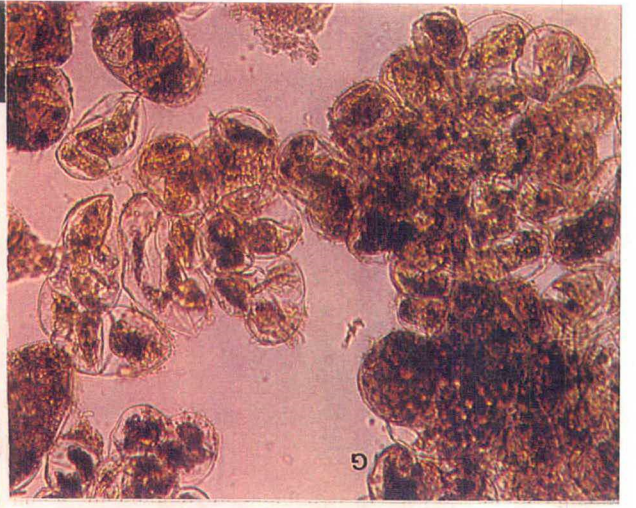
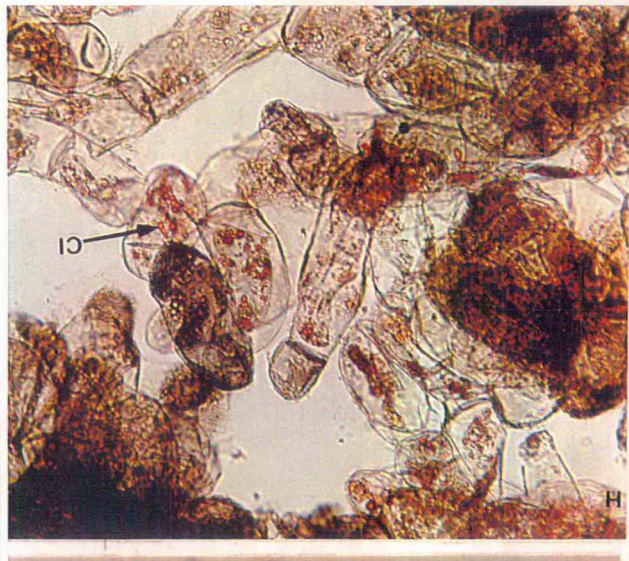
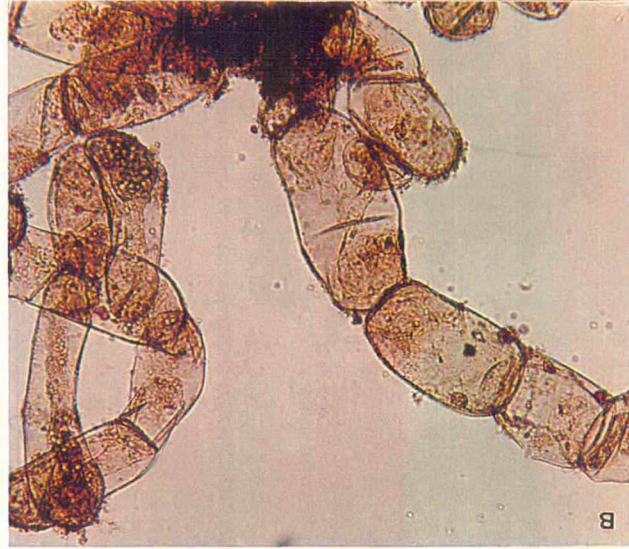
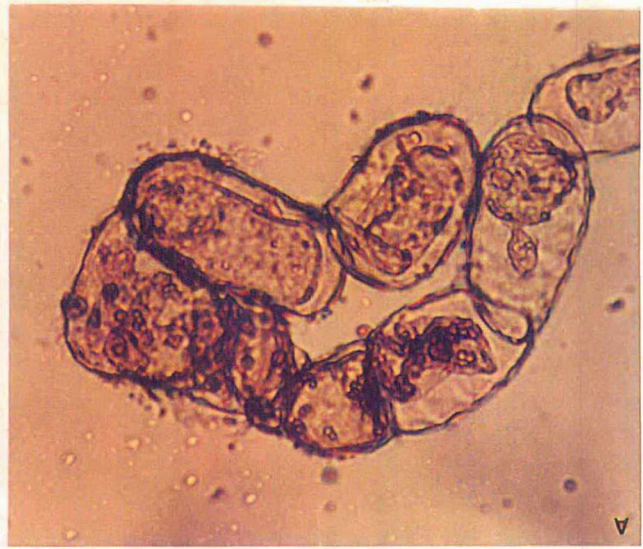


Figura 24. Análise da presença de corpos lipídicos nas populações celulares cultivadas em meios de cultura semi-sólidos, na presença de reguladores de crescimento Picloram (10 μM) e KIN (1 μM) e 2,4-D (9,04 μM), BAP (8,88 μM) e KIN (13,95 μM) - MC24; **A**) Células em meio de cultura MC24 com aos 15 dias (400x); **B**) Células em meio de cultura MC24 aos 30 dias (200x); **C**) Células em meio LPm aos 15 dias (200x); **D**) Células em meio de cultura LPm aos 30 dias (200x); **E**) Células em meio de cultura WPM aos 15 dias (200x); **F**) Células em meio de cultura WPM aos 30 dias (200x); **G**) Células em meio de cultura MS aos 15 dias (200x); **H**) Células em meio de cultura MS aos 30 dias (200x). Pc = Parede celular; Vc = Vacúolo; Cl = Corpos lipídicos.



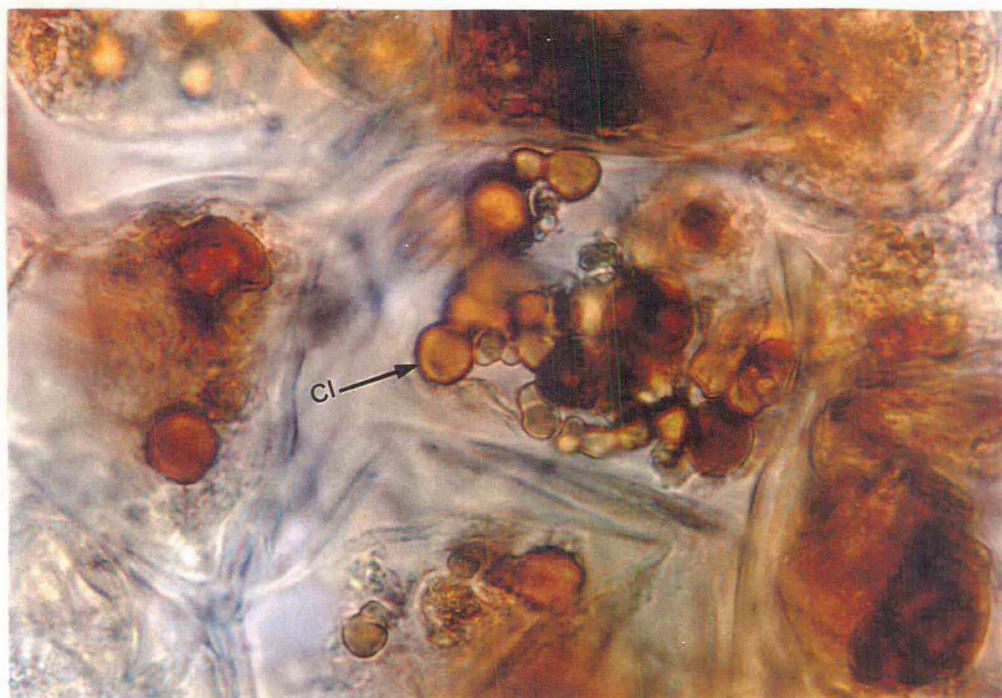


Figura 25. Presença de corpos lipídicos em calos de folha de *Ocotea odorifera*, cultivado em meio de cultura semi-sólido LPm, adicionado de Picloram (10 μM) e KIN (1 μM) (1000x). Cl = Corpos lipídicos.

