

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

Cristine Luciana de Souza Rescarolli

EMBRIOGÊNESE SECUNDÁRIA, CARACTERIZAÇÃO
BIOQUÍMICA E HISTOQUÍMICA DE CULTURAS
EMBRIOGÊNICAS DE *Ocotea catharinensis* (MEZ.) (LAURACEAE)

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Biologia
Vegetal da Universidade Federal de
Santa Catarina, para a obtenção de
grau de Mestre em Biologia Vegetal
Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ana Maria
Viana
Co-Orientador: Prof. Dr. Marcelo
Maraschin

FLORIANÓPOLIS
2011

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

R429e Rescarolli, Cristine Luciana de Souza
Embriogênese secundária, caracterização bioquímica e
histoquímica de culturas embriogênicas de *ocotea catharinensis*
(mez.) (lauraceae) [dissertação] / Cristine Luciana de Souza
Rescarolli ; orientadora, Ana Maria Viana. - Florianópolis,
SC, 2011.
137 p.: il., grafs., tabs.

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

Inclui referências

1. Biologia vegetal. 2. *Ocotea catharinensis*. 3.
Regulamento genético. 4. Histoquímica. I. Viana, Ana Maria.
II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Biologia Vegetal. III. Título.

CDU 57

*Dedico aos meus pais, Romalino
e Márcia que me ensinaram a nunca
desistir dos meus sonhos.
Com todo o amor!*

“Um diamante é um pedaço de carvão que se saiu bem sob pressão.”

AGRADECIMENTOS

“Aprendi que deveríamos ser gratos a Deus por não nos dar tudo que lhe pedimos.” (William Shakespeare)

Agradeço a Deus por me dar a vida, mas por não me dar tudo o que peço, mas sim me dar forças, inspiração, família, amigos, enfim, as condições necessárias para cada uma das minhas conquistas.

Agradeço à Prof.^a Dr.^a Ana Maria Viana pela orientação durante o mestrado, pelos valiosos ensinamentos, dedicação, paciência, compreensão e devidos puxões de orelha. Ao Prof. Dr. Marcelo Maraschin por sempre entender exatamente onde estavam as minhas dúvidas metabólicas/químicas/bioquímicas/etc, indicando o caminho para buscar a solução dos meus problemas. À Prof.^a Dr.^a Zenilda Bouzon que com muita paciência auxiliou na confecção e compreensão do fantástico mundo da histoquímica, juntamente com o seu fiel escudeiro Msc. Éder por sua disponibilidade, paciência e compreensão. O auxílio de vocês tornou este trabalho muito mais rico e acrescentou conhecimentos e valores inestimáveis que levarei por toda a minha vida. Especialmente à Dr.^a Fernanda Ramlov por ter tido toda a paciência do mundo para me auxiliar nas análises bioquímicas e paciência para me ensinar coisas completamente novas, e aprender junto comigo tantas outras. Fê R., seu lugarzinho no céu está reservado! Um agradecimento especial à Fernanda Kokowicz Pilatti, por dividirmos tantos momentos de dúvidas, de erros, a felicidade dos acertos, as longas horas no laboratório tentando achar uma forma de dominar o mundo... Fê K., você fez toda a diferença nesses dois últimos anos!

“...Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós...” (C.Chaplin)

Ao pessoal do Laboratório de Algas Marinhas (LAMAR) e do Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (LMBV), contar com a colaboração, acolhimento e compreensão de vocês foi fundamental. Ao Laboratório de Microscopia de Fluorescência do BEG, pela disponibilização dos equipamentos para as análises de histoquímica, e à técnica Chirle Ferreira, por sua ajuda, calma e atenção. À Prof.^a Dr.^a Edna Regina Amante, por disponibilizar a estrutura do Laboratório de Tecnologia de Frutas e Hortaliças para a realização das análises de espectrofotometria.

Aos membros da banca pela disponibilidade, em especial ao Prof. Dr. Gilmar Zaffari, que foi quem me ensinou os primeiros passos no cultivo celular vegetal, por ter me mostrado como a biotecnologia e a fisiologia vegetal são fascinantes.

Aos amigos que fiz no mestrado, Leo, companheiro de aventuras amazônicas, Thalita, Carol, Alexandre, obrigado pela troca de idéias e informações pelos corredores, Romualdo, Carmem, Michele, Talita, que nem sempre estavam por perto. Colegas do laboratório de fisiologia vegetal, Maini e Eduardo, a troca de experiências nos torna maior e mais fortes!

Ao programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal e à Universidade Federal de Santa Catarina, pela oportunidade. À CAPES pelo auxílio financeiro.

À Vera Lúcia Araújo de Mello Zapelini, secretária do curso, por sua disposição, eficiência, por estar sempre com um sorriso no rosto e uma solução nas mãos.

Os agradecimentos a minha família são mais que especiais! Pai, Mãe, sem vocês eu nada seria, o apoio de vocês em todas as minhas pequenas loucuras é o meu combustível, a dedicação de vocês, o maior dos exemplos (e por pagar o plano de saúde pra curar todas as minhas “ziquiziras”). Júnior, te ver conquistando tudo o que sempre sonhou me inspira a acordar a cada dia e lutar. Vocês são minha razão para viver!

Ao meu namorado Ricardo, que soube compreender (ou pelo menos tentou) as noites em claro, o mau humor, a ausência, mas acima de tudo compreender a importância desse estudo para mim! Aos meus amigos que estão perdidos na Amazônia (Carol e Julio) que sempre tinham uma palavra de apoio (“Não Afroxê!”), aos que estão por perto por se mostrarem interessados, apesar de não entenderem muitas das palavras do que eu dizia, e ainda àqueles que, em momentos de desesperança ajudavam do jeito que podiam... A amizade é o ingrediente mais importante na receita da vida.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma fazem parte desta realização!

“Nobody said it was easy...”

SUMÁRIO

Agradecimentos.....	I
Sumário	III
Lista de Figuras	VII
Lista de Tabelas.....	XVII
Lista de Abreviaturas	XXI
Resumo.....	XXIII
Abstract	XXV
1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica.....	4
2.1. Descrição Botânica da Espécie.....	4
2.1.1. Importância econômica das Lauraceas.....	6
2.1.2. Importância medicinal das Lauraceas	7
2.2. Estudos sobre a embriogênese somática em <i>Ocotea catharinensis</i> ..	8
2.3. Metabólitos secundários.....	11
2.3.1. Carotenóides.....	11
2.3.2. Compostos Fenólicos	14
2.4. Abordagens biotecnológicas para a produção de metabólitos secundários.....	16
3. Objetivos	19
3.1 Objetivo geral.....	19
3.2 Objetivos específicos.....	19

4. Material e Métodos	20
4.1 Origem e manutenção das culturas embriogênicas	20
4.2. Preparação dos meios de cultura	27
4.3. Crescimento e análises bioquímicas das culturas embriogênicas ..	27
4.3.1. Dissimilação de carbono do meio de cultura durante o crescimento das culturas embriogênicas em diferentes fontes de carbono	27
4.3.2 Análises Bioquímicas.....	28
4.4. Embriogênese secundária.....	32
4.4.1. Desidratação das culturas embriogênicas.....	32
4.4.2. Efeito do tempo de desidratação sobre a embriogênese secundária	33
4.4.3. Efeito de fontes de carbono e formulações salinas de meios de cultura sobre a embriogênese secundária.....	33
4.4.4. Efeito do sorbitol e Fontes de carbono sobre a embriogênese Secundária.....	33
4.4.5. Efeito de baixas temperaturas sobre a embriogênese secundária	34
4.4.6. Efeito de luz e escuro sobre a embriogênese secundária.....	34
4.4.7. Determinação do teor de água das culturas embriogênicas.....	34
4.5 Caracterização histoquímica das culturas embriogênicas	35
4.5.1. Preparação das amostras	35
4.5.2. Histoquímica	35
4.6. Análise Estatística	36

5. Resultados	37
5.1. crescimento e análises bioquímicas das culturas embriogênicas somáticas secundárias	37
5.1.1. Determinação das curvas de dissimilação de carbono das culturas embriogênicas de <i>OCOTEA CATHARINENSIS</i> em diferentes fontes de carbono.....	37
5.1.2 Determinação da concentração de Carotenóides em culturas embriogênicas de <i>OCOTEA CATHARINENSIS</i>	41
5.1.3 Determinação da concentração de Compostos Fenólicos em culturas embriogênicas de <i>OCOTEA CATHARINENSIS</i>	44
5.1.4 Avaliação da atividade antioxidante dos extratos - Inibição do radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) em culturas embriogênicas de <i>OCOTEA CATHARINENSIS</i>	49
5.1.5 Espectroscopia vibracional de infravermelho médio (FT-IR) em culturas embriogênicas de <i>OCOTEA CATHARINENSIS</i>	51
5.1.6 Espectrofotometria de varredura UV-Vis em culturas embriogênicas somáticas secundárias de <i>OCOTEA CATHARINENSIS</i>	60
5.2. embriogênese somática secundária em culturas embriogênicas de <i>Ocotea catharinensis</i>	65
5.2.1. Efeito do tempo de desidratação sobre a embriogênese somática secundária.....	65
5.2.2 Efeito das formulações salinas de meios de cultura e de fontes de carbono, em diferentes concentrações, sobre a embriogênese somática secundária.....	70
5.2.3. Efeito do período de desidratação, sorbitol e fontes de carbono, em meio de cultura WPM, sobre a embriogênese somática secundária	78

5.2.4. Efeito das baixas temperaturas sobre a embriogênese somática secundária	80
5.2.5. Efeito de Luz e Escuro sobre a embriogênese somática secundária	81
5.3 Caracterização histoquímica de embriões somáticos de <i>Ocotea catharinensis</i>	82
5.3.1 Teste histoquímico do Coumassie Brilliant Blue (CBB)	82
5.3.2 Teste histoquímico do Azul de Toluidina (AT-O)	86
5.3.3 Teste histoquímico do PAS	88
6. Discussão	90
6.1. Crescimento e análises bioquímicas de culturas embriogênicas de <i>Ocotea catharinensis</i>	90
6.2 Efeito da desidratação, condições de cultivo e formulações dos meios de cultura, sobre a embriogênese somática secundária de <i>Ocotea catharinensis</i>	101
6.3 Caracterização histoquímica de culturas embriogênicas de <i>Ocotea catharinensis</i>	109
7. Conclusões	113
8. Referências	115

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Árvore de *Ocotea catharinensis* em ambiente natural, no município de Petrolândia, Santa Catarina. **A**) árvore ao centro da imagem. **B**) detalhe do tronco e copa. (Fonte: Acervo pessoal de Robson Carlos Avi).....5

Figura 2: Estágios do desenvolvimento do embrião na embriogênese somática e zigótica (adaptado de Zimmerman, 1993).....9

Figura 3: A: Ciclização do licopeno a α e β - caroteno (adaptado de Mann, 1996). B: Formação das xantofilas, zeaxantina, anteraxantina, violaxantina e luteína a partir do α e β -caroteno (adaptado de Römer *et al.* 2002).....11

Figura 4: Formação de *p*-cumaroil-CoA, utilizado como substrato para os compostos fenólicos, a partir da fenilalanina (rota do ácido chiquímico) e da via do acetil-CoA/malonil-CoA, (adaptado de Vermerris & Nicholson, 2008).....15

Figura 5: Exemplos de estruturas globulares (≤ 2 mm)(A), de estruturas cotiledonares iniciais pequenas (2-3 mm, aproximadamente) (B) e de estruturas cotiledonares mais desenvolvidas (>3 mm)(C) removidas de culturas de células embriogênicas somáticas de *Ocotea catharinensis*. Barra=1cm.....20

Figura 6: Culturas de células embriogênicas de *Ocotea catharinensis* evidenciando as culturas embriogênicas somáticas: A: friável, com agregados celulares, sem qualquer nível de diferenciação a olho nu; B: diferenciada 1, com textura granular e estruturas globulares pequenas; C: diferenciada 2, com estruturas cotiledonares iniciais $<2-3$ mm de diâmetro; D: com embriões somáticos no estágio cotiledonar maduro, estruturas cotiledonares >3 mm de diâmetro. Após 4 semanas de cultivo. Barra= 1 cm..... 22

Figura 7: Exemplos de culturas de células embriogênicas de *Ocotea catharinensis* com embriões somáticos no estágio cotiledonar maduro (>3 mm) (A e B) recém removidas do meio de cultura. Após 4 semanas de cultivo. Barra=1cm..... 23

Figura 8: Culturas de células embriogênicas de *Ocotea catharinensis* tipo friável. A) visão geral da cultura. B) Detalhe da mesma cultura. Após 4 semanas de cultivo. Barra = 5 mm.24

Figura 9: Detalhes de culturas de células embriogênicas de *Ocotea catharinensis* tipo diferenciada 1 mostradas na Figura 4B. As setas indicam estruturas globulares de coloração amarelada (A) e estruturas cotiledonares iniciais esbranquiçadas entre as estruturas globulares amareladas (B) produzidas a partir de embriogênese secundária de uma estrutura oxidada (ponta de seta). Após 4 semanas de cultivo. Barra = 1mm25

Figura 10: Detalhes de culturas de células embriogênicas de *Ocotea catharinensis* tipo A) diferenciada 2 mostradas na Figura 4C. B) Embrião somático cotiledonar maduro. As setas indicam local de início da embriogênese secundária. Após 4 semanas de cultivo. Barra = 1cm 26

Figura 11: Curva de dissimilação de carbono obtidas a partir da perda de massa de culturas de células embriogênicas somáticas secundárias de *Ocotea catharinensis* do tipo diferenciada 2, mantidas em meio de cultura WPM, semi-sólido, suplementado com 121 mM de sorbitol, 2,73 mM de glutamina e 58,4 mM de sacarose, durante 29 dias de cultivo. (n=10).....38

Figura 12: Curva de dissimilação de carbono obtidas a partir da perda de massa de culturas de células embriogênicas somáticas secundárias de *Ocotea catharinensis* do tipo diferenciada 2, mantidas em meio de cultura WPM, semi-sólido, suplementado com 121 mM de sorbitol, 2,73 mM de glutamina e 116.8 mM de glucose, durante 17 dias de cultivo. (n=10)..... 39

Figura 13: Curva de dissimilação de carbono obtidas a partir da perda de massa de culturas de células embriogênicas somáticas secundárias de *Ocotea catharinensis* do tipo diferenciada 2, mantidas em meio de cultura WPM, semi-sólido, suplementado com 121 mM de sorbitol, 2,73 mM de glutamina e 116.8 mM de glucose, durante 17 dias de cultivo. (n=10).....40

Figura 14: Concentração média de carotenóides ($\mu\text{g} \cdot \text{g MS}^{-1} \pm$ desvio padrão) nos extratos metanol/clorofórmio, obtidos a partir de culturas de células embriogênicas de *Ocotea catharinensis* dos tipos: friável, diferenciada 1, diferenciada 2 e embriões somáticos no estágio cotiledonar maduro, cultivadas em meio de cultura WPM suplementado com 58,4 mM de sacarose, 121 mM de sorbitol, 2,73 mM de glutamina, após 4 semanas de cultivo. As letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos segundo o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).
.....41

Figura 15: Concentração média de carotenóides ($\mu\text{g} \cdot \text{g MS}^{-1} \pm$ desvio padrão) nos extratos metanol/clorofórmio obtidos a partir de culturas de células embriogênicas de *Ocotea catharinensis* do tipo diferenciada 2, crescidas em meio de cultura WPM suplementado com 58,4 mM de sacarose, 121 mM de sorbitol, 2,73 mM de glutamina, ao longo das semanas de cultivo. As letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos segundo o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).
.....42

Figura 16: Concentração média de carotenóides ($\mu\text{g} \cdot \text{g MS}^{-1} \pm$ desvio padrão) nos extratos metanol/clorofórmio obtidos a partir de culturas de células embriogênicas de *Ocotea catharinensis* do tipo diferenciada 2, cultivadas em meio de cultura WPM suplementado com 58,4 mM, 87,6 mM ou 116,8 mM de sacarose, 121 mM de sorbitol, na ausência ou na presença de 2,73 mM de glutamina, após 4 semanas de cultivo. As letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos segundo o teste de Tukey ($p \leq 0,05$)..... 43

Figura 17: Concentração média de carotenóides ($\mu\text{g} \cdot \text{g MS}^{-1} \pm$ desvio padrão) nos extratos metanol/clorofórmio obtidos a partir de culturas de células embriogênicas de *Ocotea catharinensis* do tipo diferenciada 2, crescidas em meio de cultura WPM suplementado com 58,4 mM, 87,6 mM ou 116,8 mM de glicose, 121 mM de sorbitol, na ausência ou na presença de 2,73 mM de glutamina, após 4 semanas de cultivo. As letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos segundo o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).....44

Figura 18. Concentração média de compostos fenólicos totais ($\mu\text{g} \cdot \text{g MS}^{-1} \pm$ desvio padrão) nos extratos metanol/clorofórmio obtidos a partir de culturas de células embriogênicas de *Ocotea catharinensis* dos tipos: friável, diferenciada 1, diferenciada 2 e de embriões somáticos no estágio cotiledonar maduro, cultivadas em meio de cultura WPM suplementado com 58,4 mM de sacarose, 121 mM de sorbitol, 2,73 mM de glutamina, após 4 semanas de cultivo. As letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos segundo o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).....45

Figura 19: Concentração média de compostos fenólicos totais ($\mu\text{g} \cdot \text{g MS}^{-1} \pm$ desvio padrão) nos extratos metanol/clorofórmio obtidos a partir de culturas de células embriogênicas de *Ocotea catharinensis* do tipo diferenciada 2, crescidas em meio de cultura WPM suplementado com 58,4 mM de sacarose, 121 mM de sorbitol, 2,73 mM de glutamina, ao longo do período de cultivo. As letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos segundo o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).46

Figura 20: Concentração média de compostos fenólicos totais ($\mu\text{g} \cdot \text{g MS}^{-1}$ seca \pm desvio padrão) nos extratos metanol/clorofórmio obtidos a partir de culturas de células embriogênicas de *Ocotea catharinensis* do tipo diferenciada 2, cultivadas em meio de cultura WPM suplementado com 58,4 mM, 87,6 mM ou 116,8 mM de sacarose, 121 mM de sorbitol, na ausência ou na 2,73 mM de glutamina, após 4 semanas de cultivo. As letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos segundo o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).....47

Figura 21: Concentração média de compostos fenólicos totais ($\mu\text{g} \cdot \text{g MS}^{-1} \pm$ desvio padrão) nos extratos metanol/clorofórmio obtidos a partir de culturas de células embriogênicas de *Ocotea catharinensis* do tipo diferenciada 2, cultivados em meio de cultura WPM suplementado com 58,4 mM, 87,6 mM ou 116,8 mM de glucose, 121 mM de sorbitol, na ausência ou na 2,73 mM de glutamina, após 4 semanas de cultivo. As letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos segundo o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).....48

Figura 22: Concentração média de compostos fenólicos totais ($\mu\text{g} \cdot \text{g MS}^{-1} \pm$ desvio padrão) nos extratos metanol/clorofórmio obtidos a partir de culturas de células embriogênicas de *Ocotea catharinensis* do tipo diferenciada 2, cultivadas em meio de cultura WPM suplementado com 58,4 mM de sacarose, 121 mM de sorbitol ou manitol, 2,73 mM de glutamina ou prolina, após 4 semanas de cultivo. As letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos segundo o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).49

Figura 23: Espectros de FT-IR (3000 – 500 ondas. cm^{-1}) dos extratos metanol: clorofórmio de culturas de células embriogênicas de *Ocotea catharinensis* do tipo diferenciada 2, crescidas em meio de cultura WPM suplementado com sacarose como fonte de carbono nas concentrações 58,4 mM, 87,6 mM e 116 mM, na presença ou ausência de glutamina como fonte de nitrogênio. As cores dos espectros se referem aos tratamentos: **58,4 mM**; **58,4 mM + glutamina**; **87,6 mM**; **87,6 mM + glutamina**; **116,8 mM**; **116, 8 mM + glutamina**.....53

Figura 24: Espectros de FT-IR (3000 – 500 ondas. cm^{-1}) dos extratos metanol:clorofórmio de culturas de células embriogênicas de *Ocotea catharinensis* do tipo diferenciada 2, crescidas em meio de cultura WPM suplementado com glucose como fonte de carbono nas concentrações 58,4 mM, 87,6 mM e 116 mM na presença ou ausência de glutamina como fonte de nitrogênio. As cores dos espectros se referem aos tratamentos: **58,4 mM**; **58,4 mM + glutamina**; **87,6 mM**; **87,6 mM + glutamina**; **116,8 mM**; **116, 8 mM + glutamina**.....55

Figura 25: Espectros de FT-IR (3000 – 500 ondas. cm^{-1}) dos extratos metanol:clorofórmio de culturas de células embriogênicas de *Ocotea catharinensis* dos tipos friável, diferenciado 1, diferenciado 2 e embriões somáticos no estágio cotiledonar, cultivados em meio de cultura WPM suplementado com sacarose 58,4 mM, após 4 semanas de cultivo. As cores dos espectros se referem as culturas de células embriogênicas: **Friável**; **Diferenciado 1**; **Diferenciado 2**; **Embrião somático cotiledonar**57

Figura 26: Espectros de FT-IR (3000 – 500 ondas.cm⁻¹) dos extratos metanol:clorofórmio de culturas de células embriogênicas de *Ocotea catharinensis* do tipo diferenciada 2, cultivadas em meio de cultura WPM suplementado com sacarose 58,4 mM, após 2, 3, 4 ou 6 semanas de cultivo. As cores dos espectros referem-se aos tratamentos: **2 semanas**; **3 semanas**; **4 semanas**; **6 semanas**.....59

Figura 27: Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para os dados obtidos na espectrofotometria de varredura UV-Vis dos extratos obtidos a partir de culturas de células embriogênicas de *Ocotea catharinensis* dos tipos friável (FR), diferenciada 1 (DF1), diferenciada 2 (DF2) e embriões somáticos no estágio cotiledonar (ESc), crescidas em meio de cultura WPM suplementado com 58,4 mM de sacarose, 121 mM de sorbitol, 2,73 mM de glutamina, após 4 semanas de cultivo.....61

Figura 28: Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para os dados obtidos na espectrofotometria de varredura UV-Vis dos extratos obtidos a partir de culturas de células embriogênicas de *Ocotea catharinensis* do tipo diferenciada 2, crescidas em meio de cultura WPM suplementado com 58,4 mM de sacarose, 121 mM de sorbitol, 2,73 mM de glutamina, ao longo das semanas de cultivo: 2 semanas (2s), 3 semanas (3s), 4 semanas (4s), 6 semanas (6s)62

Figura 29: Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para os dados obtidos na espectrofotometria de varredura UV-Vis dos extratos obtidos a partir de culturas de células embriogênicas de *Ocotea catharinensis* do tipo diferenciada 2, cultivadas em meio de cultura WPM suplementado com sacarose, nas concentrações 58,4 mM, 87,6 mM e 116,8 mM, na presença ou ausência de glutamina (2,73 mM), após 4 semanas de cultivo..... 63

Figura 30: Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para os dados obtidos na espectrofotometria de varredura UV-Vis dos extrato obtidos a partir de culturas de células embriogênicas de *Ocotea catharinensis* do tipo diferenciada 2, cultivadas em meio WPM suplementado com glucose, nas concentrações 58,4 mM, 87,6 mM e 116,8 mM, na presença ou ausência de glutamina (2,73 mM), após 4 semanas de cultivo.....64

Figura 31: Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para os dados obtidos na espectrofotometria de varredura UV-Vis dos extratos obtidos a partir de culturas de células embriogênicas de *Ocotea catharinensis* do tipo diferenciada 2, cultivadas em meio de cultura WPM suplementado com sacarose 58,4 mM, 121 mM sorbitol ou 121 mM manitol, na ausência ou na presença de 2,73 mM de glutamina ou prolina, após 4 semanas de cultivo.....65

Figura 32: Embriogênese somática secundária em *Ocotea catharinensis* a partir de embriões somáticos oxidados (A, D, F, G), encapsulados em alginato de sódio (C,E) e desidratados (B). As setas indicam embriões somáticos no estágio cotiledonar inicial, ou mais desenvolvidos, produzidos a partir de embriões somáticos oxidados (observar a coloração escura), encapsulados ou desidratados.....66

Figura 33: Porcentagem de embriogênese secundária em culturas de células embriogênicas de *Ocotea catharinensis* submetidas à desidratação por 1, 2, 3 e 4 semanas, após 12 semanas de cultivo em meio de cultura padrão WPM suplementado com sacarose 58,4 mM, 121 mM de sorbitol, 2,73 mM de glutamina, 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativo e 2 g.L⁻¹ de Phytigel. Médias de vinte repetições seguidas por letras diferentes, em cada período de avaliação, diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).....67

Figura 34: Valores médios de teor de água (mg H₂O . mg MS⁻¹) ± desvio padrão em culturas de células embriogênicas de *Ocotea catharinensis* submetidas à desidratação por 1, 2, 3, 4 e 5 semanas e inoculadas em meio de cultura WPM suplementado com sacarose 58,4 mM, 121 mM de sorbitol, 2,73 mM de glutamina, 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativo e 2 g.L⁻¹ de Phytigel. Cada tratamento foi realizado com vinte repetições. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os períodos de desidratação de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).....69

Figura 35: Porcentagem de embriogênese somática secundária de culturas de células embriogênicas de *Ocotea catharinensis* em meio de cultura WPM suplementado com 2,73 mM de glutamina, 121 mM de sorbitol, 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativado, 2 g.L⁻¹ de Phytigel e com diferentes concentrações de sacarose (58,4 mM, 87,6 mM, 116,8 mM). Cada tratamento foi realizado com vinte repetições. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre as concentrações de sacarose, em cada período de avaliação, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$)...71

Figura 36: Porcentagem de embriogênese somática secundária de culturas de células embriogênicas de *Ocotea catharinensis* em meio de cultura WPM suplementado com 2,73 mM de glutamina, 121 mM de sorbitol, 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativado, 2 g.L⁻¹ de Phytigel e com diferentes concentrações de glucose (58,4 mM, 87,6 mM, 116,8 mM). Cada tratamento foi realizado com quinze repetições. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre as concentrações de glucose, em cada período de avaliação, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$)...72

Figura 37: Porcentagem de embriogênese somática secundária de culturas de células embriogênicas de *Ocotea catharinensis* em meio de cultura WPM suplementado com 2,73 mM de glutamina, 121 mM de sorbitol, 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativado, 2 g.L⁻¹ de Phytigel e com diferentes concentrações de frutose (58,4 mM, 87,6 mM, 116,8 mM). Cada tratamento foi realizado com quinze repetições. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre as concentrações de frutose, em cada período de avaliação, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$)...73

Figura 38: Porcentagem de embriogênese secundária de culturas de células embriogênicas de *Ocotea catharinensis* em meio de cultura MS suplementado com 2,73 mM de glutamina, 121 mM de sorbitol, 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativado, 2 g.L⁻¹ de Phytigel e com diferentes concentrações de sacarose (58,4 mM, 87,6 mM, 116,8 mM). Cada tratamento foi realizado com quinze repetições. Letras semelhantes não indicam diferenças estatísticas entre as concentrações de sacarose, em cada período de avaliação, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).....75

Figura 39: Porcentagem de embriogênese secundária de culturas de células embriogênicas de *Ocotea catharinensis* em meio de cultura MS suplementado com 2,73 mM de glutamina, 121 mM de sorbitol, 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativado, 2 g.L⁻¹ de Phytigel e com diferentes concentrações de Glucose (58,4 mM, 87,6 mM, 116,8 mM). Cada tratamento foi realizado com quinze repetições. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre as concentrações de sacarose, em cada período de avaliação, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).....76

Figura 40: Porcentagem de embriogênese secundária de culturas de células embriogênicas de *Ocotea catharinensis* em meio de cultura MS suplementado com 2,73 mM de glutamina, 121 mM de sorbitol, 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativado, 2 g.L⁻¹ de Phytigel e com diferentes concentrações de frutose (58,4 mM, 87,6 mM, 116,8 mM). Cada tratamento foi realizado com quinze repetições. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre as concentrações de sacarose, em cada período de avaliação, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).....77

Figura 41: Secções histológicas de estruturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* crescidas em meio WPM suplementado com 58,4 mM de sacarose, 121 mM de sorbitol, 2,73 mM de glutamina, após 4 semanas de cultivo, submetidos ao teste histoquímico com CBB. A, B, C: Embriões somáticos secundários produzidos a partir de embriões desidratados; D, E, F: Estruturas globulares de culturas de células embriogênicas do tipo Diferenciado1; G, H, I: Estruturas cotiledonares iniciais de culturas de células embriogênicas do tipo Diferenciado 2; J, K, L: Embrião somático no estágio cotiledonar maduro. Grande núcleo com nucléolos evidente (nu), corpos protéicos (setas), e a protoderme (*)85

Figura 42: Secções histológicas de estruturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* crescidas em meio WPM suplementado com 58,4 mM de sacarose, 121 mM de sorbitol, 2,73 mM de glutamina, após 4 semanas de cultivo, submetidos ao teste histoquímico com AT-O. A, B, C: Embriões somáticos secundários produzidos a partir de embriões desidratados. D, E, F: Estruturas globulares de culturas de células embriogênicas do tipo Diferenciado1. G, H, I: Estruturas cotiledonares iniciais de culturas de células embriogênicas do tipo Diferenciado 2. J, K, L: Embrião somático no estágio cotiledonar maduro. Paredes celulares com leve reação metacromática (setas) em estruturas globulares/cotiledonares de culturas de células embriogênicas dos tipos diferenciado 1 e diferenciado 2 (A, B, C, D, E, F). Grânulos ortocromáticos (pontas de seta), destacando a protoderme (*) e células que sofreram degradação no processo de desidratação ou que acumulam algum tipo de composto (x).....87

Figura 43: Secções histológicas de estruturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* crescidas em meio WPM suplementado com 58,4 mM de sacarose, 121 mM de sorbitol, 2,73 mM de glutamina, após 4 semanas de cultivo, submetidos ao teste histoquímico com PAS. A, B, C: Embriões somáticos secundários produzidos a partir de embriões desidratados; D, E, F: Estruturas globulares de culturas de células embriogênicas do tipo Diferenciado1; G, H, I: Estruturas cotiledonares iniciais de culturas de células embriogênicas do tipo Diferenciado 2; J, K, L: Embrião somático no estágio cotiledonar maduro. Grânulos de amido corados positivamente (setas), destaque para a protoderme em embriões diferenciado 2 (*)89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Variações na composição dos meios de cultura utilizados para o cultivo de culturas de células embriogênicas de *Ocotea catharinensis* e análises bioquímicas efetuadas. Em todos os casos foi utilizado o meio de cultura WPM suplementado com 0,2% de Phytigel e 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativo..... 29

Tabela 2: Valores de massa inicial, massa final e dissimilação total (massa inicial – massa final) das culturas de células embriogênicas de *Ocotea catharinensis* do tipo diferenciada 2, em meio de cultura WPM semi-sólido suplementado com 121 mM de sorbitol, 2,73 mM de glutamina, 58,4 mM de sacarose durante 29 dias ou 116,8 mM de glucose durante 17 dias.....40

Tabela 3: Inibição do radical DPPH dos extratos MeOH 80% das culturas de células embriogênicas de *Ocotea catharinensis* ao longo do tempo de cultivo (2, 3, 4 e 6 semanas).....50

Tabela 4: Inibição do radical DPPH pelo extrato MeOH 80% de culturas de células embriogênicas *Ocotea catharinensis* dos tipos friável, diferenciada 1, diferenciada 2 e de embriões somáticos no estágio cotiledonar maduro, após 4 semanas de cultivo.....50

Tabela 5: Sinais espectrais de FT-IR (onda.cm⁻¹) das amostras de embriões somáticos de *Ocotea catharinensis*..... 52

Tabela 6: Valores de número de ondas onde ocorreu a formação de picos de absorbância na espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) (3000 – 500 ondas.cm⁻¹) dos extratos metanol:clorofórmio de culturas de células embriogênicas cultivadas em meio de cultura WPM suplementado com sacarose como fonte de carbono nas concentrações 58,4 mM, 87,6 mM e 116 mM na presença ou ausência de glutamina como fonte de nitrogênio.....54

Tabela 7: Valores de número de ondas onde ocorreu a formação de picos de absorvância na espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) (3000 – 500 ondas.cm⁻¹) dos extratos metanol:clorofórmio de culturas de células embriogênicas de *Ocotea catharinensis* do tipo diferenciada 2, crescidas em meio de cultura WPM suplementado com glucose como fonte de carbono nas concentrações 58,4 mM, 87,6 mM e 116 mM na presença ou ausência de glutamina como fonte de nitrogênio.....56

Tabela 8: Valores de número de ondas onde ocorreu a formação de picos de absorvância na espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) (3000 – 500 ondas.cm⁻¹) dos extratos metanol:clorofórmio de culturas de células embriogênicas de *Ocotea catharinensis* dos tipos friável, diferenciada 1, diferenciada 2 e embriões somáticos no estágio cotiledonar maduros, cultivados em meio de cultura WPM suplementado sacarose 58,4 mM, após 4 semanas de cultivo.....58

Tabela 9: Valores de número de ondas onde ocorreu a formação de picos de absorvância na espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) (3000 – 500 ondas.cm⁻¹) dos extratos metanol:clorofórmio de culturas de células embriogênicas de *Ocotea catharinensis* do tipo diferenciada 2, cultivadas em meio de cultura WPM suplementado com sacarose 58,4 mM, após 2, 3, 4 ou 6 semanas de cultivo.....60

Tabela 10: Teor de água (% da massa fresca) ± desvio padrão de culturas de células embriogênicas de *Ocotea catharinensis* submetidos à desidratação por 1, 2, 3, 4 e 5 semanas.....69

Tabela 11: Comparação do efeito de diferentes fontes de carbono sobre a embriogênese somática secundária (%) de culturas de células embriogênicas de *Ocotea catharinensis* em meio de cultura WPM, suplementado com 2,73 mM de glutamina, 121 mM de sorbitol, 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativado, 2 g.L⁻¹ de Phytigel, em cada uma das concentrações estudadas (58,4 mM, 87,6 mM, 116,8 mM), nos diferentes períodos de avaliação.....74

Tabela 12: Efeito de fontes de carbono sobre a embriogênese secundária (%) de culturas de células embriogênicas de *Ocotea catharinensis* em meio de cultura MS, suplementado com 2,73 mM de glutamina, 121 mM de sorbitol, 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativado, 2 g.L⁻¹ de Phytigel, em cada uma das concentrações estudadas (58,4 mM, 87,6 mM, 116,8 mM), nos diferentes períodos de avaliação.....78

Tabela 13: Embriogênese somática secundária (%), durante 16 semanas de cultivo, a partir de culturas de células embriogênicas de *Ocotea catharinensis* desidratadas por 2 e 4 semanas e cultivadas em meio de cultura WPM suplementado com 2,73 mM de glutamina, 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativado, 2 g.L⁻¹ de Phytigel e com 58,4 mM de sacarose ou 116,8 mM de glucose, na ausência ou presença de 121 mM de sorbitol.....79