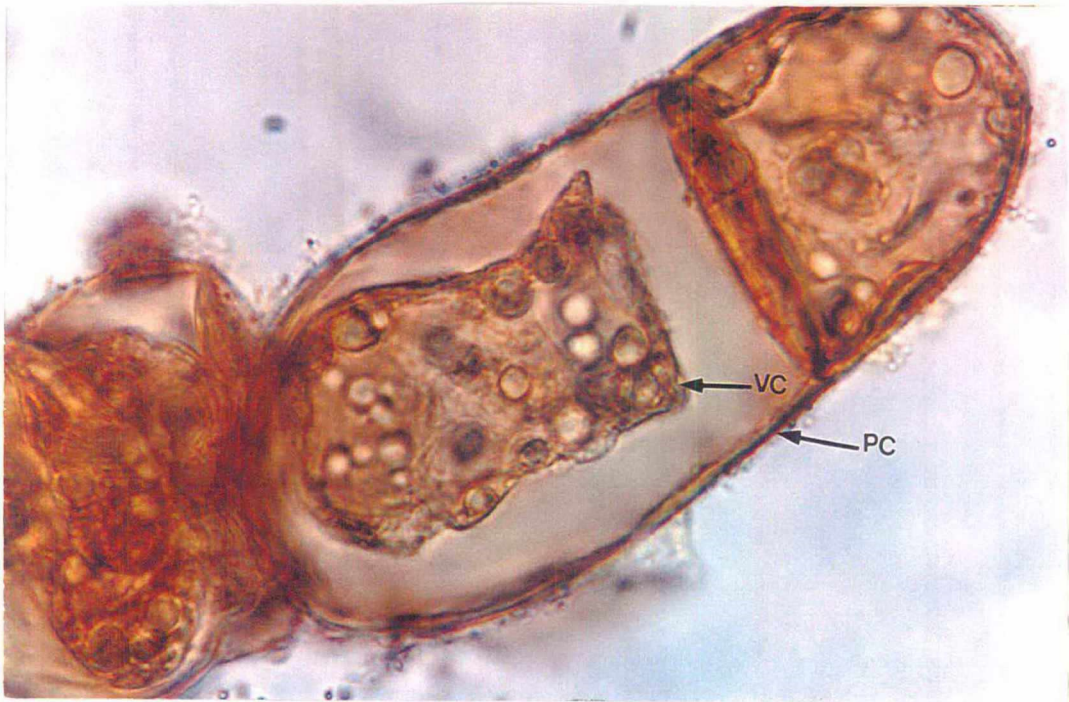


Figura 26. Presença de corpos lipídicos em calos de folha de *Ocotea odorifera*, cultivado em meio de cultura WPM semi-sólido, adicionado de Picloram ($10 \mu\text{M}$) e KIN ($1\mu\text{M}$) (1000x). Vc = Vacúolo; Pc = Parede celular.

Figura 27. Células coradas com Azul de Evans e Carmim Acético, as quais foram cultivadas em meios de cultura semi-sólidos, na presença de reguladores de crescimento Picloram (10 μM) e KIN (1 μM) e 2,4-D (9,04 μM), BAP (8,88 μM) e KIN (13,95 μM) - MC24. **A)** Células em meio de cultura MC24 com aos 15 dias (200x); **B)** Células em meio de cultura MC24 aos 30 dias (200x); **C)** Células em meio MS aos 15 dias (200x); **D)** Células em meio de cultura MS aos 30 dias (200x); **E)** Células em meio de cultura LPm aos 15 dias (200x); **F)** Células em meio de cultura LPm aos 30 dias (200x); **G)** Células em meio de cultura WPM aos 15 dias (200x); **H)** Células em meio de cultura WPM aos 30 dias (200x). Pc = Parede celular; Vc = Vacúolo.

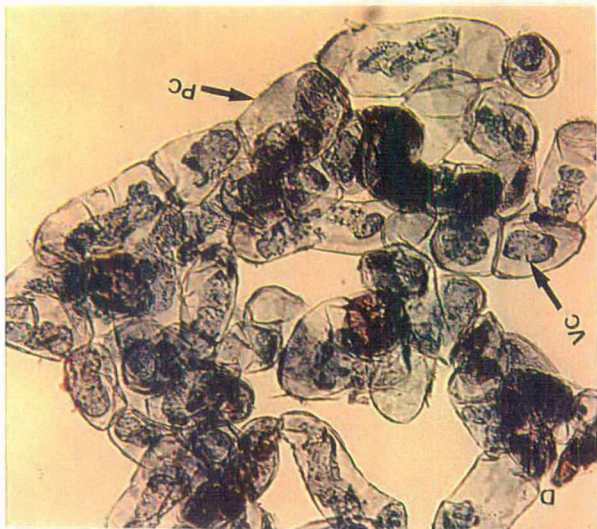
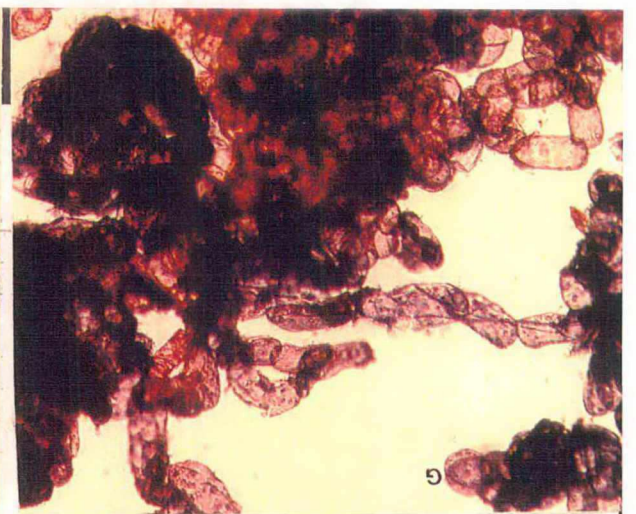
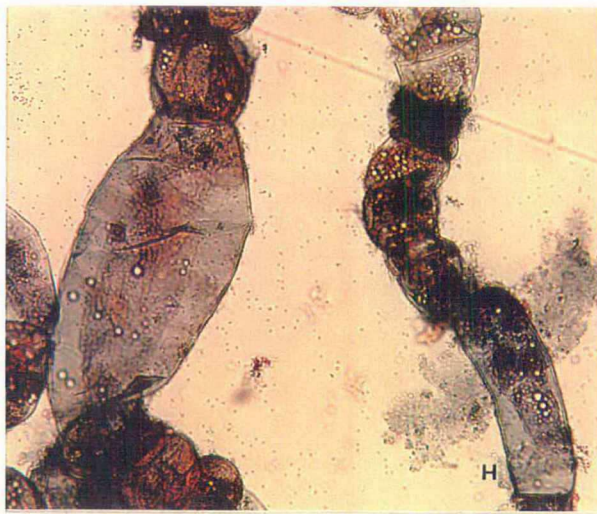


Figura 28. Células provenientes de suspensão celular desprovidos de corante aos 15 dias após a inoculação. **A)** Células em meio de cultura MC24 isenta de regulador de crescimento (100x); **B)** Células em meio de cultura WPM (200x); **C)** Células em meio MS (200x); **D)** Células em meio de cultura MS - Picloram (10 μ M) e KIN (1 μ M) (200x); **E)** Células em meio de cultura LPm mais Picloram (10 μ M) e KIN (1 μ M) (100x); **F)** Células em meio de cultura LPm mais Picloram (10 μ M) e KIN (1 μ M) (100x); **G)** Células em meio de cultura WPM mais Picloram (10 μ M) e KIN (1 μ M) (200x); **F)** Células em meio de cultura LPm (200x). Pc = Parede celular; Vc = Vacúolo.

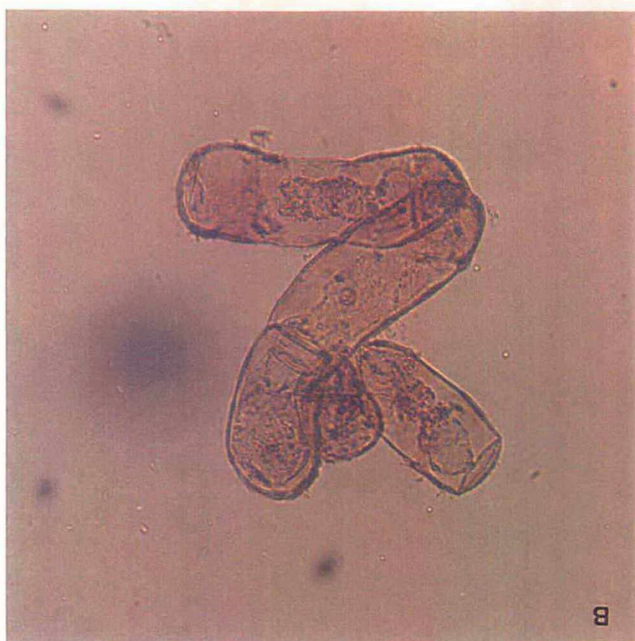
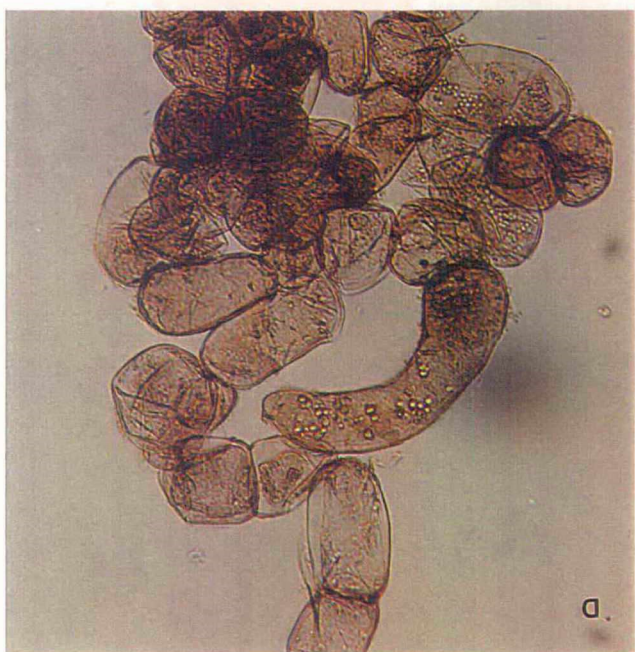
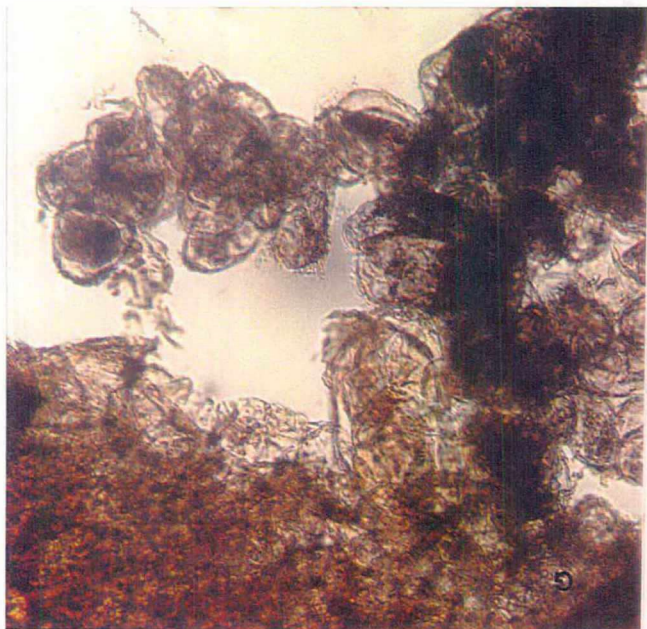
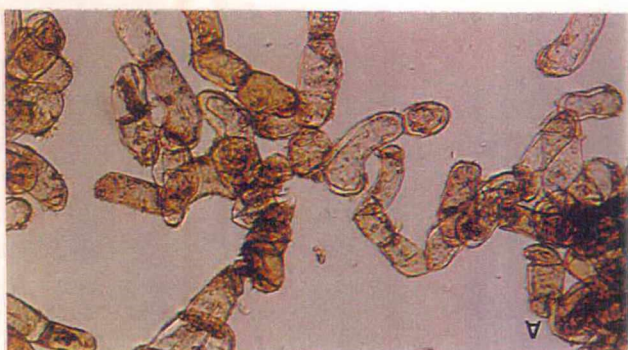
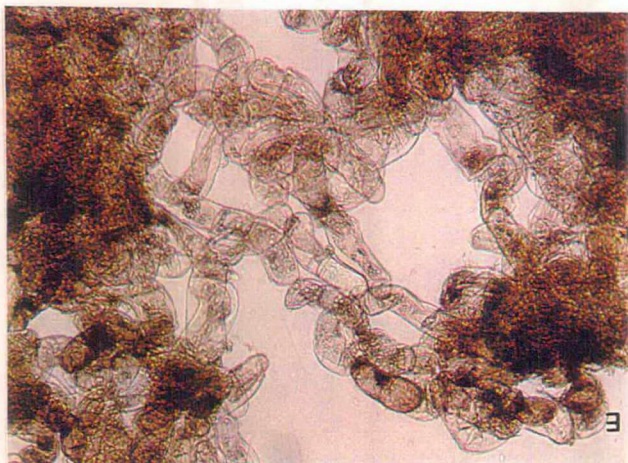
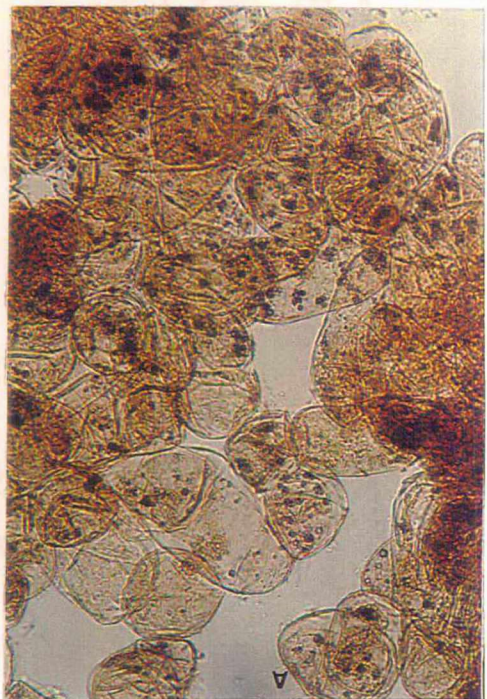
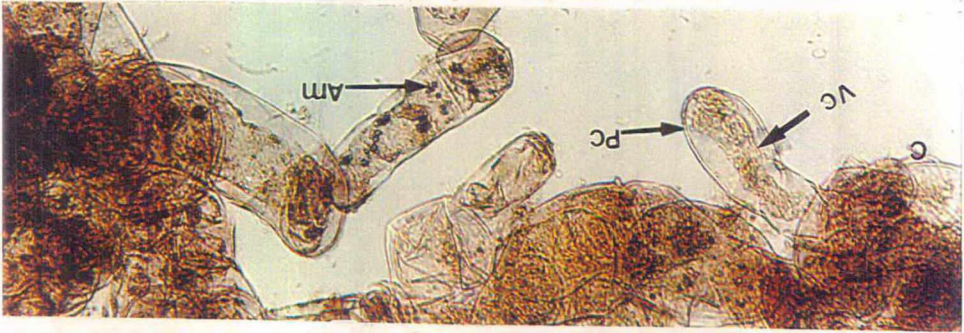
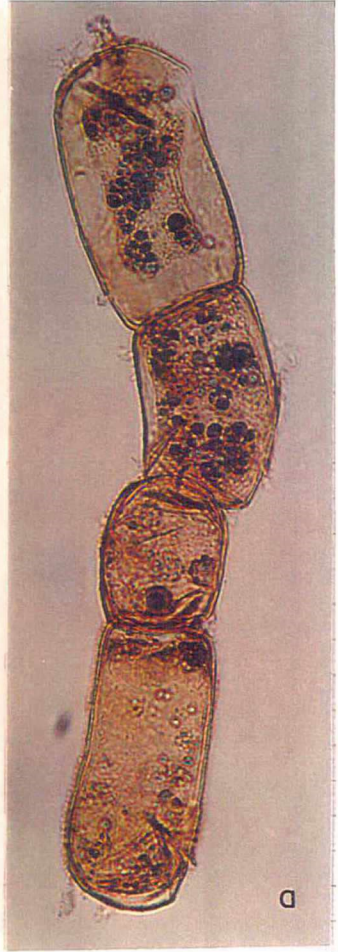
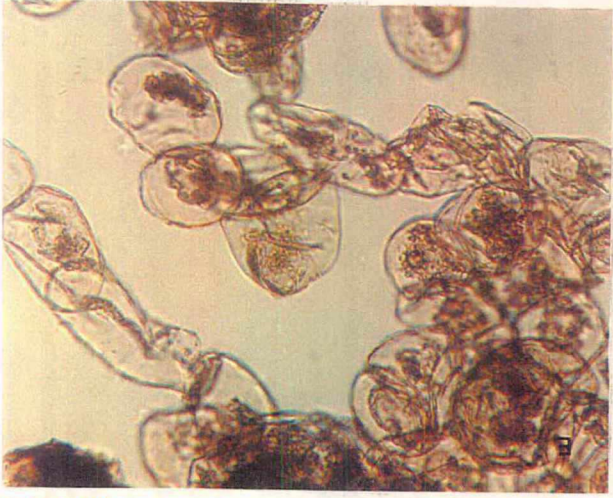
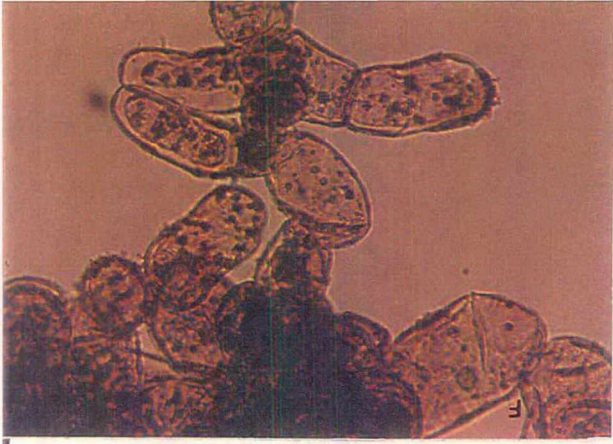