Tabela 14: Efeito da baixa temperatura sobre a embriogênese somática secundária (%) de culturas de células embriogênicas de *Ocotea catharinensis* desidratadas por duas semanas, mantidas por duas semanas a 5°C ou a 25°C e cultivadas em meio de cultura WPM suplementado com 2,73 mM de glutamina, 121 mM de sorbitol, 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativado, 2 g.L⁻¹ de Phytigel e 58,4 mM de sacarose.....81

Tabela 15: Efeito de luz e escuro e diferentes fontes de carbono sobre as taxas de embriogênese somática secundária (%) de culturas de células embriogênicas de *Ocotea catharinensis* desidratadas por duas semanas e cultivadas em meio de cultura WPM suplementado com 2,73 mM de glutamina, 121 mM de sorbitol, 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativado, 2 g.L⁻¹ de Phytigel e 58,4 mM de sacarose ou 116,8 mM de glucose.....82

LISTA DE ABREVIATURAS

AT-O	- Azul de Toluídina
BHT	- Butil-hidroxi-tolueno
CBB	- Azul brilhante de Coomassie
DAP	- Diâmetro a altura do peito
DPPH	- 1,1-difenil-2-picrilhidrazil
FT-IR	- Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
HCl	- Ácido clorídrico
MeOH 80%	- Metanol 80%
MS	- Meio de cultura Murashige & Skoog
mg H ₂ O . mg MS ⁻¹	Miligrama de água por miligrama de massa seca
NaOH	- Hidróxido de Sódio
PAS	- Ácido periódico de Schiff
PCA:	- Análise de componentes principais
pH	- Potencial hidrogeniônico
UV-Vis	- Ultravioleta/visível (referente à Espectrofotometria de absorção molecular no ultravioleta/visível)
WPM	- Meio de cultura de Lloyd & McCown. Wood Plant Medium
µg . g MS ⁻¹	Micrograma por grama de massa seca

RESUMO

Ocotea catharinensis Mez. (Lauraceae) é uma árvore nativa da Floresta Atlântica, localizada no sul do Brasil, que se encontra atualmente na lista de espécies ameaçadas de extinção, devido à importância econômica da madeira, que é utilizada na fabricação de móveis e casas. Um sistema de embriogênese somática de alta frequência foi desenvolvido para esta espécie, a fim de solucionar o problema da produção esporádica de sementes, cuja viabilidade é reduzida drasticamente após poucos meses de armazenamento. Os objetivos deste trabalho foram caracterizar as culturas de células embriogênicas dos tipos friável, diferenciada 1 e diferenciada 2 e de embriões somáticos no estágio cotiledonar de *Ocotea catharinensis* quanto ao crescimento, perfil metabólico, metabólitos secundários, potencial de embriogênese secundária e histoquímica. A análise de dissimilação de carbono apresentou um padrão linear para as culturas de células embriogênicas do tipo diferenciada 2 crescidas em meio de cultura com sacarose, enquanto com glucose o padrão foi variável. A espectroscopia por FT-IR deste tipo de cultura permitiu comparar o perfil metabólico primário e secundário dos extratos, evidenciando diferenças qualitativas em nível molecular. A análise de componentes principais (PCA) de varreduras UV-Vis, evidenciou grupos característicos em função das concentrações de compostos fenólicos. Estes resultados reforçaram os obtidos nas dosagens de carotenóides e compostos fenólicos. As culturas de células embriogênicas do tipo diferenciada 2 apresentaram as maiores concentrações de carotenóides, enquanto que os embriões somáticos, no estágio cotiledonar, apresentaram a maior concentração de compostos fenólicos. Culturas de células embriogênicas do tipo diferenciada 2, crescidas por 3 e 4 semanas apresentaram maior concentração de carotenóides mas as concentrações de compostos fenólicos se mantiveram constantes nas 6 semanas de cultivo. As culturas de células crescidas em meio de cultura WPM com 58,4 mM de sacarose e glutamina apresentaram a maior concentração de carotenóides, e juntamente com 116,8 mM de glucose e glutamina, a maior concentração de compostos fenólicos. Houve forte correlação entre a concentração de compostos fenólicos e atividade antioxidante ao longo das semanas de cultivo. A capacidade antioxidante dos diferentes tipos de culturas de células não apresentou correlação com a concentração de compostos fenólicos. Estruturas de culturas de células embriogênicas do tipo 2 desidratadas por uma semana apresentaram 98,35% de

embriogênese secundária e por duas semanas apresentaram 88,66%. A embriogênese secundária foi estimulada em meio de cultura WPM, com 58,4 mM de sacarose e 116,8 mM de glicose, ambos com sorbitol e glutamina, apresentando as maiores porcentagens de embriogênese secundária (88,66% e 83,97%, respectivamente). A adição de frutose no meio de cultura inibiu a embriogênese secundária. O meio de cultura MS não apresentou resultados satisfatórios. Estruturas de culturas de células embriogênicas desidratadas por 2 semanas a 25°C, seguido de 2 semanas a 5°C, apresentaram maior porcentagem de embriogênese secundária, quando comparadas com as desidratadas por 4 semanas a 25°C. A ausência de luz reduziu significativamente a embriogênese secundária. A avaliação do crescimento das culturas de células embriogênicas e a análise de metabólitos primários e secundários, através de espectroscopia de UV-vis e FT-IR, fornecem suporte para a otimização das culturas de células embriogênicas, identificação e seleção de diferentes tipos de culturas de células com potencial para a produção de compostos de interesse.

ABSTRACT

Ocotea catharinensis Mez. (Lauraceae) is a native tree from the Atlantic rainforest located in southern Brazil, and it is currently on the list of species threatened with extinction due to its economic importance, its wood is used for furniture and houses. A high-frequency somatic embryogenesis system has been developed for this species in order to solve the problem of sporadic seed production, whose viability is drastically reduced over a few months of storage. The aims of this study was to characterize the different types of embryogenic cell cultures (friable, differentiated 1, differentiated 2) and mature cotyledonary somatic embryos of *Ocotea catharinensis* concerning its *in vitro* growth, metabolic profile, secondary metabolites, secondary embryogenesis potential and histochemistry. The FT-IR spectroscopy and UV-vis spectrophotometry allowed the comparison of the primary and secondary metabolism profiles, showing qualitative differences at molecular level. The analysis of this kind of culture allowed compares the primary and secondary metabolic profile of extracts, showing qualitative differences at the molecular level. FT-IR spectroscopy and UV-Vis spectrophotometry, showed the profile of phenolic compounds and carotenoids and the antioxidant activity from these extracts. The effect of dehydration period, low temperature, presence and absence of light source, sugar alcohols and carbon sources on secondary somatic embryogenesis. The carbon dissimilation analysis showed a linear pattern to somatic embryos growth in the presence of sucrose, while with glucose, the pattern is variable. FTIR spectroscopy allowed the comparison between primary and secondary metabolic profile extracts, and showed qualitative differences at molecular level. The principal component analysis (PCA) of UV-Vis screen showed characteristic groups, which were grouped due to the concentrations of phenolic compounds. These results strengthened those obtained in the measurement of carotenoids and phenolic compounds. The embryogenic cell cultures type differentiated 2 had the highest concentrations of carotenoids, while somatic embryos at cotyledonary stage the highest concentration of phenolic compounds. Embryogenic cell cultures type differentiated 2, with 3 and 4 weeks had higher carotenoid concentration, whilst, phenolic compounds concentrations remained constant during the six weeks of culture. The cell cultures grown on WPM medium containing 58,4 mM of sucrose and glutamine had the highest concentration of carotenoids, and along with 116,8 mM glucose and glutamine had the highest concentration of phenolic compounds.

There was a strong correlation between the concentration of phenolic compounds and antioxidant activity over the culture periods. The concentration of phenolic compounds was not correlated with the antioxidant capacity of the different types of embryogenic cell cultures. Dehydrated embryogenic structures produced by the cell cultures type differentiated 2 for one week showed 98.35% of secondary embryogenesis and two weeks showed 88,66%. WPM media supplemented with 58,4 mM of sucrose and 116,8 mM of glucose, both with sorbitol and glutamina, showed the highest percentage of secondary embryogenesis (88,66% and 83,97% respectively). The addition of fructose in the culture medium inhibited secondary embryogenesis. MS medium has not shown satisfactory results on secondary embryogenesis. Embryogenic structures dehydrated for 2 weeks at 25°C, followed by 2 weeks at 5°C, showed the highest percentage of secondary embryogenesis when compared to those dehydrated for 4 weeks at 25°C. The absence of light significantly decreased secondary embryogenesis. The evaluation of growth of somatic embryos, primary and secondary metabolites analysis through the UV-vis and FT-IR spectroscopy, provide the background for further studies on embryogenic cell cultures optimization, identification and selection of cultures with potential to produce compounds of economic interest.

1. INTRODUÇÃO

No Brasil encontra-se a maior diversidade vegetal do mundo, apresentando cerca de 55.000 espécies catalogadas, sendo este número pouco relacionado ao total estimado de 350.000 e 550.000 (Soerjato, 1996). Onde cerca de 7% das espécies são endêmicas do nosso país. Grande parte dessas espécies encontra-se nas florestas ombrófilas densas, representadas pela Floresta Amazônica e Floresta Atlântica (Diniz & Ferreira, 2000).

Tabarelli e Cavalcanti (2004) descreveram as florestas Amazônica e Atlântica como sendo mosaicos vegetacionais, que guardam entre si certas similaridade e grandes particularidades. A floresta Amazônica apresenta grande riqueza de árvores, principalmente famílias que possuem nas florestas neotropicais de terras baixas, seus centros principais de diversidade, como Leguminosae, Chrysobalanaceae, Moraceae, Sapotaceae e Euphorbiaceae (Gentry, 1882; Gentry, 1990). Em contraste com a floresta Amazônica, a floresta Atlântica apresenta riqueza elevada de pequenas árvores e arbustos pertencentes às Myrtaceae, Rubiaceae, Melastomataceae e Myrsinaceae (Mori *et al.*, 1983; Tabarelli & Mantovani, 1999), famílias com maior riqueza de espécies nas florestas neotropicais montanas (Gentry, 1982, 1988, 1990). Embora constituam dois corpos vegetacionais geograficamente separados, evidências sugerem o intercâmbio de espécies lenhosas entre as florestas Amazônica e Atlântica no decorrer do tempo geológico (Prance, 1979, 1982).

A Mata Atlântica é conhecida por ser o bioma mais rico do planeta, apresentando um conjunto de ecossistemas interligados, numa variedade de formações que compreendem diferentes tipos de florestas, manguezais, restingas, brejos interioranos, campos de altitude e ilhas costeiras, abrigando também ecossistemas aquáticos, sendo que 95% de sua extensão está em território brasileiro e o restante na Argentina e Paraguai (Conservation International *et al.*, 2000). Sua área original cobria 17 estados brasileiros, do Piauí ao Rio Grande do Sul, cerca de 1.315.000 Km. A Mata Atlântica abriga tanto comunidades tradicionais, como algumas das maiores cidades, como São Paulo, Rio de Janeiro, Recife, Curitiba e Florianópolis, sendo que, cerca de 60% da população brasileira vivem e dependem dos recursos naturais deste bioma. Neste contexto, o impacto da exploração humana é responsável pela

devastação de 93% da cobertura florestal original da Mata Atlântica (SOS Mata Atlântica, 2010).

A canela preta (*Ocotea catharinensis* Mez.) é uma espécie nativa da Floresta Atlântica que vem sofrendo com a fragmentação das florestas. Segundo o Ministério do Meio Ambiente (2008) esta espécie consta na lista oficial das espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção. A importância econômica desta espécie está relacionada com a produção de madeira (serrada e roliça), produção de óleos essenciais e de lignanas e neolignanas, que são compostos biologicamente ativos com efeito citotóxico em células tumorais (Lordello, 1996). A necessidade de desenvolvimento de métodos não convencionais para a propagação e conservação desta espécie é decorrente do fato das sementes serem produzidas esporadicamente e possuem viabilidade reduzida (três meses). Além disso, apesar das sementes não apresentam dormência e a emergência inicia-se entre 30 e 120 dias após a sementeira, obtendo-se uma taxa de germinação baixa, que varia entre 40% e 70% (Carvalho, 1994; Lorenzi, 1998).

Um dos aspectos mais críticos na produção de plantas medicinais, principalmente de árvores, para a utilização terapêutica é, sem dúvida, a quantidade e a qualidade da matéria-prima vegetal. Em muitos casos há a ausência de estudos fitoquímicos e farmacológicos aprofundados, devido à dificuldade de obtenção de material vegetal, devido à raridade e baixa frequência de ocorrência da espécie nas florestas, localização de difícil acesso e ocorrência em ecossistemas ameaçados de extinção (Viana *et al.*, 1999). Além disso, vários fatores climáticos afetam diretamente a qualidade, a eficácia e a segurança do produto final. Para evitar tais problemas, e, sobretudo, evitar o extrativismo descontrolado, as indústrias vêm atuando no sentido de aumentar a quantidade e melhorar a qualidade dessa matéria-prima, através do cultivo de plantas medicinais, em larga escala, em diferentes modelos de produção. Além de poder eliminar variações oriundas de fatores como o clima, nutrientes e luminosidade, a produção em larga escala de plantas permite selecionar espécies com maior concentração de metabólitos de interesse, controlar pragas, ou ainda o que é fundamental, evitar a contaminação por metais pesados, inseticidas e outros fatores que podem influenciar a eficácia e segurança clínica dos medicamentos fitoterápicos (Siani, 2003). Neste contexto a biotecnologia vegetal também pode oferecer ferramentas, não apenas para o desenvolvimento de métodos eficientes para a propagação e conservação de germoplasma das espécies de árvores de importância

medicinal, como a *Ocotea catharinensis*, como também para viabilizar a produção dos metabólitos secundários de interesse, através do cultivo *in vitro* de células, tecidos e órgãos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. DESCRIÇÃO BOTÂNICA DA ESPÉCIE

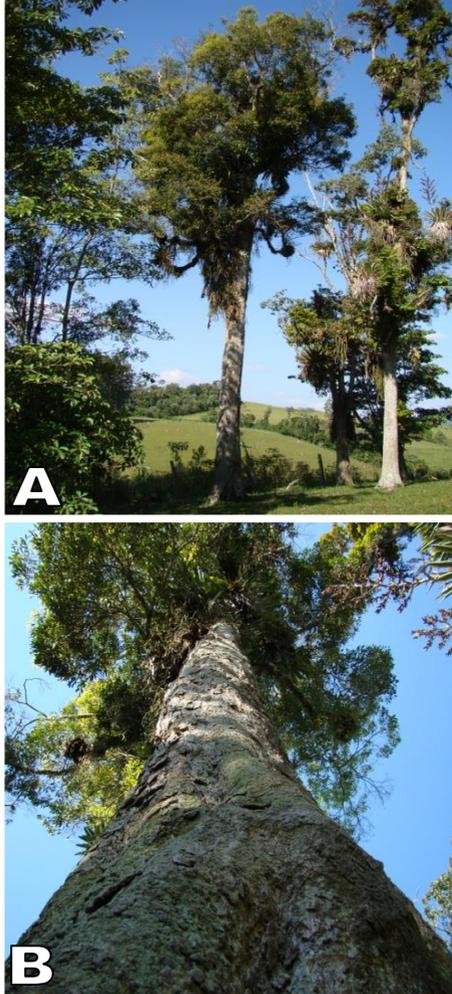
As Lauraceas se destacam das outras famílias por possuir várias espécies de grande valor econômico, como o abacate (*Persea americana* Mill.), canela-sassafrás (*Sassafras officinallis* e *Ocotea odorifera*), louro (*Laurus nobilis* L.), canforeira (*Cinnamomum camphora* (L.) Nees & Eberm), canela-de-cheiro ou canela-do-ceilão (*Cinnamomum zeylanicum* Blume). As Lauraceas estão distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais, sendo bem representadas na América, Ásia tropical, Austrália e Madagascar e sendo pouco expressiva na África. Esta família apresenta cerca de 2500 espécies que estão agrupadas em 50 gêneros (Rohwer, 1993), sendo que no Brasil ocorrem 22 gêneros, localizados principalmente na Floresta Ombrófila Densa e também nas restingas e cerrado (Barroso, 2002).

Dentre os muitos gêneros desta família, o gênero *Ocotea* Aubl. devido ao grande número de espécies utilizados para diferentes fins, compreende 350 espécies distribuídas na América tropical e subtropical, do México à Argentina, também ocorrendo em Madagascar, África e Ilhas Canárias (Rohwer, 1993), sendo considerado o maior gênero da família Lauraceae. Estima-se que no Brasil ocorram de 120 a 160 espécies (Baitello, 2001), sendo constituído por árvores e arbustos, que podem ser monóicos, dióicos ou ginodióicos. Apresenta folhas alternas, raramente subopostas ou verticiladas, sem papilas na epiderme abaxial e inflorescência em panícula, tirso, tirsóide ou botrióide. As flores podem ser uni ou bissexuais, com hipanto achatado ou tubular, não comprimidos sob as tépalas, que são 6 iguais, sendo raramente desiguais. Os frutos são baciformes, sobre ou parcialmente envolvidos pela cúpula, em geral com margens simples e tépalas simples (Quinet, 2005).