Figura 29. Análise da presença de grãos de amido das células em suspensão utilizando-se meio de cultura ausente de reguladores de crescimento. **A)** Células em meio de cultura MS aos 15 dias (200x); **B)** Células em meio de cultura MS aos 30 dias (200x); **C)** Células em meio LPm aos 30 dias (200x); **D)** Células em meio de cultura WPM aos 30 dias (400x); **E)** Células em meio de cultura LPm aos 15 dias (200x); **F)** Células em meio de cultura WPM aos 15 dias (200x). Pc = Parede celular; Vc = Vacúolo; Am = Amido.



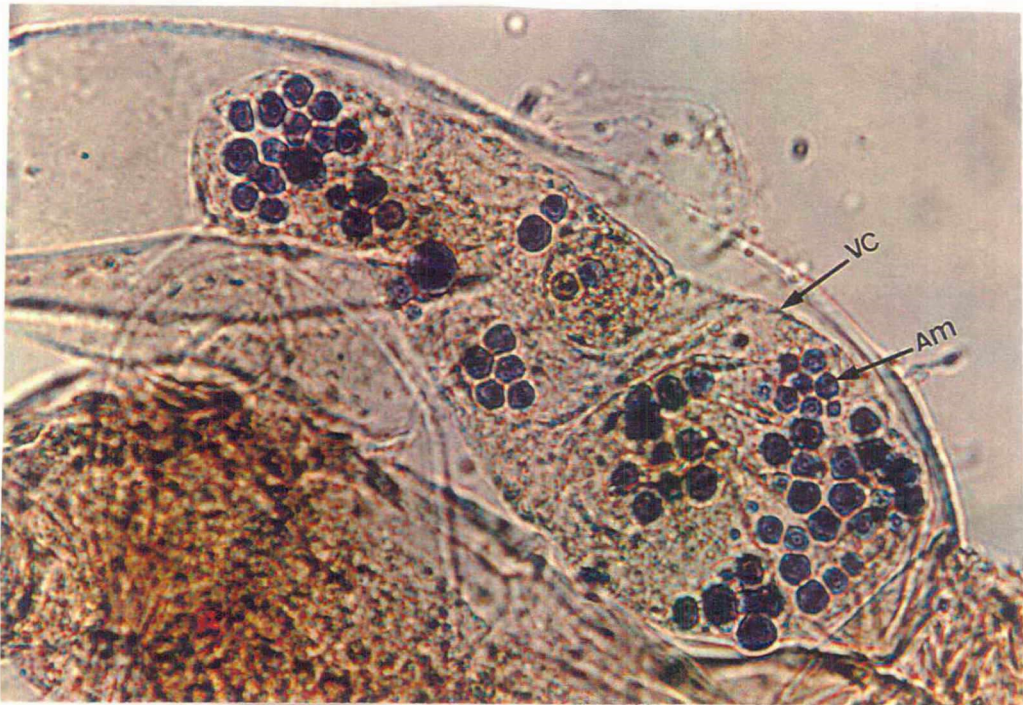


Figura 30. Presença de grãos de amido em células de raiz de *Ocotea odorifera*, cultivadas em meio de cultura LPm, aos 30 dias após a inoculação (1000x). Vc = Vacúolo; Am = Amido.