Ocotea catharinensis, popularmente conhecida como “canela-preta”, “canela-broto” ou “canela-bicho”, é perenifólia, com altura variável de 25 - 30 m e um DAP (diâmetro a altura do peito) entre 60 - 80 cm, podendo atingir, excepcionalmente, 45 m e um DAP de 150 cm (Figura 1). Possui o tronco geralmente tortuoso, com quinias ou reentrâncias; copa grande, espalhada e bastante densa; folhas lanceoladas, coriáceas, com domáceas em forma de escavações nas axilas das nervuras inferiores e de pecíolo curto; flores hermafroditas, pequenas e reunidas em racemos; fruto em forma de baga elipsóide, com

25 mm de comprimento por 15 mm de largura (Carvalho, 1994; Rizzini & Mors, 1976).

Figura 1: Árvore de *Ocotea catharinensis* em ambiente natural, no município de Petrolândia, Santa Catarina. **A**) árvore ao centro da imagem. **B**) detalhe do tronco e copa. (Fonte: Acervo pessoal de Robson Carlos Avi)



No Estado de Santa Catarina, *Ocotea catharinensis* floresce de julho a março, seu período de frutificação ocorre nos meses de

novembro a dezembro, e a dispersão de suas sementes acontece de maneira zoocórica, por mamíferos e aves (Carvalho, 1994). A canela-preta é uma árvore que produz sementes esporadicamente, sendo que as mesmas não podem ser armazenadas por mais de três meses em condições convencionais, perdendo a viabilidade rapidamente, sendo por isso considerada recalcitrante (Moura-Costa *et al.*, 1993).

Comparativamente, espécies arbóreas tropicais, frequentemente, apresentam menor densidade populacional que as espécies arbóreas de regiões temperadas, além de dependerem em maior extensão de animais para o processo de polinização. Este fato interfere diretamente na extensão da região ocupada e a magnitude do fluxo de genes, que será dependente do comportamento específico e da distância percorrida pelo polinizador. Consequentemente, em florestas tropicais, a população e a extensão da região ocupada não são facilmente delimitadas (Gibson & Wheelwright, 1996).

Segundo Reitz e colaboradores (1978) a canela-preta foi a árvore mais comum e característica da Floresta Ombrófila Densa (FOD), sendo que em Santa Catarina chegou a representar 1/3 do volume de todas as árvores existentes. No entanto, foi intensamente explorada a partir da década de 40 devido a sua importância econômica para a indústria madeireira, sendo muito utilizada em marcenaria, para uso interior e exterior, como produção de móveis, tacos, assoalhos, laminações, compensados e moirões, e uso na construção naval (Carvalho, 1994). Além do amplo extrativismo, devido ao seu interesse econômico, a expansão das fronteiras agrícolas levou à redução drástica no número de indivíduos e populações (Tarazi, 2006), estando, hoje, ameaçada de extinção.

2.1.1. Importância econômica das Lauraceas

As Lauraceas destacam-se entre as demais famílias devido o seu potencial econômico, algumas espécies são utilizadas pela indústria para a fabricação de diversos produtos, porém, a maioria das espécies tem seu uso restrito às comunidades tradicionais, que detêm o conhecimento empírico da utilização destas plantas (Marques, 2001).

Muitas espécies são utilizadas na culinária, principalmente nos países de clima tropical, como o abacate procedente da América Central, que pode ter sua polpa utilizada em preparações de receitas, tanto doce, como salgadas, ou ainda podendo ser consumida fresca e pura. Algumas espécies de Lauraceas são amplamente utilizadas na culinária como

tempero, como as “canelas” (*Cinnamomum zeylanicum* Breyne e *C. cassia* (Nees) ex Blume) que são espécies arbóreas das quais se extrai a casca e o louro (Côrrea, 1984).

Entre as espécies do gênero *Ocotea* muitas possuem importância econômica, como *O. puberula* Ness., que possui um odor bastante característico, semelhante ao do anis, e que se destaca por possuir características próprias para caixotaria, e utilizada também na fabricação de papel. A espécie *O. diospyrifolia* Mez., encontrada no sul e sudeste do Brasil é utilizada na fabricação de postes e tábuas de assoalho e sua a casca contém tanino. (Barros *et al.*, 1997)

2.1.2. Importância medicinal das Lauraceas

Marques (2001) afirma que, na medicina popular as Lauraceas possuem uso diversificado, desempenhando diferentes funções no tratamento de diversas doenças. Sendo que o gênero *Ocotea* apresenta o maior número de espécies com uso medicinal. Algumas espécies são citadas em estudos etnobotânicos, como por exemplo, *O. aciphylla* (Ness.) Mez. que é utilizada como tônico e estomáquico, quando utilizada em infusões com as folhas, enquanto a casca é utilizada como anti-reumático e depurativo. Além disso, em estudos etnobotânicos realizados por Emmerich e Senna (1985) com índios do Xingu, foi observado que as folhas desta espécie é utilizada para enrolar o cigarro do utilizado pelo Pajé em rituais de cura, sendo que esta folha, quando queimada pode ter efeito narcótico.

Marques (2001) ainda cita outras espécies de *Ocotea* que possuem potencial medicinal, como *O. spectabilis* (Meissn.) Mez. que é considerada um tônico, devido a característica adstringente presente tanto na sua casca como na raiz. Já as folhas e casca de *O. pulchella* Mart. são utilizadas para a facilitação da digestão, também como emenagogas e tônicas do útero. O óleo essencial obtido da casca do caule e da raiz de *O. indecora* Schott. é utilizada como sudorífica, contra sífilis e anti-reumática.

Além deste gênero, outras espécies de Lauracea possuem grande potencial medicinal comprovado, como é o caso de *Laurus nobilis* (louro), que apresenta atividade anti-espasmódica e é utilizado como estimulante nas afecções gástricas e reumáticas. É amplamente utilizado na medicina popular como sudorífico e contra flatulências, para uso externo em feridas e úlceras. O óleo essencial contém laurostearina, geraniol, linalol, cineol, terpineno, engenol e pineno, além

de ácidos orgânicos, ácidos graxos e tanino. Apesar de ser utilizado na prática veterinária como “unguento de louro”, foi observado teratogênese e aumento da possibilidade de aborto em ratos (Côrrea *et al.*, 1998).

Outra espécie que merece destaque é a *Aniba riparia* cujo extrato obtido dos frutos e do cálice possui atividade antibiótica comprovada contra *Candida albicans*, *Bacilos cereus*, *Klebsiela pneumonia*, *Staphylococcus aureus* (Barbosa *et al.*, 1988), além disso, segundo Goulart e colaboradores (1975) o extrato da casca desta espécie e das espécies *A. canellita*, *A. hastamanniana* é capaz de bloquear o desenvolvimento do ancilostomídeo humano. Schlemper e colaboradores (1998) comprovaram a atividade antimicrobiana do extrato da espécie da flora catarinense *Persea cordata* (Vell.), o extrato obtido com acetato de etila possui atividade contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*.

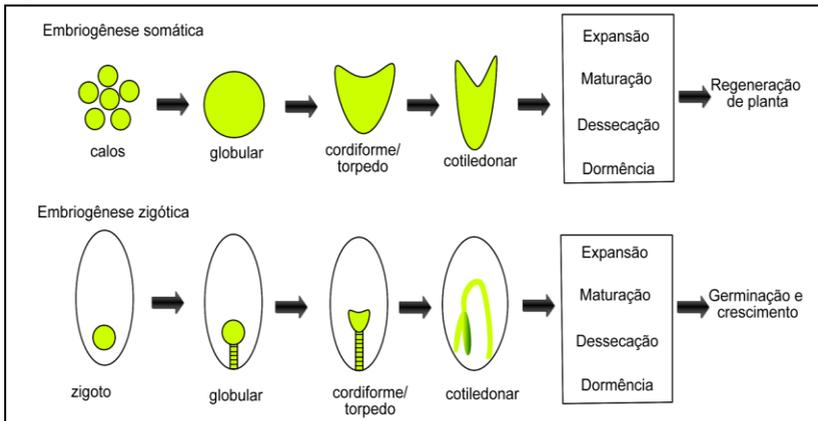
2.2. ESTUDOS SOBRE A EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM *OCOTEA CATHARINENSIS*

Embriogênese somática, também chamada de adventícia ou assexual, é o processo pelo qual células haplóides ou somáticas se desenvolvem através de estádios embriogênicos dando origem a uma planta, sem que haja a fusão de gametas como ocorre na embriogênese zigótica (Williams & Maheswaran, 1986). Segundo Zimmerman (1993), as principais diferenças entre os embriões somáticos e zigóticos relacionam-se com o fato de que embriões somáticos se desenvolvem livres de correlações físicas, fisiológicas e genéticas que ocorrem durante o desenvolvimento em embriões zigóticos, podendo assim apresentar desenvolvimento anormal.

Nos estudos de embriogênese zigótica de uma espécie modelo, a *Arabidopsis thaliana*, as fases da embriogênese se dividem em: globular (embrião de oito células), cordiforme (primórdio do cotilédone), torpedo (alongamento celular e desenvolvimento dos cotilédones) e o estágio de maturação (perda de água e quiescência metabólica), podendo ser subdividido em até 20 estágios (Jurgens & Mayers, 1992). A diferenciação dos meristemas já pode ser observada a partir do estágio cordiforme, onde a região apical originará o meristema apical e os cotilédones, a região central dará origem ao hipocótilo e a região basal originará a raiz.

Na embriogênese somática *in vitro* ou induzida, células haplóides ou diplóides (somáticas) em diferentes estágios de diferenciação podem ser reprogramadas, adquirindo novas competências morfogenéticas. Para isso, elas devem ser adequadamente induzidas por estímulos ambientais ou químicos, apresentando estágios do desenvolvimento embrionário similares à embriogênese zigótica (Guerra et al., 1999) (Figura 2).

Figura 2: Estágios do desenvolvimento do embrião na embriogênese somática e zigótica (adaptado de Zimmerman, 1993).



Neste contexto, a embriogênese somática *in vitro* é um método importante para propagação em massa clonal de genótipos superiores (Guerra et al., 1999). Além disso, é uma técnica de grande aplicabilidade para os estudos básicos relacionados com a fisiologia, genética e bioquímica do desenvolvimento embrionário (Yeung, 1995). Atualmente este sistema vem sendo utilizado para a obtenção de plantas transgênicas (Prakash & Varadarajan, 1992; Gama, 1993) e sementes sintéticas (Schultheis et al., 1990). Sistemas de embriogênese somática também podem ser utilizados para a produção de metabólitos de interesse, uma vez que a produção destes pode estar relacionada com determinados processos de diferenciação morfológica e fisiológica que ocorrem durante a embriogênese.

Viana (1989) e Moura-Costa et al. (1993) desenvolveram um sistema de embriogênese somática repetitiva de alta frequência para a espécie *Ocotea catharinensis*, visando a produção de embriões e plantas em larga escala. Este sistema foi induzido a partir de embriões zigóticos

e foi observado que em meio de cultura semi-sólido estes embriões apresentam quatro fases: agregados celulares, globular, cotiledonar inicial e cotiledonar avançado, sendo que após passarem por um estágio de desidratação, podem maturar e germinar, porém, produzindo plantas em baixa frequência.

Segundo Viana e Mantell (1999), as culturas de agregados celulares podem ser multiplicadas continuamente em meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962) semi-sólido, suplementado com 20g.L^{-1} de sacarose, 80mg.L^{-1} de ácido 2,4-diclorofenoxiacético e 3g.L^{-1} de carvão ativado. Já as culturas de células que apresentam a fase globular e cotiledonar inicial e avançados podem ser multiplicadas continuamente, através do processo de embriogênese repetitiva, em meio de cultura específico para espécies lenhosas WPM (Lloyd e McCown, 1981) semi-sólido, suplementado com 22g.L^{-1} de sorbitol, 20g.L^{-1} de sacarose e 400mg.L^{-1} de glutamina, na ausência de reguladores de crescimento.

Vários aspectos deste sistema de embriogênese somática foram estudados, tais como o crescimento das culturas de células e a caracterização morfológica, citoquímica e bioquímica dos embriões somáticos em diferentes fases de desenvolvimento (Santa-Catarina, 2001; Santa-Catarina *et al.*, 2003); o estabelecimento e manutenção de suspensões celulares a partir de culturas embriogênicas na fase de agregados celulares (Moser, *et al.*, 2004); os fatores que promovem a embriogênese repetitiva no estágio cotiledonar inicial (Santa-Catarina *et al.*, 2004); a análise da competência embriogênica através da expressão do gene SERK (Somatic Embryogenesis Receptor Kinase) em agregados celulares mantidos em diferentes meios de cultura e na presença ou ausência do 2,4-D (Santa-Catarina *et al.*, 2004) e a estabilidade genética das culturas nas fases de agregados celulares e de embriões somáticos diferenciados. De acordo com Viana e Mantell (1999), estudos preliminares sobre a germinação indicaram que taxas de germinação de 30 a 40% podem ser obtidas após moderada desidratação dos embriões somáticos, por 4-6 dias em placas de Petri, o que provoca uma redução ao redor de 25% do peso da matéria fresca dos embriões. Além disso, outras pesquisas foram desenvolvidas com este sistema de embriogênese somática, que indicaram a presença de lignanas, neolignanas específicas e sesquiterpenos, de acordo com o estágio de desenvolvimento dos embriões somáticos (Lordello, 1996; Funasaki *et al.*, 2009).

Funasaki e colaboradores (2009) em estudos fitoquímicos isolou cinco neolignananas e um flavonóide glicosilado do extrato das folhas de *O. catharinensis*, e quatro neolignananas, dois sesquiterpenos e um fenilpropanóide do extrato dos embriões somáticos, que ainda não haviam sido isolados nesta espécie. Além disso, atividade antioxidante e atividade antifúngica contra *Cladosporium cladosporioide* e *C. sphaerospermum* foram evidenciados neste estudo. Segundo o mesmo autor, as culturas embriogênicas foram de as que apresentaram maior sucesso na elucidação de parte da via biossintética de neolignananas em *O. catharinensis*, quando comparados com suspensões celulares e frações enzimáticas. O que indica que o sistema de embriogênese somática desenvolvido para *Ocotea catharinensis* apresenta potencial para exploração biotecnológica e para estudos mais avançados sobre a biossíntese dos compostos detectados.

2.3. METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Segundo Taiz & Zeiger (2004), no ambiente natural, os vegetais estão cercados de situações adversas. Por sua natureza as plantas não podem se locomover, desta forma deve dispor de outras formas de proteção. Os metabólitos secundários em geral não apresentam ação direta sobre o metabolismo primário da planta, mas possuem funções ecológicas importantes, protegendo o vegetal contra a herbivoria e infecções por microrganismos patogênicos, e também na atração de para animais polinizadores e dispersores.

Há um grande interesse no isolamento de compostos derivados do metabolismo secundário, que por serem produtos da interação entre organismos, frequentemente apresentam atividade biológica comprovada frente a várias patologias humanas (Rhodes, 1994). Duas classes de metabólitos foram investigadas no presente trabalho: carotenóides (subclasse dos terpenos) e compostos fenólicos, ambos amplamente estudados por seu conhecido potencial antioxidante.

2.3.1. Carotenóides

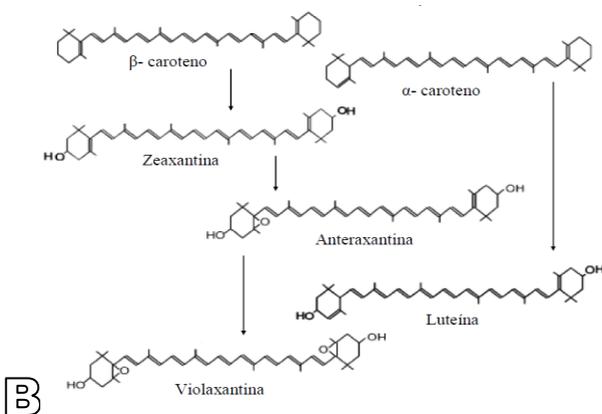
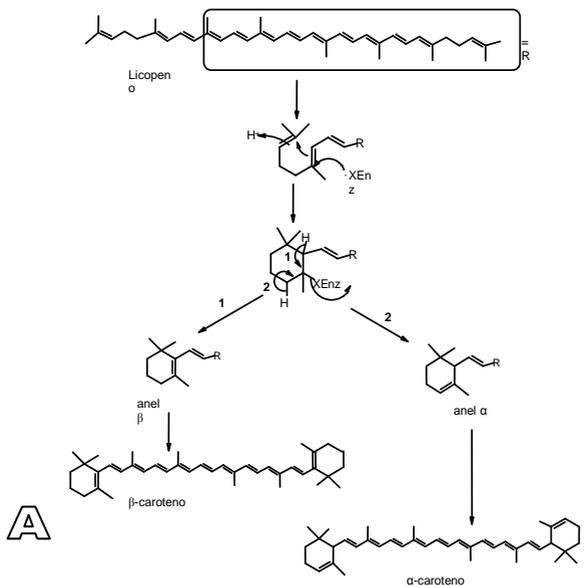
Os carotenóides são pigmentos naturais responsáveis pela coloração amarela, alaranjada e vermelha de muitos vegetais. Nas plantas, participam da fotossíntese, atuando como pigmento acessório e protegem contra a fotoxidação dos tecidos fotossintéticos (Taiz & Zeiger, 2004). Cerca de 750 estruturas químicas já foram descritas a

partir de fontes naturais (Britton, *et al.*, 2004). Também são amplamente estudados por sua conhecida atividade pró-vitamina A. Os carotenóides são caracterizados estruturalmente por uma longa cadeia de duplas ligações conjugadas, formado por oito unidades de isopreno (C_5H_8), contendo assim 40 átomos de carbono, formando um esqueleto tetraterpênico, tornando-os altamente reativos (Cardozo *et al.*, 2007; Britton, 1995; Feltl *et al.*, 2005).

Os carotenóides são produzidos a partir do metabolismo da glucose. A biossíntese dos terpenos se dá através de duas rotas diferentes, a rota do ácido mevalônico, também conhecida como a rota do mevalonato, que ocorre no citosol. A rota do mevalonato é responsável pela formação de sesquiterpenos (C_{15}) e triterpenos (C_{30}), tendo como precursores acetil CoA e piruvato. A outra rota biossintética é a rota do metileritriol fosfato (MEP), o qual origina os monoterpênos (C_{10}), diterpenos (C_{20}) e tetraterpenos (C_{40}), ocorrendo nos cloroplastos e outros plastídeos. A rota do MEP tem como precursores o gliceraldeído-3-fosfato e dois átomos de carbono derivados do piruvato. Ambas as rotas produzem o isopentenil difosfato (IPP) com cinco carbonos (Taiz & Zeiger, 2004; Aharoni *et al.*, 2006; Croteau *et al.*, 2000; Verpoorte, 2000).

O IPP é convertido em seu isômero difosfato de dimetilalila (DMAPP), que serve como substrato para a formação do difosfato geranylgeranila (GGPP), composto com 20 carbonos. O GGPP é o precursor do primeiro carotenóide, o pirofosfato de fitoeno. A biossíntese continua com a formação do licoperseno, que por seguidas dessaturações *trans* sucessivas dá origem ao licopeno, que será substrato para as reações de ciclização. As reações de ciclização podem ocorrer em uma ou nas duas extremidades da cadeia (Figura 3), e darão origem ao α e β -caroteno, seguida de reações de oxidação que darão origem as xantofilas (Mann, 1994).

Figura 3: A: Ciclização do licopeno a α e β -caroteno (adaptado de Mann, 1996). B: Formação das xantofilas, zeaxantina, anteraxantina, violaxantina e luteína a partir do α e β -caroteno (adaptado de Römer et al. 2002).



Os carotenóides são amplamente estudados, dado à importância para a saúde humana devido ao seu potencial antioxidante. O seu consumo pode estar relacionado à redução do risco de doenças crônicas degenerativas, como o câncer, doenças cardiovasculares e atua na proteção da retina aos raios UV (Su *et al.*, 2001). Devido ao número de duplas ligações conjugadas e a polaridade das moléculas, são capazes de desativar o oxigênio singlete e sequestrar os radicais livres, inibindo o processo oxidativo (Fehl *et al.*, 2005).

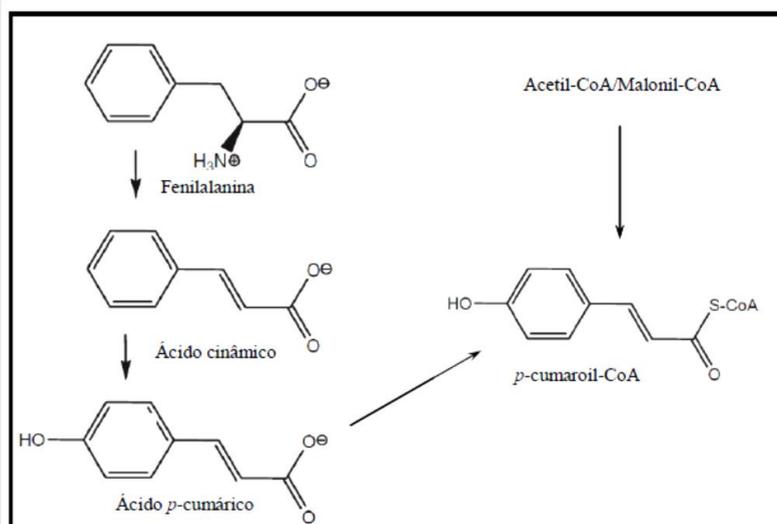
2.3.2. Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos são biossintetizados por meio de diferentes rotas, sendo elas a rota do ácido chiquímico e a rota do ácido malônico. A primeira via responde pela maioria dos fenóis encontrados em vegetais. Já a rota do ácido malônico é menos significativa para as plantas superiores, estando presentes também em fungos e bactérias (Taiz & Zeiger, 2004). Os compostos fenólicos, portanto, constituem um grupo quimicamente heterogêneo, com aproximadamente 10.000 compostos.

A rota do ácido chiquímico converte precursores derivados da glucose e da via das pentoses fosfato em aminoácidos aromáticos (Herrman & Weaver, 1999). Segundo Shahidi & Nacz (2006), os compostos fenólicos podem ser divididos em seis subclasses baseado na sua estrutura química: ácidos fenólicos (C_6-C_1), flavonóides ($C_6-C_3-C_1$), estilbenos ($C_6-C_2-C_6$), lignanas (C_6-C_3)₂, tâninos ($C_6-C_3-C_6$)_n e cumarinas (C_6-C_3). Os flavonóides representam a maior classe de compostos fenólicos, podendo ser divididos em outras subclasses de acordo com as variações que ocorrem no seu anel heterocíclico (Rossi & Kasum 2002, Tapiero et al. 2002).

Nas plantas superiores, a maioria dos compostos fenólicos é derivada, pelo menos em parte, da fenilalanina, proveniente da rota do ácido chiquímico (Taiz e Zeiger, 2004). A fenilalanina, pela ação da enzima fenilalanina amonioliase (PAL), origina o ácido cinâmico; o ácido cinâmico é hidroxilado a ácido *p*-cumarico, que é convertido a *p*-cumaroil-CoA, que é utilizado como substrato para a síntese das classes de compostos fenólicos (Figura 4). O *p*-cumaroil-CoA, pode, também, ser sintetizado a partir da via do acetil-CoA/malonil-CoA (Vermerris & Nicholson 2008).

Figura 4: Formação de *p*-cumaroil-CoA, utilizado como substrato para os compostos fenólicos, a partir da fenilalanina (rota do ácido chiquímico) e da via do acetil-CoA/malonil-CoA, (adaptado de Vermerris & Nicholson 2008).



Devido a sua diversidade química, os compostos fenólicos apresentam uma ampla variedade de funções nos vegetais. Muitos agem como compostos de defesa contra herbívoros e patógenos, outros tem função de suporte mecânico, podem agir como atrativo de polinizadores e dispersores, e ainda atuando na proteção contra a radiação ultravioleta (Taiz & Zeiger, 2004). Além disso, os compostos fenólicos são responsáveis pela inibição de germinação de sementes e estabelecimento de plantas em comunidades vegetais, reduzindo assim o crescimento das plantas adjacentes (Carmo *et al.*, 2007)

Com relação à atividade biológica dos compostos fenólicos podemos destacar a atividade antitumoral (Rao *et al.*, 1993), anti-inflamatória (Maggi-Capeyron *et al.*, 2001) e antiviral (King *et al.*, 1999). Além disso, polifenóis como os flavonóides e os precursores das ligninas são potentes anti-oxidantes, agindo como anti-mutagênicos e anti-cancerígenos (Middleton & Kandaswami, 1994; Rice-Evans *et al.*, 1997; Sugihara *et al.*, 1999).

A presença de compostos fenólicos em culturas de células embriogênicas de *Ocotea catharinensis* foi observada anteriormente por Santa-Catarina (2001), que relatou o aumento dos compostos fenólicos

ao longo das semanas de cultivo, cuja liberação para o meio de cultura causou o escurecimento do mesmo, e conseqüentemente a oxidação das culturas.

Carmo e colaboradores (2007) relacionaram a presença de compostos fenólicos e terpenos em *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer com a inibição de germinação de sementes e o estabelecimento de plantas em condições naturais, onde, indivíduos dessa espécie podem eliminar a possibilidade de estabelecimento de novos indivíduos ao seu redor, inclusive da mesma espécie.

2.4. ABORDAGENS BIOTECNOLÓGICAS PARA A PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

A obtenção de biomassa celular para a produção de metabólitos *in vitro* vem sendo amplamente utilizada pela indústria farmacêutica, uma vez que a produção *in vivo* pelas plantas, principalmente por árvores, enfrenta limitações oriundas de variações das condições do ambiente, da baixa concentração de alguns produtos de interesse, e das dificuldades de cultivo de algumas espécies vegetais. A produção de compostos de interesse para saúde humana pode ser realizada através da produção de órgãos, como raízes e tubérculos, embriogênese somática ou da indução e produção de massa celular em condições controladas, em meio de cultura semi-sólido ou por meio de biorreatores (Grattapaglia & Machado, 1998).

Inicialmente as culturas podem ser mantidas em fase de multiplicação celular, para a máxima produção de células, visando a biossíntese dos compostos de interesse. Num segundo momento, pode-se estudar o uso de elicitores bióticos e abióticos, nos biorreatores, visando aperfeiçoar a produção dos metabólitos secundários. Posteriormente, estes compostos poderão ser extraídos das células vegetais e/ou do meio de cultura e quantificados com o intuito de avaliar o potencial e a viabilidade econômica do processo de produção.

A produção de biomassa vegetal pode se dar a partir de diversos tipos de explantes (gema lateral, folha e raiz). A indução e multiplicação das células podem ser otimizadas em meios de cultura de composição específica, com o uso de tipos e concentrações de reguladores de crescimento e de fontes de carbono, assim como, através da ativação *in vitro* das rotas de biossíntese dos compostos de interesse (Torres *et al.*, 1998).

Todo tecido vegetal que possui células vivas e nucleadas é totipotente e, por assim dizer, pode vir a desenvolver crescimento e/ou diferenciação celular induzida pelo meio de cultura. Após uma sinalização correta no tecido do explante, as células entram em processo de mitose (Aitchison *et al.*, 1977). As regiões mitóticas se estabelecem primeiramente na periferia do explante isolado e, de forma gradativa, em pontos internos do tecido. Camadas de crescimento e regiões de crescimento ativo, na forma de cunhas, passam a se formar. Dependendo do balanço de reguladores de crescimento utilizado no meio de cultura, diversos tipos celulares do explante poderão se desdiferenciar, caracterizando assim um novo sistema que passa a ser chamado de calo (Termignoni, 2005).

Para Grattapaglia & Machado (1998), as principais vantagens da produção de metabólitos *in vitro* são a independência dos fatores ambientais, o aumento do controle da produção, o uso de linhagens que garantam uma qualidade consistente do produto, a simplificação dos métodos de processamento e recuperação do produto alvo, o aproveitamento de novas rotas de síntese, a partir de linhagens mutantes, a utilização de elicitores no direcionamento da produção e o aproveitamento das biotransformações, que ocorrem durante o cultivo de células vegetais *in vitro*, entre outras.

Dois sistemas de cultura de tecidos são utilizados para a regeneração de árvores: organogênese e embriogênese somática. Determinadas espécies são recalcitrantes, ou possuem uma escassa produção de sementes, como é o caso da *Ocotea catharinensis*, então a regeneração via organogênese e a embriogênese somática são alternativas eficientes para a produção *in vitro* de plantas inteiras. O primeiro objetivo do sistema de embriogênese somática, para espécies arbóreas, é a propagação em larga escala e a utilização de embriões somáticos e tecidos embriogênicos como alvo atrativo para modificações genéticas. São utilizados também como modelos para estudos embriológicos (Arnold, *et al.*, 2002; Peña & Seguin, 2001).

A idéia de produzir metabólitos *in vitro* a partir de sistemas de cultura de células deve, entretanto, ser tomada com as devidas precauções, pois na prática nem sempre é possível atingir os resultados desejados, sendo que vários fatores limitam a utilização dessa tecnologia (Pinto & Lameira, 2001).

O cultivo *in vitro* de espécies arbustivas como a *Strelitzia reginae* Ait. (Ave do paraíso) tem se demonstrado eficiente na obtenção de metabólitos secundários, sendo que os metabólitos de interesse são

liberados no meio de cultura, para provar que estes metabólitos possuem valor medicinal ou industrial foi utilizadas técnicas de extração com ácido acético, seguida de identificação em infravermelho, que revelou grupos característicos de compostos fenólicos ou derivados (Paiva *et al.*, 2000).

No caso do cultivo *in vitro* de *Piper hispidinervium* (pimenta longa) o objetivo foi possibilitar o melhoramento genético visando à extração do seu óleo essencial, que possui 80% de safrol em sua composição. O safrol ou 4-alil-1,2-metilenodioxibenzeno, apesar de apresentar comprovada ação carcinogênica, é de grande importância econômica devido o fato de ser precursor de uma variedade de compostos utilizados como fármacos, bioinseticidas biodegradáveis, fixadores de aromas, drogas antitrombicas e auxinas endólicas (Rosa *et al.*, 2000). Até 1990 a obtenção safrol era decorrente da atividade extrativista, o que levou ao comprometimento da disponibilidade de *Ocotea odorifera*, principal fonte de safrol. Para isso, Pescador e colaboradores (2000), utilizaram diferentes técnicas, como organogênese direta, embriogênese somática indireta, produção de calos friáveis e cultura de suspensão de células. Células produzidas em suspensão foram imobilizadas em crisotila, o que resultou em uma produção de safrol três vezes maior do que as células livres cultivadas nas mesmas condições.

Da mesma forma, sistemas de cultura *in vitro* de espécies arbóreas também vem sendo desenvolvidos visando à produção de metabólitos secundários de interesse, como o desenvolvimento de metodologias para produção de biomassa de *O. odorifera* para a produção de safrol, como foi realizado por Santa-Catarina e colaboradores (1999).

Portanto, o potencial dos sistemas de cultura *in vitro* para a produção de metabólitos de interesse de espécies de árvores raras, de importância medicinal deve ser investigado, principalmente, no caso das espécies que estão em risco de extinção. As técnicas de cultura *in vitro* possibilitam que tais sistemas possam ser utilizados em estudos sobre as vias de biossíntese dos compostos de interesse, na otimização da produção de metabólitos secundários *in vitro* e no desenvolvimento de sistemas de conservação de linhagens celulares altamente produtoras, assegurando, assim, formas alternativas para exploração racional e sustentável das espécies de árvores nativas, presentes em ecossistemas ameaçados.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente projeto teve como objetivoo caracterizar as culturas de células embriogênicas de *Ocotea catharinensis* quanto ao crescimento, perfil metabólico, com ênfase em metabólitos secundários, potencial de embriogênese somática secundária e histoquímica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

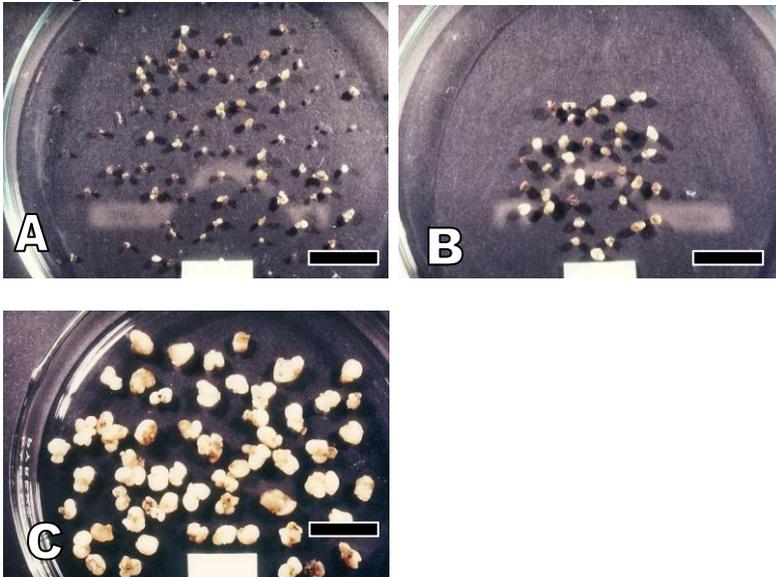
- Avaliar o crescimento de culturas de células embriogênicas de *Ocotea catharinensis* sob diferentes condições de cultivo através de curvas de dissimilação;
- Quantificar metabólitos secundários (compostos fenólicos totais e carotenóides) de culturas de células embriogênicas de *Ocotea catharinensis* crescidas sob diferentes condições de cultivo;
- Comparar o perfil metabólico de culturas de células embriogênicas de *Ocotea catharinensis* crescidas sob diferentes condições de cultivo através de espectrofotometria de varredura em UV-vis e espectrometria de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR);
- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos de culturas de células embriogênicas de *Ocotea catharinensis* crescidas sobre diferentes condições de cultivo;
- Avaliar o efeito de períodos de desidratação, baixas temperaturas, luz, escuro, açúcares alcoóis e de fontes de carbono sobre a embriogênese somática secundária;
- Realizar caracterização histoquímica de culturas de células embriogênicas de *Ocotea catharinensis*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ORIGEM E MANUTENÇÃO DAS CULTURAS EMBRIOGÊNICAS

As culturas embriogênicas utilizadas nos experimentos a seguir foram desenvolvidas a partir da cultura de embriões zigóticos removidos de sementes de *Ocotea catharinensis*, de acordo com a metodologia descrita por Viana (1989) e Viana e Mantell (1999). Apresentavam, predominantemente, estruturas globulares (≤ 2 mm de diâmetro) e estruturas cotiledonares iniciais pequenas (2-3 mm de diâmetro, aproximadamente) (Figura 5). Estas culturas foram utilizadas tanto para a manutenção do estoque de culturas embriogênicas, através das repicagens em períodos de quatro semanas, conforme a metodologia descrita abaixo, como também para a realização dos experimentos de dissimilação do carbono e de embriogênese somática secundária.

Figura 5: Exemplos de estruturas globulares (≤ 2 mm)(A), de estruturas cotiledonares iniciais pequenas (2-3 mm, aproximadamente) (B) e de estruturas cotiledonares mais desenvolvidas (>3 mm)(C) removidas de culturas embriogênicas somáticas de *Ocotea catharinensis*. Barra=1cm.