Figura 31. Análise da presença de corpos lipídicos das células em suspensão utilizando-se meio de cultura ausente de reguladores de crescimento. **A)** Células em meio de cultura MS aos 15 dias (200x); **B)** Células em meio de cultura MS aos 30 dias (100x); **C)** Células em meio LPm aos 15 dias (200x); **D)** Células em meio de cultura LPm aos 30 dias (200x); **E)** Células em meio de cultura WPM aos 15 dias (200x); **F)** Células em meio de cultura WPM aos 30 dias (200x). Pc = Parede celular; Vc = Vacúolo; Cl = Corpos lipídicos.

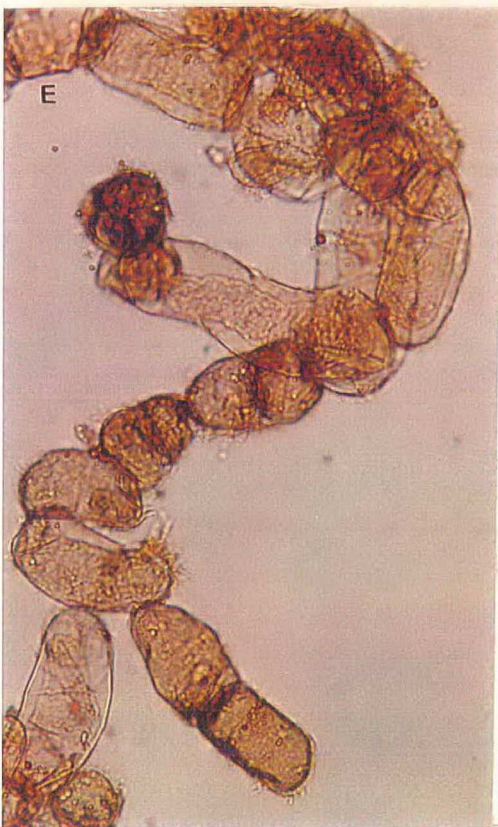
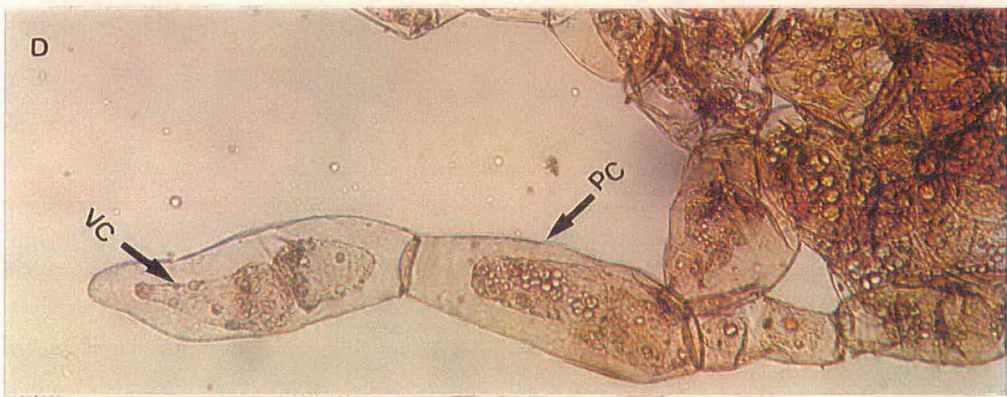
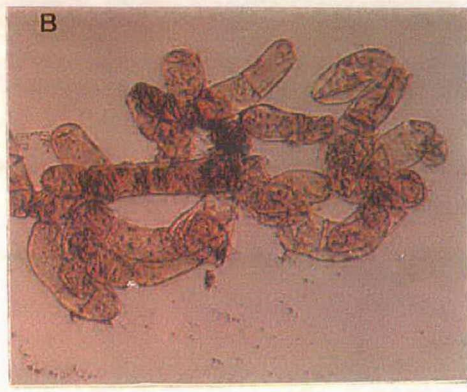


Figura 32. Análise citoquímica de células em suspensão, ausentes de reguladores de crescimento coradas Azul de Evans e Carmin Acético. **A)** Células em meio de cultura WPM aos 15 dias (200x); **B)** Células em meio de cultura WPM aos 30 dias (400x); **C)** Células em meio MS aos 15 dias (100x); **D)** Células em meio de cultura MS aos 30 dias (200x); **E)** Células em meio de cultura LPm aos 15 dias (200x); **F)** Células em meio de cultura LPm aos 30 dias (200x). Pc = Parede celular; Vc = Vacúolo; Me = Matriz extracelular.