As culturas embriogênicas foram mantidas em meio de cultura WPM (Lloyd e McCown, 1981), preparação comercial em pó produzida pela Sigma Chemical Co., suplementado com 58,4 mM de sacarose, 121 mM de sorbitol, 2,73 mM de glutamina, 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativo e 2 g.L⁻¹ (p/v) de Phytigel. As culturas foram multiplicadas em períodos de quatro semanas, através da inoculação, cultivo e subsequente proliferação, por embriogênese secundária, das estruturas globulares e cotiledonares iniciais. Cinco inóculos foram transferidos por tubo de ensaio, contendo 8 mL do meio de cultura acima descrito. Os tubos de ensaio foram fechados com filme de polipropileno (76 mm x 76 mm), preso com elástico de borracha. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura controlada de 25 ± 2°C, sob fotoperíodo de 16 horas, provido por lâmpadas fluorescentes Philips TDL (22,3 fótons.m².s⁻¹). Estas condições foram utilizadas em todos os experimentos, exceto quando especificado.

Como as culturas produzidas durante as repicagens não eram uniformes e apresentavam diferentes tipos de estruturas (agregados celulares, estruturas globulares, estruturas cotiledonares iniciais) e, com menor frequência, estruturas cotiledonares (> 3 mm), a partir do estoque das culturas embriogênicas foram isolados os seguintes tipos de cultura, que estão ilustrados na Figura 6: 1- agregados celulares que passaram a ser cultivados, separadamente, no mesmo meio acima descrito para gerar as culturas friáveis (Figura 8). Este tipo de cultura embriogênica friável apresentava consistência pastosa, coloração amarelada/cinza e era constituído por agregados celulares sem qualquer nível de diferenciação a olho nu; 2- tipo diferenciada 1 (Figura 9), apresentava coloração amarelada e textura granular, com pequenas estruturas globulares (≤ 2 mm de diâmetro); o tipo diferenciada 2 era o mais comum e apresentava, predominantemente, estruturas cotiledonares iniciais pequenas (2-3 mm de diâmetro) e coloração esbranquiçada (Figura 10 A); 4- embriões somáticos no estágio cotiledonar maduro (estruturas cotiledonares > 3 mm de diâmetro) (Figura 10 B). Estes tipos de culturas foram utilizadas nas análises bioquímicas. Para as análises citoquímicas não foram analisadas as culturas do tipo friável.

Figura 6. Culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* evidenciando as culturas embriogênicas somáticas: A: friável, com agregados celulares, sem qualquer nível de diferenciação a olho nu; B: diferenciada 1, com textura granular e estruturas globulares pequenas; C: diferenciada 2, com estruturas cotiledonares iniciais <2-3 mm de diâmetro; D: com embriões somáticos no estágio cotiledonar maduro, estruturas cotiledonares >3 mm de diâmetro. Após 4 semanas de cultivo. Barra= 1 cm.



Figura 7: Exemplos de culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* com embriões somáticos no estágio cotiledonar maduro (>3 mm) (A e B) recém removidas do meio de cultura. Após 4 semanas de cultivo. Barra=1cm.

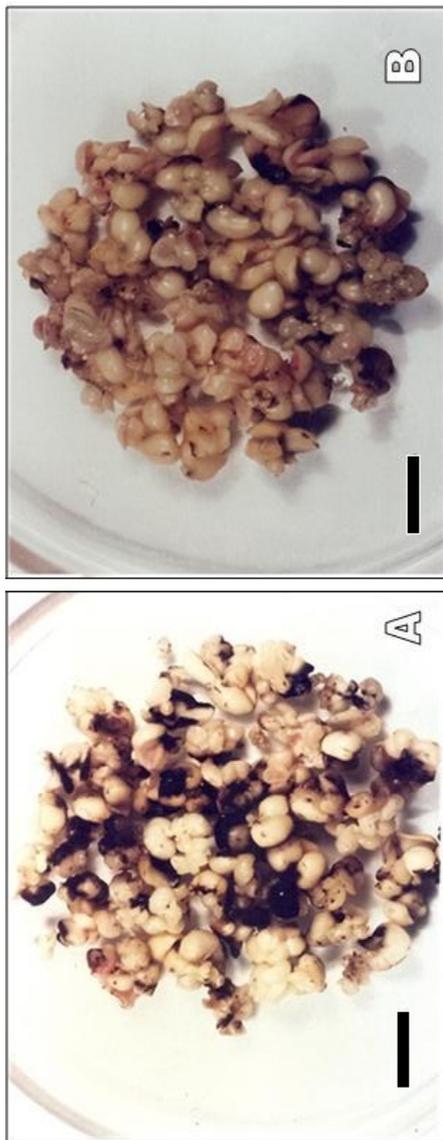


Figura 8: Culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* tipo friável. A) visão geral da cultura. B) Detalhe da mesma cultura. Após 4 semanas de cultivo. Barra = 5 mm.

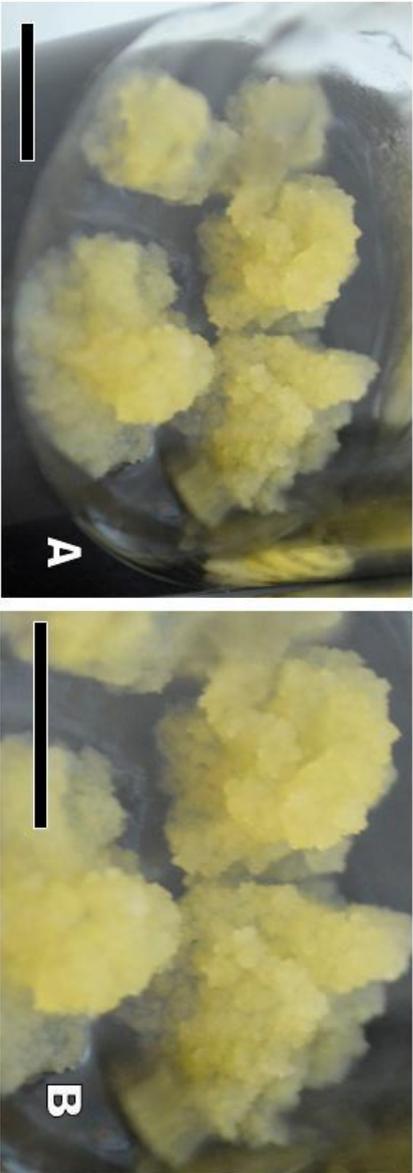


Figura 9: Detalhes de culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* tipo diferenciada 1 mostradas na Figura 4B. As setas indicam estruturas globulares de coloração amarelada (A) e estruturas cotiledonares iniciais esbranquiçadas entre as estruturas globulares amareladas (B) produzidas a partir de embriogênese secundária de uma estrutura oxidada (ponta de seta). Após 4 semanas de cultivo. Barra= 1 mm.

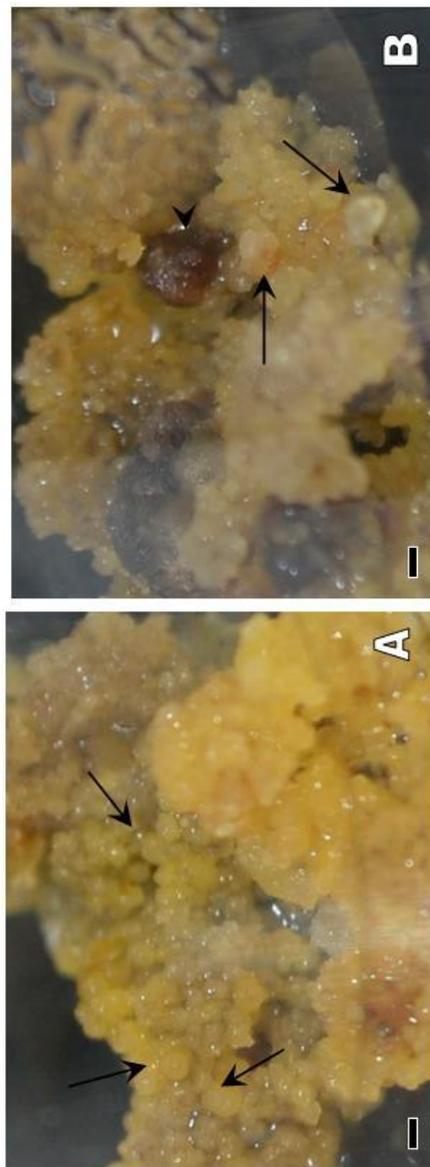




Figura 10: Detalhes de culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* tipo A) diferenciada 2 mostradas na Figura 4C. B) Embrião somático cotiledonar maduro. As setas indicam local de início da embriogênese secundária. Após 4 semanas de cultivo. Barra = 1cm.

4.2. PREPARAÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA

Para todos os experimentos, exceto quando mencionado, foi utilizado o meio de cultura WPM (Woody Plant Medium - Lloyd e McCown, 1981), preparação comercial em pó produzida pela Sigma Chemical Co., suplementado com 58,4 mM de sacarose, 121 mM de sorbitol, 2,73 mM de glutamina, 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativo e 2 g.L⁻¹(p/v) de Phytigel. O pH foi ajustado para 5,8. O meio de cultura foi distribuído em tubos de ensaio (25 mm x 150 mm - 8 mL por tubo), os quais foram fechados com tampas de polipropileno e autoclavados por 20 minutos (121°C, 1 atm).

4.3. CRESCIMENTO E ANÁLISES BIOQUÍMICAS DAS CULTURAS EMBRIOGÊNICAS

4.3.1. Dissimilação de carbono do meio de cultura durante o crescimento das culturas embriogênicas em diferentes fontes de carbono

A dissimilação de carbono, também denominada de dissimilação dos açúcares do meio de cultura, foi avaliada segundo o método de Schripsema (1990) o qual considera a perda de massa das culturas ao longo do tempo de cultivo. Inóculos de culturas embriogênicas com 4 semanas de cultivo crescidas no meio de cultura WPM, descrito no item 4.1 foram transferidos para os meios de cultura WPM de mesma composição suplementado com 58,4 mM de sacarose ou com 116,8 mM de glucose. Para cada tubo foram transferidos aproximadamente 5 inóculos. A determinação da massa inicial das culturas contendo os explantes foi estimada através da determinação da massa de cada tubo de ensaio vazio e numerado, com suas respectivas tampas, tubo de ensaio com meio de cultura e dos tubos contendo o meio de cultura com o inóculo inicial, devidamente fechados. As culturas foram mantidas nas condições descritas no item 3.3, por 29 dias, tendo sua massa registrada diariamente, sempre na mesma balança (AY220, Shimadzu) e no mesmo horário. Em cada tratamento foram utilizadas 10 repetições contendo os inóculos e 3 tubos contendo somente o meio de cultura, que serviram como controle. Os dados obtidos foram plotados em planilha do software Microsoft Office Excel

2007 e determinadas as curvas de dissimilação mais representativas de cada do perfil de dissimilação observado de cada tratamento.

4.3.2 Análises Bioquímicas

4.3.2.1 Produção das culturas embriogênicas para as análises bioquímicas

Inóculos de culturas embriogênicas com 4 semanas de idade (5 inóculos por tubo de ensaio), produzidas no meio de cultura WPM, descrito no item 4.1, foram transferidos para os meios de cultura descritos na Tabela 1, em que foram manipuladas as fontes de carbono (sacarose e glucose, nas concentrações de 58,4 mM, 88,6 mM ou 116,8 mM), fontes de nitrogênio orgânico (ausência ou presença de 2,73 mM de glutamina ou prolina) e fontes de açúcares alcoóis (121 mM de sorbitol ou manitol). A formulação salina do meio de cultura utilizado foi a do meio WPM e todos os meios foram suplementados com 2 g.L⁻¹ de Phytigel. As culturas foram mantidas nas condições descritas no item 4.1 e após 4 semanas de cultivo, exceto quando mencionado, foram coletadas amostras das tipos de cultura produzidos e caracterizados no item 4.1 acima, friável, diferenciada 1, diferenciada 2, assim como embriões somáticos diferenciados, no estágio cotiledonar, para proceder às análises bioquímicas.

4.3.2.2 Preparação dos extratos vegetais

Para as análises bioquímicas de carotenóides, compostos fenólicos, UV-Vis e FT-IR foram utilizados diferentes tipos morfológicos de culturas embriogênicas de *O. catharinensis* (classificados como friável, diferenciada 1 e diferenciada 2) embriões somáticos no estágio cotiledonar e culturas embriogênicas do tipo diferenciada 2 com diferentes períodos de cultivo (2, 3, 4 e 6 semanas), crescidos em meio de cultura WPM suplementado com 58,4 mM de sacarose, 121 mM de sorbitol, 2,73 mM de glutamina, 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativo e 0,2% de Phytigel. Outras condições de cultivo foram utilizadas para avaliar o perfil metabólico das culturas embriogênicas no estágio diferenciado 2, com 4 semanas de cultivo, como as especificadas na Tabela 1, na qual estão representados os meios de cultura e análise bioquímica efetuada.

Tabela 1: Variações na composição dos meios de cultura utilizados para o cultivo de culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* e análises bioquímicas efetuadas. Em todos os casos foi utilizado o meio de cultura WPM suplementado com 0,2% de Phytigel e 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativo.

Fonte de carbono	Açúcar álcool	Fonte de nitrogênio	Análise bioquímica
Sacarose 58,4 mM	Sorbitol 121 mM	0	carotenóides, fenólicos, UV-Vis, FT-IR
	Sorbitol 121 mM	Glutamina 2,73 mM	carotenóides, fenólicos, UV-Vis, FT-IR
	Sorbitol 121 mM	Prolina 2,73 mM	fenólicos, UV-Vis, FT-IR
	Manitol 121 mM	Prolina 2,73 mM	fenólicos, UV-Vis, FT-IR
Sacarose 87,6 mM	Sorbitol 121 mM	0	carotenóides, fenólico, UV-Vis, FT-IR
	Sorbitol 121 mM	Glutamina 2,73 mM	carotenóides, fenólicos, UV-Vis, FT-IR
Sacarose 116,8 mM	Sorbitol 121 mM	0	carotenóides, fenólicos, UV-Vis, FT-IR
	Sorbitol 121 mM	Glutamina 2,73 mM	carotenóides, fenólicos, UV-Vis, FT-IR
Glucose 58,4 mM	Sorbitol 121 mM	0	carotenóides, fenólicos, UV-Vis, FT-IR
	Sorbitol 121 mM	Glutamina 2,73 mM	carotenóides, fenólicos, UV-Vis, FT-IR
Glucose 87,6 mM	Sorbitol 121 mM	0	carotenóides, fenólicos, UV-Vis, FT-IR
	Sorbitol 121 mM	Glutamina 2,73 mM	carotenóides, fenólicos, UV-Vis, FT-IR
Glucose 116,8 mM	Sorbitol 121 mM	0	carotenóides, fenólicos, UV-Vis, FT-IR
	Sorbitol 121 mM	Glutamina 2,73 mM	carotenóides, fenólicos, UV-Vis, FT-IR

As análises de avaliação da atividade antioxidante dos extratos foram realizadas nas culturas embriogênicas com 2, 3, 4 e seis semanas

de cultivo e nos diferentes tipos de culturas embriogênicas (friável, diferenciada 1, diferenciada 2) e embriões somáticos no estágio cotiledonar, produzidos em meio de cultura WPM suplementado com 58,4 mM de sacarose, 121 mM de sorbitol e 2,73 mM de glutamina.

Para todas as análises bioquímicas os extratos foram preparados a partir de dois gramas de material fresco, que foram macerados em cadinho, com auxílio de um pistilo, durante 4 minutos em 10 mL do solvente clorofórmio/metanol (1:1, v/v). Os extratos foram mantidos em repouso, no escuro, por 15 minutos. Após este período, os mesmos foram filtrados, em seguida, centrifugados a 3000 rpm por 6 minutos. O sobrenadante foi submetido à espectrofotometria de varredura (200 a 750 η M) (Hiatachi U-1800). Em seguida, o sobrenadante foi alíquotado (1mL) e o solvente evaporado com auxílio de bomba de vácuo e estufa (45°C por 12 horas). As amostras foram armazenadas a -80°C, até o momento da análise.

4.3.2.3 Perfil metabólico por espectrofotometria de varredura UV-Vis e espectroscopia vibracional de infravermelho médio (FTIR)

Os sobrenadantes dos extratos de culturas embriogênicas produzidas nos diferentes meios de cultura (Tabela 1) foram submetidos à análise por espectrofotometria UV-vis (Hiatachi U-1800), coletando-se os valores de absorbância na janela espectral de 200 a 750 η m, com intervalos de leitura de 1nm e 3 réplicas por extrato. O conjunto de dados espectrais ,obtidos a partir dos extratos metanol: clorofórmio foram submetidas à análise de componentes principais (PCA), visando determinar o grau de similaridade entre as mesmas, utilizando a matriz de covariância, a partir de dados centrados e do cálculo da distância Euclidiana. A análise foi feita a partir do biplote gerado com auxílio do programa MVSP (versão 3.1).

Para a FTIR, amostras (1 mL) dos extratos metanol: clorofórmio (v/v) de culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* (Tabela 1), secos conforme o item 4.3.2.2, foram ressolubilizadas em metanol (1mL) e analisadas em espectrômetro de infravermelho ABB Bomem (modelo FTLA2000), equipado com um sistema de aquisição de ZnSe (32 mm \varnothing , 4 mm espessura). Cinco varreduras/amostra foram coletadas, para uma janela espectral de 400 a 4000 cm^{-1} e intervalos de leitura de 0,97 cm^{-1} utilizando-se com controle (branco) o ar ambiente. O processamento dos dados espectrais utilizou o programa OPUS (v. 5.0, Bruker Rheinsteten, Germany) e considerou a definição da janela

espectral de interesse ($600 - 3000\text{cm}^{-1}$), a correção da linha de base, da relação sinal/ruído e normalização dos espectros.

4.3.2.4 Determinação do conteúdo de Carotenóides Totais

Os extratos foram preparados conforme descrito no item 4.3.2.2. A uma alíquota (1 mL) do extrato seco foi adicionado 1 mL de óleo vegetal de arroz, que em seguida, foi homogeneizado em vórtex. O extrato obtido foi centrifugado ($6000\text{ rpm}/15\text{ min}$), coletando-se $100\text{ }\mu\text{L}$ do sobrenadante para análise do conteúdo total de carotenóides em leitor de microplacas (TP Reader NM, Thermoplate) ($\lambda = 450\text{ nm}$). A quantificação do teor de carotenóides totais foi feita usando uma curva padrão externa de β -caroteno ($5\text{ a }150\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1} - r^2=0,99; y = 0,0198x$). As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos em $\mu\text{g } \beta$ -caroteno por g de massa seca ($\mu\text{g} \cdot \text{g MS}^{-1}$).

4.3.2.5 Determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais

A extração de compostos fenólicos totais foi realizada conforme descrito no tópico 4.3.2.2, as alíquotas secas foram solubilizadas em 3 mL de etanol 70%. A determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais foi feita de acordo com a metodologia descrita por Rhandir e colaboradores (2002). Em um tubo de ensaio, foi adicionado 1 mL do extrato etanólico de cada amostra e 5 mL de metanol 95% seguido de agitação no vórtex. Dessa solução, foi retirado 1 mL e a este adicionado 5 mL de água ultrapura, 1 mL do reativo de Folin-Ciocalteu, seguido de agitação e repouso de 5 minutos. Após, foi adicionado 1 mL de carbonato de sódio 5% (p/v), seguido de agitação e repouso de 1 hora em câmara escura. Em seguida, procedeu-se a leitura das amostras a 725 nm em espectrofotômetro UV-Vis (Hiatachi U-1800). A quantificação dos compostos fenólicos totais foi feita a partir da curva padrão de ácido gálico ($50\text{ a }800\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1} - r^2= 0,99; y = 1,254x$). As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos em μg de ácido gálico por g de massa seca ($\mu\text{g} \cdot \text{g MS}^{-1}$).

4.3.2.6. Avaliação da atividade antioxidante dos extratos - Inibição do radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil)

Para a avaliação da capacidade antioxidante dos extratos, os mesmos foram submetidos ao teste do DPPH•. Este ensaio é baseado na capacidade do radical livre estável 1,1-difenil-2-picrilhidrazil em reagir com substâncias doadoras de hidrogênio ($\text{DPPH}\bullet + \text{AH} \rightarrow \text{DPPH-H} + \text{A}\bullet$), incluindo compostos fenólicos (Roginsky & Lissi 2005), sendo um método amplamente utilizado e relativamente rápido quando comparado a outras técnicas (Sanchez-Moreno et al. 1998, Mensur et al. 2001). O consumo de DPPH• permite estimar a capacidade antioxidante dos analitos na captura de radicais livres presentes no meio. No ensaio espectrofotométrico, a absorvância a 517 nm diminui como resultado de uma alteração na coloração, de violeta para amarelo, uma vez que o radical é capturado por antioxidantes presentes no extrato através da doação de um átomo de H para formar a molécula estável DPPH-H (Espin et al. 2000).

A metodologia utilizada foi descrita por Kim et al. (2002). Uma alíquota do extrato seco foi ressolubilizada em etanol 70%, e a 0,1 mL deste foram adicionados 2,9 mL da solução metanólica do radical DPPH (Sigma, 0,1 mM em metanol 80%). O decréscimo da absorvância em 517 nm foi medido em espectrofotômetro (Hiatachi U-1800), após 30 minutos de incubação da amostra. O hidroxitolueno butilado (BHT) foi utilizado como padrão. Todas as amostras foram analisadas em triplicata. A atividade de sequestro do radical DPPH foi calculada pela equação abaixo:

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

4.4. EMBRIOGÊNESE SECUNDÁRIA

4.4.1. Desidratação das culturas embriogênicas

As culturas embriogênicas somáticas, tipo diferenciado 2, crescidas por quatro semanas no meio de cultura descrito no item 4.1 foram removidas dos meios de cultura, em ambiente estéril de câmara de fluxo laminar, colocadas em placas de Petri, sobre 6 camadas de papel absorvente, autoclavadas previamente por 20 minutos (121°C, 1 atm). As placas de Petri foram fechadas com filme de PVC e mantidas em sala de crescimento em temperatura de 25 ±2°C.

4.4.2. Efeito do tempo de desidratação sobre a embriogênese secundária

As culturas embriogênicas foram mantidas nas condições descritas no item 4.4.1 por períodos de uma a quatro semanas e em seguida inoculadas em meio de cultura WPM (Lloyd & McCown, 1981) suplementado com 58,4 mM de sacarose, 121 mM de sorbitol, 2,73 mM de glutamina, 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativo e 2 g.L⁻¹(p/v) de Phytigel. Foram utilizadas 20 repetições por tratamento, sendo que cada repetição possuía 5 inóculos. As porcentagens de embriões somáticos produzidos pela embriogênese secundária foram avaliadas semanalmente.

4.4.3. Efeito de fontes de carbono e formulações salinas de meios de cultura sobre a embriogênese secundária

Para testar o efeito de fontes de carbono e formulações salinas de meios de cultura, as culturas embriogênicas desidratadas durante 2 semanas, tempo esse determinados pelo resultado obtido no item 4.4.2, foram inoculadas nos meios de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) e WPM suplementados com sacarose, frutose ou glucose, nas concentrações de 58,4 mM, 87,6 mM e 116,8 mM, 121 mM de sorbitol, 2,73 mM de glutamina, 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativo e 2 g.L⁻¹ (p/v) de Phytigel. Foram utilizadas 15 repetições por tratamento, sendo que cada repetição possuía 5 inóculos. As porcentagens de embriões somáticos produzidos pela embriogênese secundária foram avaliadas semanalmente.

4.4.4. Efeito do sorbitol e Fontes de carbono sobre a embriogênese Secundária

Para testar o efeito da presença de sorbitol e fontes de carbono no meio de cultura, as culturas embriogênicas foram desidratadas durante 2 e 4 semanas, e em seguida inoculadas nos meios de cultura WPM suplementado com 58,4mM de sacarose ou 116,8 mM de glucose, 2,73 mM de glutamina, 2 g.L⁻¹de Phytigel® e 121 mM de sorbitol, na presença 1,5 g.L⁻¹de carvão ativado. Foram utilizadas 15 repetições por tratamento, sendo que cada repetição possuía 5 inóculos. As porcentagens de embriões somáticos produzidos pela embriogênese secundária foram avaliadas semanalmente.

4.4.5. Efeito de baixas temperaturas sobre a embriogênese secundária

Para testar o efeito de baixas temperaturas, culturas embriogênicas desidratadas por 2 e 4 semanas foram transferidas para temperaturas de 5°C (geladeira), 0°C (congelador) e -20°C (freezer) onde permaneceram por períodos de 2 e 4 semanas, sendo em seguida inoculadas em meio de cultura WPM suplementado com 116,8 mM de glicose, 2,73 mM de glutamina, 2 g.L⁻¹ de Phytigel® e 121 mM de sorbitol, na presença 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativado. Foram utilizadas 15 repetições por tratamento, sendo que cada repetição possuía 5 inóculos. As porcentagens de embriões somáticos produzidos pela embriogênese secundária foram avaliadas semanalmente.

4.4.6. Efeito de luz e escuro sobre a embriogênese secundária

Para testar o efeito da luz e do escuro, as culturas embriogênicas desidratadas por 2 e 4 semanas foram transferidas para meio de cultura WPM, suplementado com 58,4 mM de sacarose ou 116,8 mM de glicose, 2,73 mM de glutamina, 2 g.L⁻¹ de Phytigel® e 121 mM de sorbitol, na presença 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativado. As culturas foram mantidas nas mesmas condições descritas no item 4.1, sendo que no tratamento de escuro as culturas foram embrulhadas em papel alumínio. Foram utilizadas 15 repetições por tratamento, sendo que cada repetição possuía 5 inóculos. As porcentagens de embriões somáticos produzidos pela embriogênese secundária foram avaliadas após 4 e 8 semanas de cultivo.

4.4.7. Determinação do teor de água das culturas embriogênicas

Para determinação da massa fresca os embriões somáticos foram pesados imediatamente após serem retirados do meio de cultura em seguida transferidos para placas de Petri, que foram mantidas em estufa por 48 horas, a 85°C. O teor de água foi expresso em porcentagem da massa fresca e em mg de água por mg de massa seca (mg H₂O . g MS⁻¹) e determinado através da fórmula:

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

4.5 CARACTERIZAÇÃO HISTOQUÍMICA DAS CULTURAS EMBRIOGÊNICAS

4.5.1. Preparação das amostras

A análise histoquímica foi conduzida com quatro tipos de materiais: 1- embriões secundários originados a partir de estruturas desidratadas produzidas a partir de culturas embriogênicas tipo diferenciada 2; 2- estruturas globulares produzidas a partir das culturas embriogênicas do tipo diferenciada 1; 3- estruturas cotiledonares iniciais produzidas a partir de culturas embriogênicas do tipo diferenciada 2; 4- embriões zigóticos no estágio cotiledonar maduro. Amostras das diferentes estruturas foram selecionadas e seccionadas transversalmente. Os cortes foram processados para análises histoquímicas e morfológicas em microscopia de luz de acordo com Schmidt (2009).

As amostras foram fixadas em solução de paraformaldeído 2,5 % em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2, durante 12 horas em câmara a vácuo, à temperatura de 4° C. Após a fixação, o material foi lavado em tampão fosfato, duas vezes, por 10 minutos em cada troca (Bouzon, 1993). Em seguida, as amostras foram desidratadas em uma série de soluções aquosas de etanol em concentrações crescentes (30%, 50%, 70%, 90% e 100%), com duas trocas de 15 minutos em cada concentração, à temperatura ambiente. A seguir, foi feita a pré-infiltração das amostras, com uma mistura de 1:1 de etanol a 100% e Histoiresina (Leica Histoiresin, Heidelberg, Alemanha), durante 4 h, posteriormente o material foi infiltrado em resina pura por 24 h. A inclusão foi realizada na mesma resina em histo-moldes com adição de polimerizador, à temperatura ambiente, por 2-3 h (Arnold et al., 1975, modificado).

Secções com 5 µm de espessura foram corados com diferentes testes histoquímicos e investigados com o microscópio Epifluorescent (Olympus BX 41) equipado com o sistema de captura Image Q Capture Pro 5.1 Software (Qimaging Corporation, Austin, TX, Estados Unidos da América).

4.5.2. Histoquímica

Os materiais foram submetidos aos seguintes testes histoquímicos:

A) Azul de toluidina (AT-O). Este corante foi utilizado para identificar polissacarídeos ácidos através da reação de metacromasia. As lâminas

contendo as secções foram tratadas com solução aquosa de AT-O 0,5%, acidificada com HCl 1N para pH 3,0, por 30 segundos, lavadas em água destilada e secas ao ar (Gordon & McCandless, 1973; McCully, 1970). As lâminas foram montadas com bálsamo do Canadá.

B) Ácido Periódico de Schiff (PAS). Foi utilizado para identificar a presença de polissacarídeos neutros (amido e celulose). As secções foram oxidadas com solução aquosa de ácido periódico a 1% durante 30 minutos, lavados em água corrente e corados com reativo de Schiff por 30 minutos. Foram, então, lavados em água corrente, secos ao ar e montados com bálsamo do Canadá (Gahan, 1984).

C) Azul brilhante de Coomassie (CBB). Este teste foi utilizado para identificar a presença de proteínas totais. As lâminas contendo as secções foram coradas por 24 h em CBB 0,02 % diluído em solução etanólica acidificada de Clark, posteriormente foram lavadas na mesma solução, seguido de água destilada e secas ao ar (Gahan, 1984). As lâminas foram montadas com bálsamo do Canadá.

4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os experimentos foram montados de acordo com o delineamento estatístico completamente casualizado. Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente através do Teste-t e de análise de variância simples ou multifatorial, seguido do teste de separação de médias de Tukey, considerando um intervalo de confiança de 95% e nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Quando pertinente, os dados em porcentagem foram transformados em arco seno da raiz quadrada da porcentagem antes da realização da análise estatística. Os cálculos foram realizados com o auxílio do software estatístico Statgraphics versão 7.0.

5. RESULTADOS

5.1. CRESCIMENTO E ANÁLISES BIOQUÍMICAS DAS CULTURAS EMBRIOGÊNICAS SOMÁTICAS SECUNDÁRIAS

5.1.1. Determinação das curvas de dissimilação de carbono das culturas embriogênicas de *OCOTEA CATHARINENSIS* em diferentes fontes de carbono

A metodologia das curvas de dissimilação de açúcar foi utilizada para caracterizar o crescimento das culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* do tipo diferenciada 2. Como observado na Figura 11, o padrão de crescimento apresentado pelas culturas embriogênicas somáticas secundárias do tipo diferenciada 2, crescidas em meio WPM suplementado com sacarose 58,4 mM, após 29 dias, não apresentou uma fase de crescimento mais lento, nos primeiros dias de cultivo (fase *lag*), e sim um padrão de crescimento linear, desde o início do cultivo, sendo que após o 20º dia o ritmo de crescimento foi reduzido, entrando as culturas na fase estacionária de crescimento. As culturas suplementadas com sacarose apresentaram a dissimilação total de 0,025 g (Tabela 2).

As culturas embriogênicas mantidas em meio de cultura suplementado com 116,8 mM de glucose apresentaram valor de dissimilação igual de 0,008 g, em dois experimentos independentes. No entanto é possível notar diferentes padrões de crescimento (Figuras 12 e 13). Na Figura 12 é possível observar a fase *lag*, até o terceiro dia de cultivo, seguida de uma fase exponencial que ocorreu do quarto ao sexto dia, seguida de uma redução do crescimento, até o 13º dia e de uma nova fase exponencial, entre o 14º e 17º dia. Na Figura 13, um padrão diferente de dissimilação foi observado, sendo que a curva de dissimilação não apresentou uma fase *lag* bem definida, havendo um crescimento linear do 2º até o 13º dia, após o que o ritmo de crescimento foi reduzido até o 17º dia.

Figura 11: Curva de dissimilação de carbono obtidas a partir da perda de massa de culturas embriogênicas somáticas secundárias de *Ocotea catharinensis* do tipo diferenciada 2, mantidas em meio de cultura WPM, semi-sólido, suplementado com 121 mM de sorbitol, 2,73 mM de glutamina e 58,4 mM de sacarose, durante 29 dias de cultivo. (n=10)

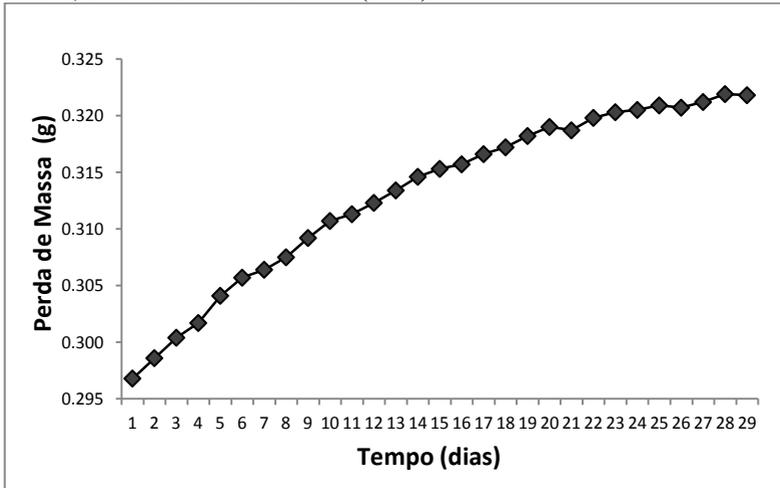


Figura 12: Curva de dissimilação de carbono obtidas a partir da perda de massa de culturas embriogênicas somáticas secundárias de *Ocotea catharinensis* do tipo diferenciada 2, mantidas em meio de cultura WPM, semi-sólido, suplementado com 121 mM de sorbitol, 2,73 mM de glutamina e 116.8 mM de glicose, durante 17 dias de cultivo. (n=10)

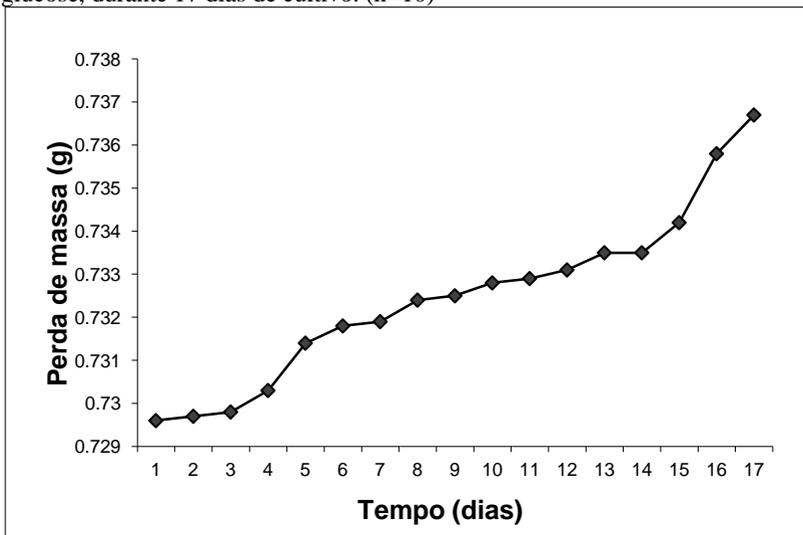


Figura 13: Curva de dissimilação de carbono obtidas a partir da perda de massa de culturas embriogênicas somáticas secundárias de *Ocotea catharinensis* do tipo diferenciada 2, mantidas em meio de cultura WPM, semi-sólido, suplementado com 121 mM de sorbitol, 2,73 mM de glutamina e 116,8 mM de glicose, durante 17 dias de cultivo. (n=10)

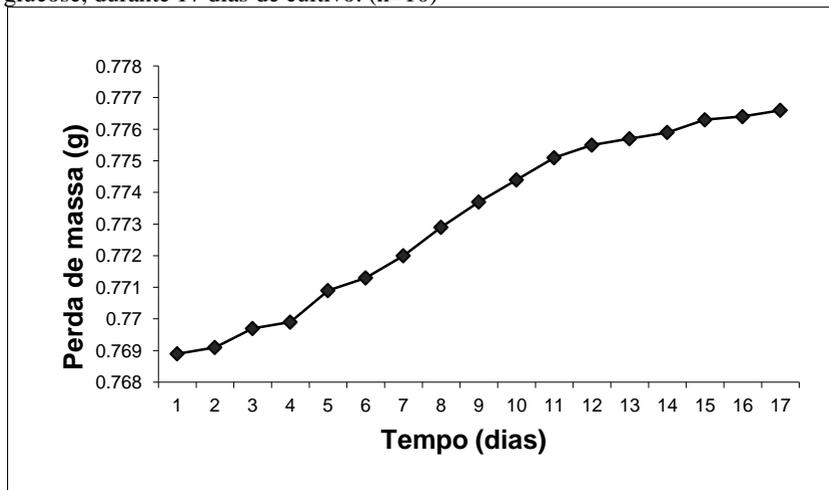


Tabela 2: Valores de massa inicial, massa final e dissimilação total (massa inicial – massa final) das culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* do tipo diferenciada 2, em meio de cultura WPM semi-sólido suplementado com 121 mM de sorbitol, 2,73 mM de glutamina, 58,4 mM de sacarose durante 29 dias ou 116,8 mM de glicose durante 17 dias.