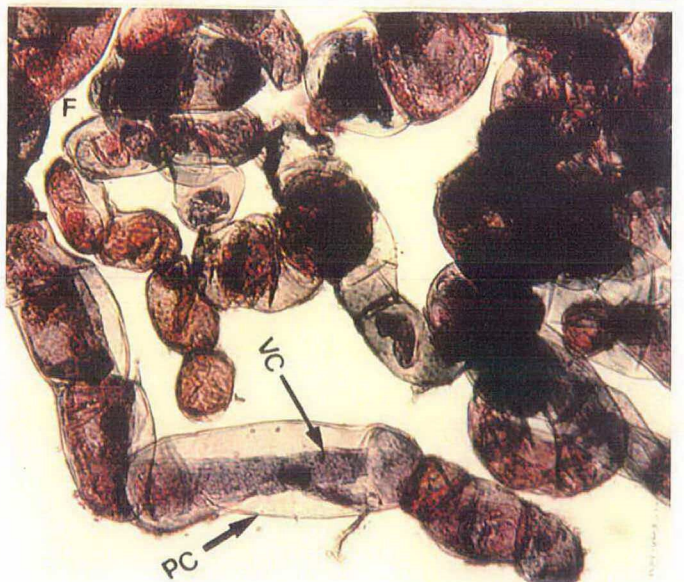
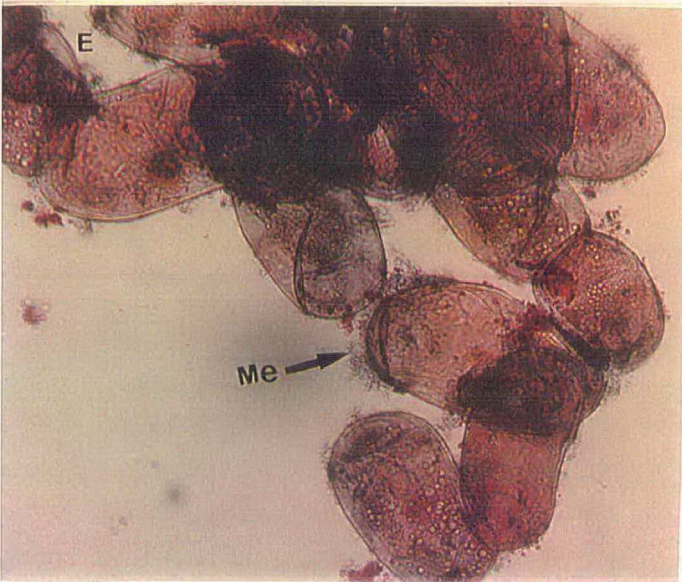
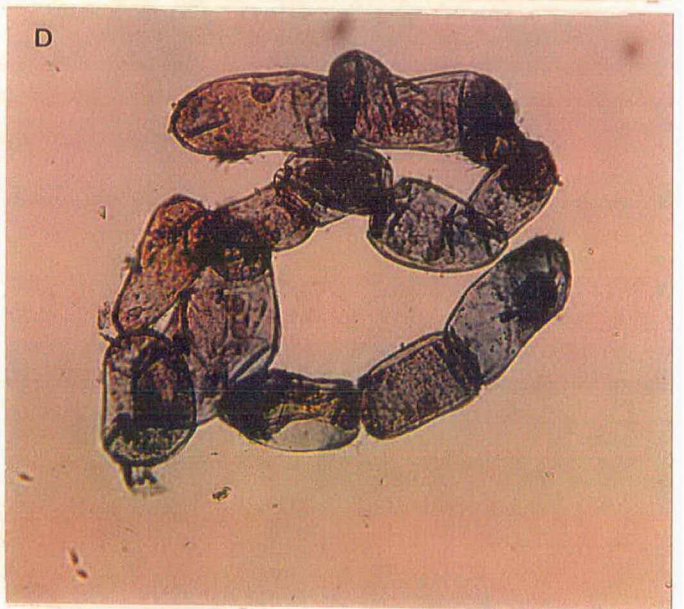
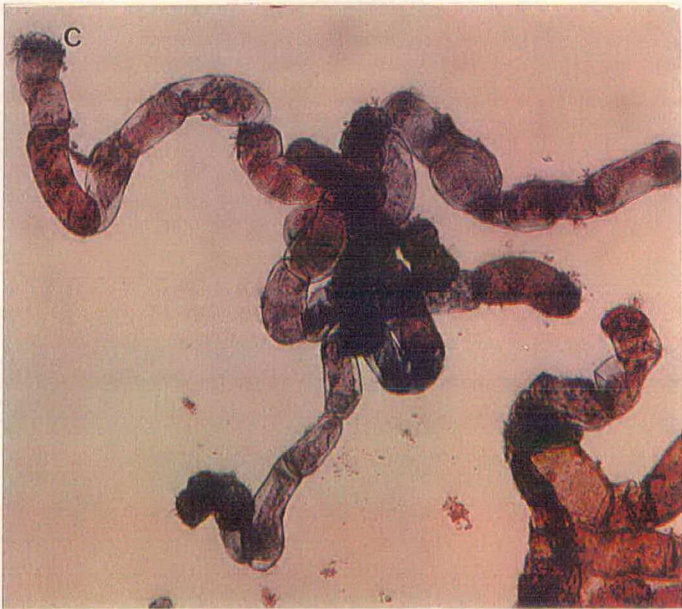
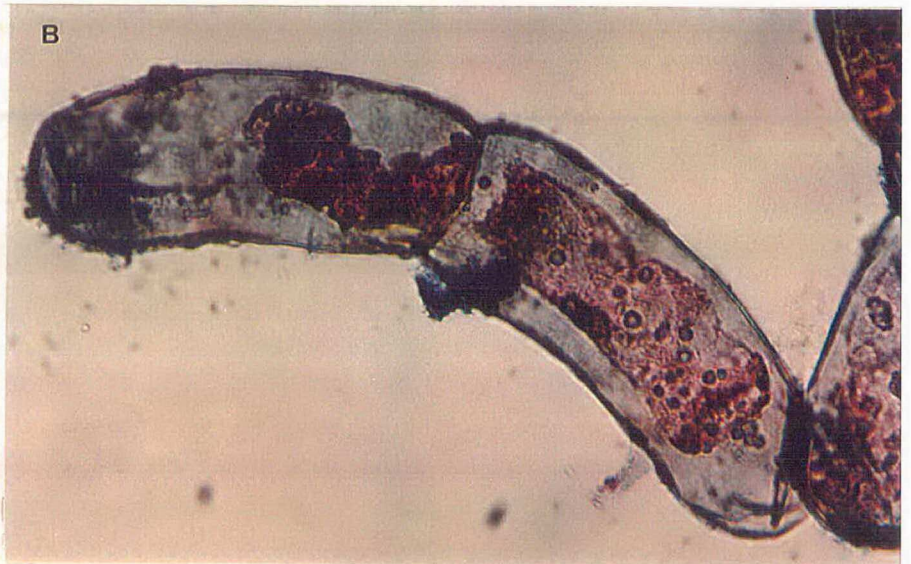
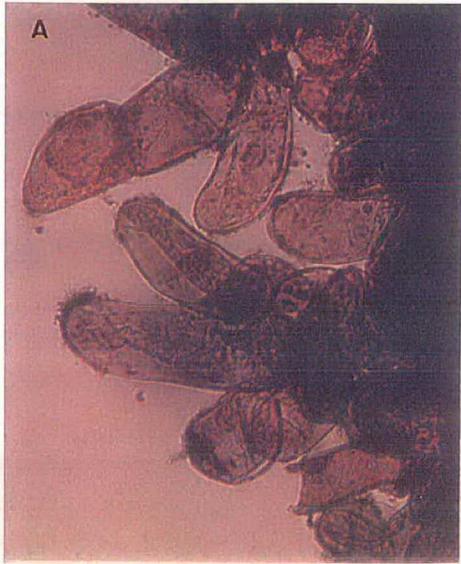


Figura 33. Avaliação de células provenientes de suspensões celulares coradas com Lugol, na presença de reguladores de crescimento Picloram (10 μM) e KIN (1 μM) e 2,4-D (9,04 μM), BAP (8,88 μM) e KIN (13,95 μM) - MC24. **A)** Células em meio de cultura MS com aos 15 dias (200x); **B)** Células em meio de cultura MS aos 30 dias (400x); **C)** Células em meio LPM aos 15 dias (200x); **D)** Células em meio de cultura LPM aos 30 dias (400x); **E)** Células em meio de cultura MC24 aos 15 dias (200x); **F)** Células em meio de cultura MC24 aos 30 dias (200x); **G)** Células em meio de cultura WPM aos 15 dias (400x). **H)** Células em meio de cultura WPM aos 30 dias (200x). Pc = Parede celular; Vc = Vacúolo; Am = Amido.

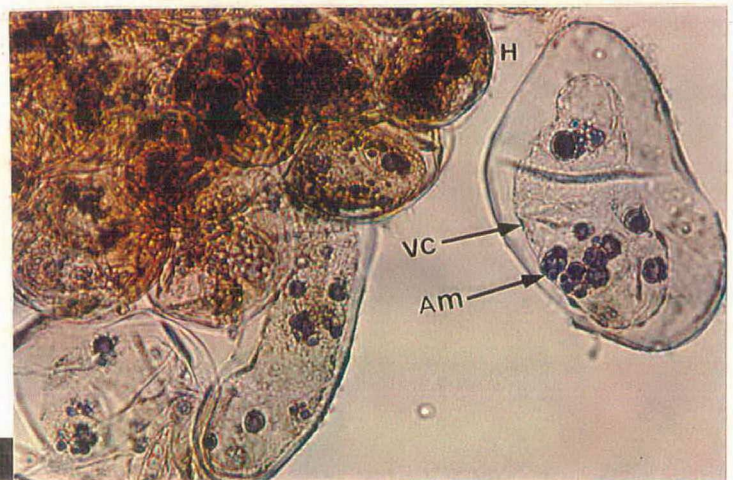
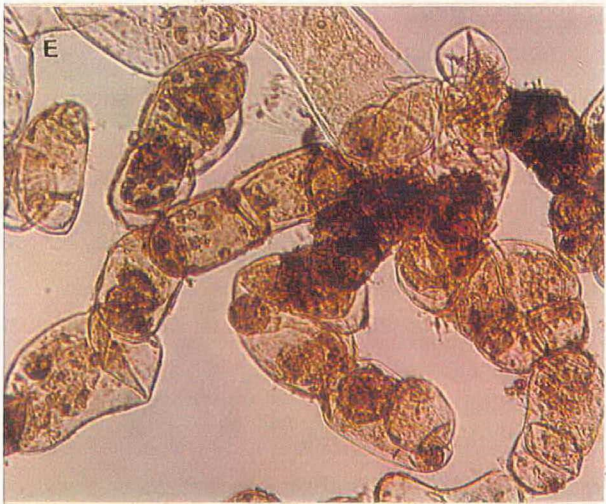
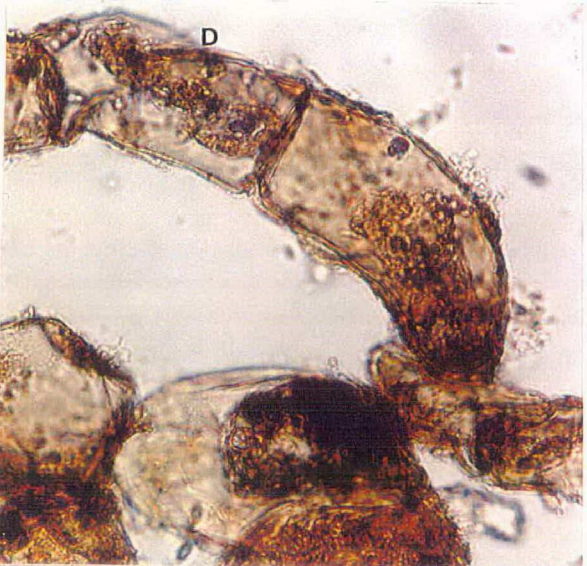
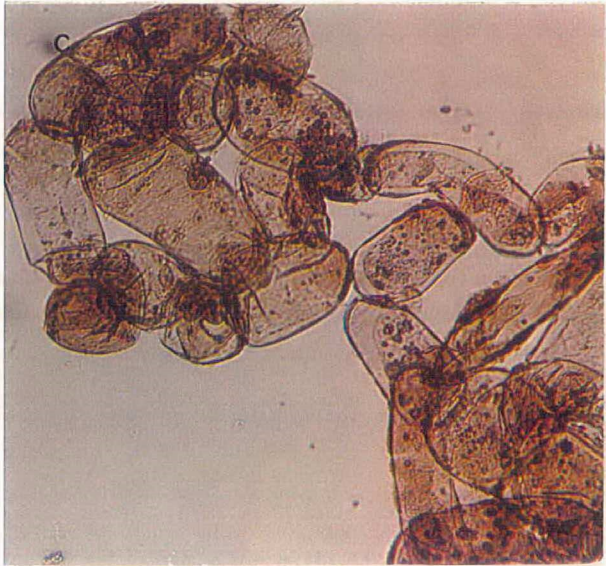
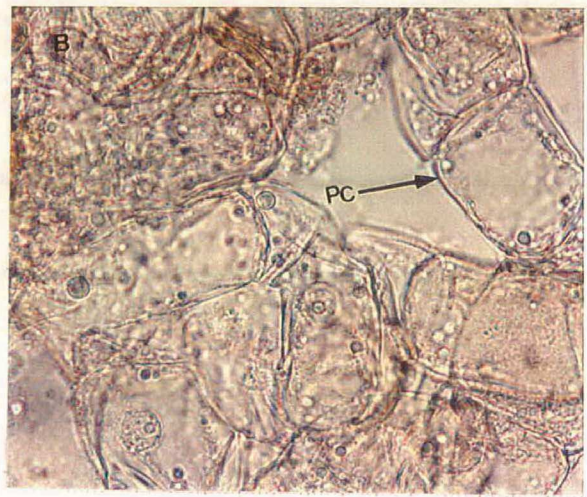




Figura 34 - Presença de grãos de amido em células de raiz de *Ocotea odorifera*, cultivadas em meio de cultura LPm na presença de reguladores de crescimento Picloram ($10 \mu\text{M}$) e KIN ($1 \mu\text{M}$), aos 30 dias após a inoculação (1000x). Vc = Vacúolo; Am = Amido.

Figura 35. Avaliação de células provenientes de suspensões celulares coradas com Sudam, na presença de reguladores de crescimento Picloram (10 μM) e KIN (1 μM) e 2,4-D (9,04 μM), BAP (8,88 μM) e KIN (13,95 μM) - MC24 (200x); **A**) Células em meio de cultura MS com aos 15 dias (400x); **B**) Células em meio de cultura MS aos 30 dias (200x); **C**) Células em meio LPm aos 15 dias (200x); **D**) Células em meio de cultura LPm aos 30 dias (200x); **E**) Células em meio de cultura WPM aos 15 dias (200x); **F**) Células em meio de cultura WPM aos 30 dias (200x); **G**) Células em meio de cultura MC24 aos 15 dias (200x); **H**) Células em meio de cultura MC24 aos 30 dias (200x). Pc = Parede celular; Vc = Vacúolo; Cl = Corpos lipídicos..

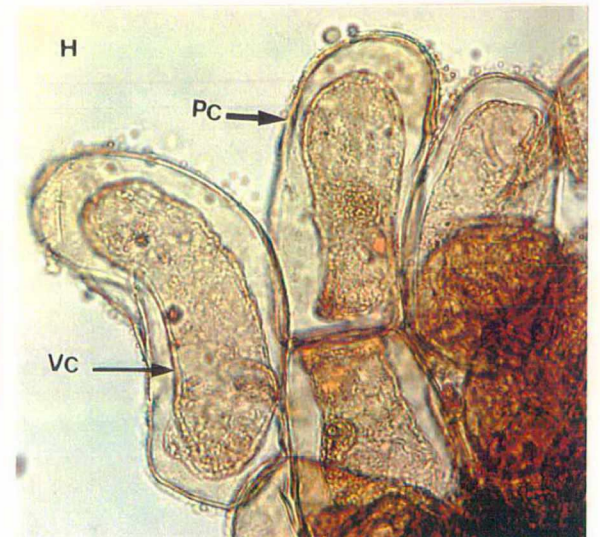
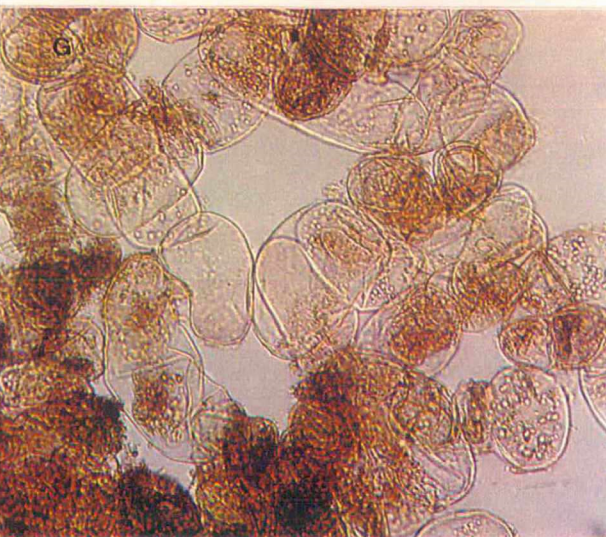
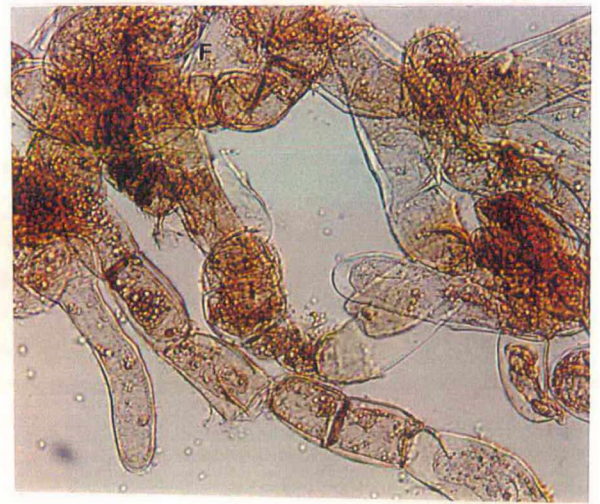
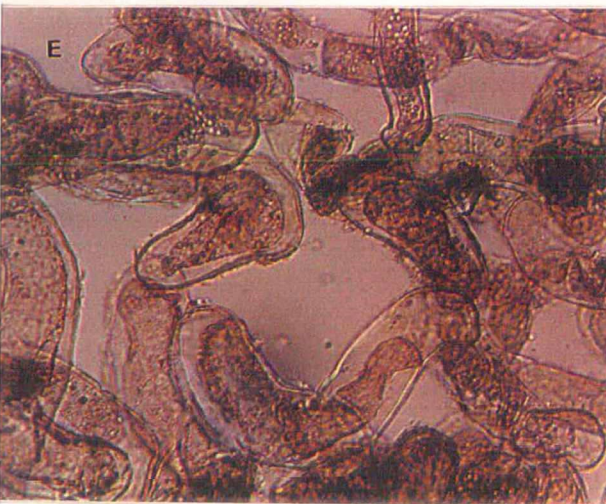
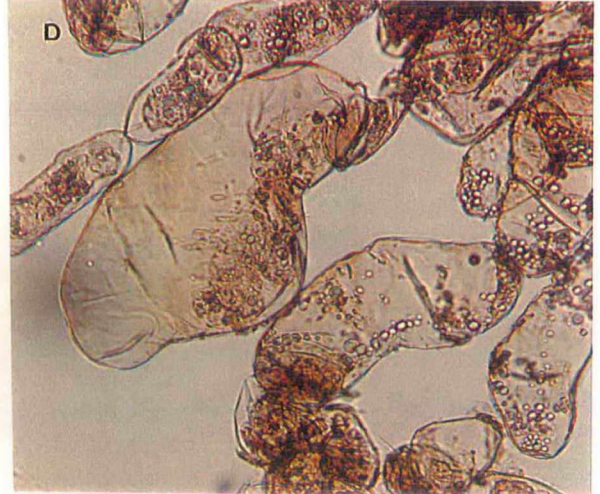
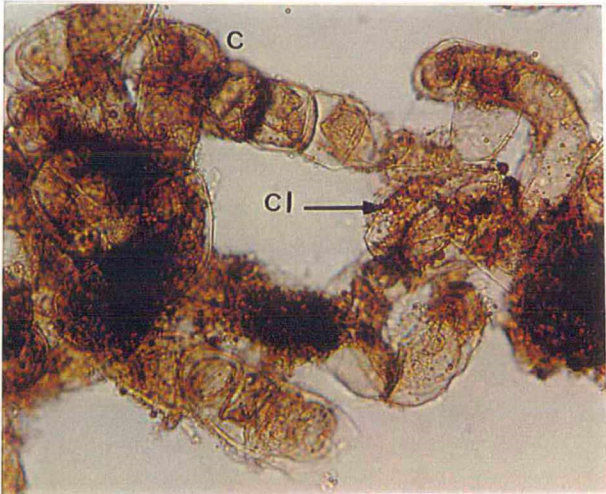
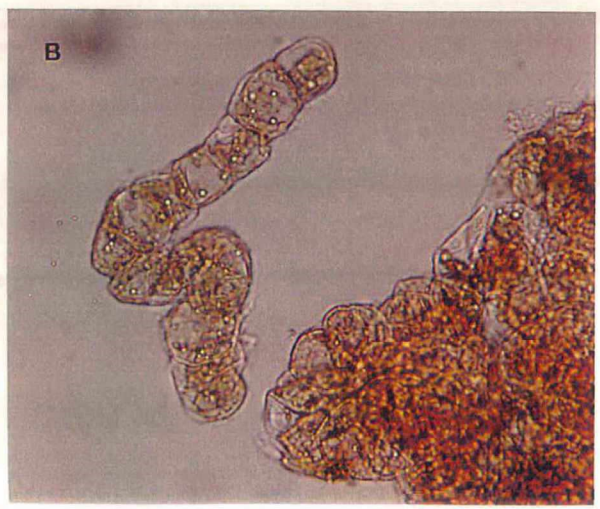


Figura 36. Células coradas com Azul de Evans e Carmim Acético, as quais foram cultivadas em meio de cultura semi-sólido, na presença de reguladores de crescimento Picloram (10 μ M) e KIN (1 μ M) e 2,4-D (9,04 μ M), BAP (8,88 μ M) e KIN (13,95 μ M) - MC24. **A)** Células em meio de cultura MS com aos 15 dias (200x); **B)** Células em meio de cultura MS aos 30 dias (200x); **C)** Células em meio LPm aos 15 dias (400x); **D)** Células em meio de cultura LPm aos 30 dias (200x); **E)** Células em meio de cultura WPM aos 15 dias (200x); **F)** Células em meio de cultura WPM aos 30 dias (200x); **G)** Células em meio de cultura MC24 aos 15 dias (200x); **H)** Células em meio de cultura MC24 aos 30 dias (200x). Pc = Parede celular; Vc = Vacúolo.