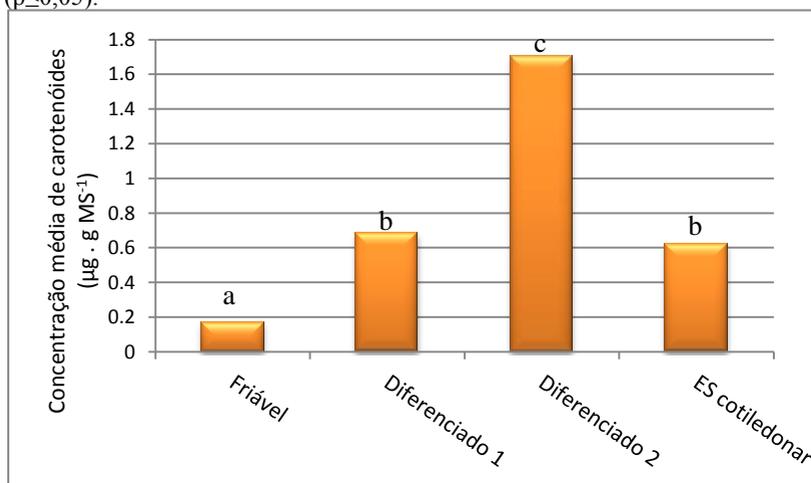
Tratamento	Massa inicial (g) ^a	Massa final (g) ^a	Dissimilação total (g) ^a
58,4 mM Sacarose	0,322	0,297	0,025
116,8 mM Glucose ¹	0,737	0,729	0,008
116,8 mM Glucose ²	0,777	0,769	0,008

^a Valores são médias de 10 repetições.

5.1.2 Determinação da concentração de Carotenóides em culturas embriogênicas de *OCOTEA CATHARINENSIS*

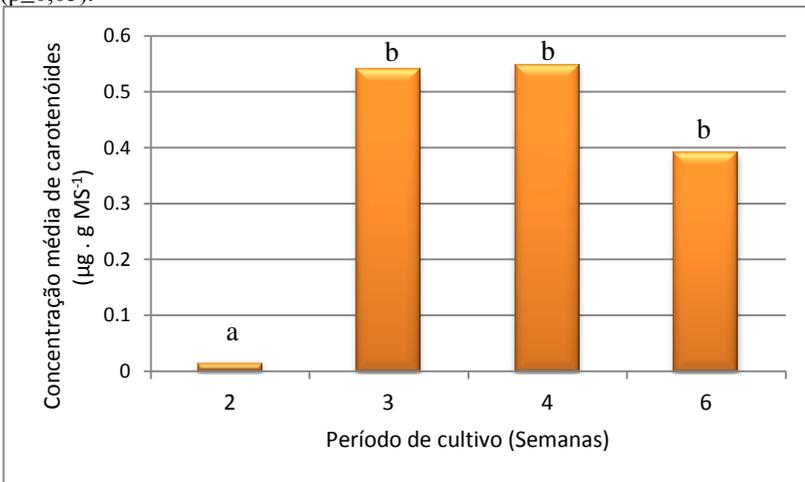
As concentrações de carotenóides referentes aos tipos de culturas embriogênicas (friável, diferenciada 1, diferenciada 2) e embriões somáticos no estágio cotiledonar maduro estão expressas na Figura 14. Observa-se que os teores de carotenóides diferiram significativamente (Tukey $p < 0,05$) entre os tipos de culturas embriogênicas estudadas, que o tipo de cultura diferenciada 2 apresentou maior concentração de carotenóides ($1,71 \pm 0,27 \mu\text{g} \cdot \text{g MS}^{-1}$), enquanto a cultura do tipo friável, apresentou concentração dez vezes menor ($0,17 \pm 0,05 \mu\text{g} \cdot \text{g MS}^{-1}$). Os embriões somáticos no estágio cotiledonar maduro e as culturas do tipo diferenciado 1 apresentaram concentrações médias de carotenóides que não diferiram estatisticamente entre si ($0,61$ e $0,62 \pm 0,06 \mu\text{g} \cdot \text{g MS}^{-1}$, respectivamente).

Figura 14: Concentração média de carotenóides ($\mu\text{g} \cdot \text{g MS}^{-1} \pm$ desvio padrão) nos extratos metanol/clorofórmio, obtidos a partir de culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* dos tipos: friável, diferenciada 1, diferenciada 2 e embriões somáticos no estágio cotiledonar maduro, cultivadas em meio de cultura WPM suplementado com 58,4 mM de sacarose, 121 mM de sorbitol, 2,73 mM de glutamina, após 4 semanas de cultivo. As letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos segundo o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).



A análise desta variável em culturas embriogênicas do tipo diferenciada 2, ao longo das semanas de cultivo (Figura 15) revelou que a concentração média de carotenóides totais foi de $0,014 \mu\text{g} \cdot \text{g MS}^{-1}$ o na segunda semana de cultivo, sendo que esta concentração sobe para de $0,54 \pm 0,12 \mu\text{g} \cdot \text{g MS}^{-1}$ na terceira semana de cultivo se mantendo na quarta semana ($0,55 \pm 0,05 \mu\text{g} \cdot \text{g MS}^{-1}$). Quando a concentração é avaliada na sexta semana de cultivo a concentração média de carotenóide apresenta diminuição ($0,40 \pm 0,06 \mu\text{g} \cdot \text{g MS}^{-1}$), não diferindo estatisticamente (Tukey = $p < 0,05$) dos valores observados na terceira e quarta semana de cultivo (Figura 15).

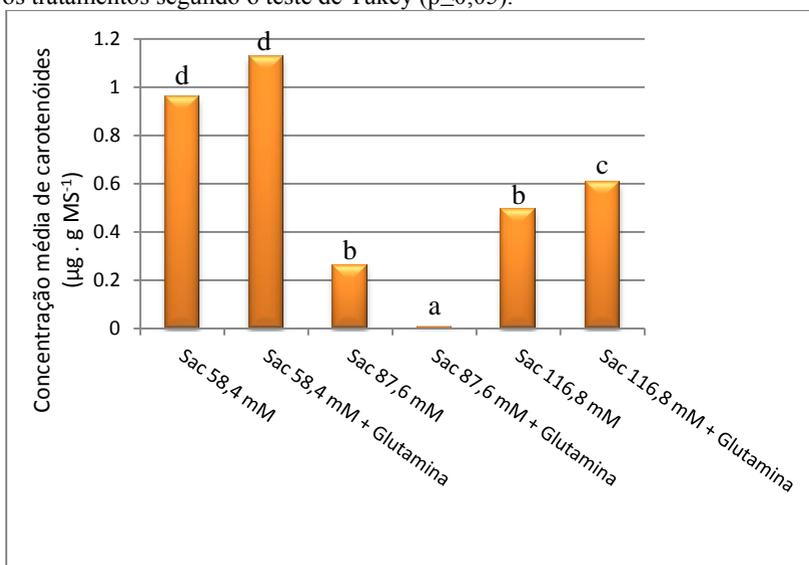
Figura 15: Concentração média de carotenóides ($\mu\text{g} \cdot \text{g MS}^{-1} \pm$ desvio padrão) nos extratos metanol/clorofórmio obtidos a partir de culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* do tipo diferenciada 2, crescidas em meio de cultura WPM suplementado com 58,4 mM de sacarose, 121 mM de sorbitol, 2,73 mM de glutamina, ao longo das semanas de cultivo. As letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos segundo o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).



Nas culturas embriogênicas do tipo diferenciada 2 suplementadas com sacarose as maiores concentrações médias de carotenóides foi observada nas que possuem menor concentração do açúcar (58,4 mM) na presença ($1,12 \mu\text{g} \cdot \text{g MS}^{-1}$) ou ausência ($0,96 \mu\text{g} \cdot \text{g MS}^{-1}$) de glutamina (Figura 16). As culturas com 116,8 mM de sacarose a concentração média diminuiu em relação ao tratamento citado anteriormente, sendo que, as culturas suplementadas com

glutamina apresentaram uma concentração média de carotenóides maior ($0,61 \mu\text{g} \cdot \text{g MS}^{-1}$), do que na ausência dessa fonte de nitrogênio ($0,49 \mu\text{g} \cdot \text{g MS}^{-1}$). Os mínimos teores foram observados nas culturas crescidas com 87,6 mM de sacarose, que possuíam concentrações próximas a zero quando na presença de glutamina ($0,01 \mu\text{g} \cdot \text{g MS}^{-1}$) e na ausência de glutamina a concentração média foi de $0,26 \mu\text{g} \cdot \text{g MS}^{-1}$.

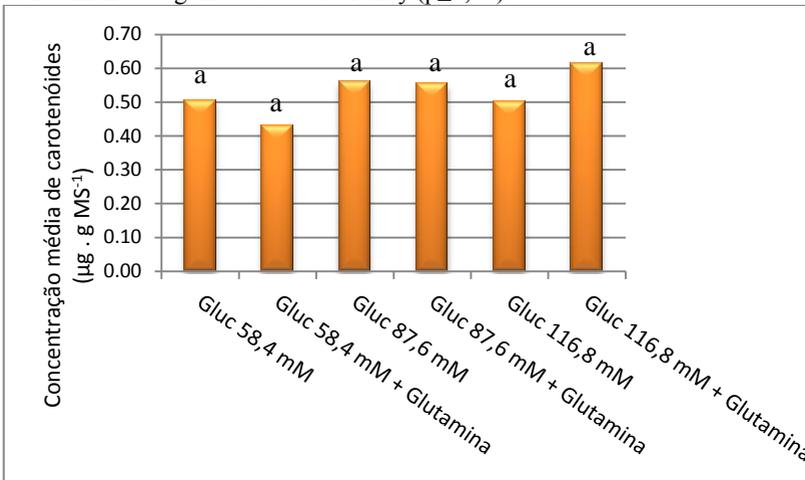
Figura 16: Concentração média de carotenóides ($\mu\text{g} \cdot \text{g MS}^{-1} \pm$ desvio padrão) nos extratos metanol/clorofórmio obtidos a partir de culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* do tipo diferenciada 2, cultivadas em meio de cultura WPM suplementado com 58,4 mM, 87,6 mM ou 116,8 mM de sacarose, 121 mM de sorbitol, na ausência ou na presença de 2,73 mM de glutamina, após 4 semanas de cultivo. As letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos segundo o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).



Para as culturas embriogênicas do tipo diferenciada 2 contendo glucose como fonte de carbono (Figura 17), detectou-se que as concentrações deste monossacarídeo e a suplementação ou não do meio de cultura com glutamina não influenciaram os teores de carotenóides nos embriões somáticos. Onde as culturas suplementadas com 58,4 mM de glucose na ausência apresentaram concentração média de carotenóides de $0,50 \pm 0,04 \mu\text{g} \cdot \text{g MS}^{-1}$ e na presença de glutamina $0,43 \pm 0,09 \mu\text{g} \cdot \text{g MS}^{-1}$, e, as culturas suplementadas com 87,6 mM de

glucose na ausência e na presença de glutamina, obtiveram $0,55 \pm 0,02$ e $0,56 \pm 0,10 \mu\text{g} \cdot \text{g MS}^{-1}$, respectivamente. Já o valor máximo foi observado nos cultivos contendo glucose 116,8 mM e glutamina ($0,61 \mu\text{g} \cdot \text{g MS}^{-1}$) e de $0,50 \pm 0,07 \mu\text{g} \cdot \text{g MS}^{-1}$ quando na ausência de glutamina (Figura 17).

Figura 17: Concentração média de carotenóides ($\mu\text{g} \cdot \text{g MS}^{-1} \pm$ desvio padrão) nos extratos metanol/clorofórmio obtidos a partir de culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* do tipo diferenciada 2, crescidas em meio de cultura WPM suplementado com 58,4 mM, 87,6 mM ou 116,8 mM de glucose, 121 mM de sorbitol, na ausência ou na presença de 2,73 mM de glutamina, após 4 semanas de cultivo. As letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos segundo o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).



5.1.3 Determinação da concentração de Compostos Fenólicos em culturas embriogênicas de *OCOTEA CATHARINENSIS*

As concentrações de compostos fenólicos nas culturas embriogênicas dos tipos friável, diferenciada 1, diferenciada 2 e nos embriões somáticos no estágio cotiledonar maduro, foram significativamente diferentes (Figura 18), onde o tipo friável apresentou uma concentração média de compostos fenólicos de $1,09 \mu\text{g} \cdot \text{g MS}^{-1}$, o diferenciado 1 apresentou 6,38, enquanto o diferenciado 2 apresentaram duas vezes essa concentração ($12,96 \mu\text{g} \cdot \text{g MS}^{-1}$), do

mesmo modo os embriões somáticos do tipo cotiledonar apresentaram uma concentração média de compostos fenólicos de $25,03 \mu\text{g} \cdot \text{g MS}^{-1}$.

Já quando as concentrações de compostos fenólicos são observadas ao longo das semanas em culturas embriogênicas do tipo diferenciado 2, não há diferenças significativas entre os tempos de cultivo (2 semanas = $8,34 \pm 0,09$; 3 sem. = $8,34 \pm 0,05$; 4 sem. = $8,98 \pm 0,12$; 6 sem. = $8,13 \pm 2,79 \mu\text{g} \cdot \text{g MS}^{-1}$) (Figura 23).

Figura 18. Concentração média de compostos fenólicos totais ($\mu\text{g} \cdot \text{g MS}^{-1} \pm$ desvio padrão) nos extratos metanol/clorofórmio obtidos a partir de culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* dos tipos: friável, diferenciada 1, diferenciada 2 e de embriões somáticos no estágio cotiledonar maduro, cultivadas em meio de cultura WPM suplementado com 58,4 mM de sacarose, 121 mM de sorbitol, 2,73 mM de glutamina, após 4 semanas de cultivo. As letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos segundo o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

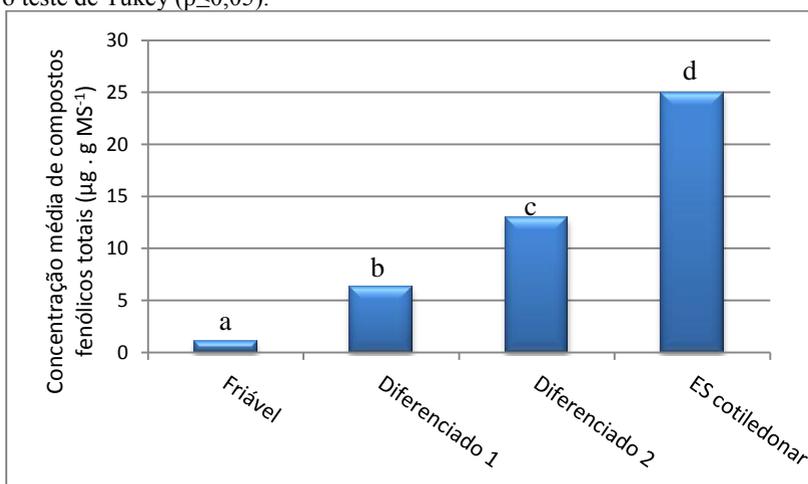
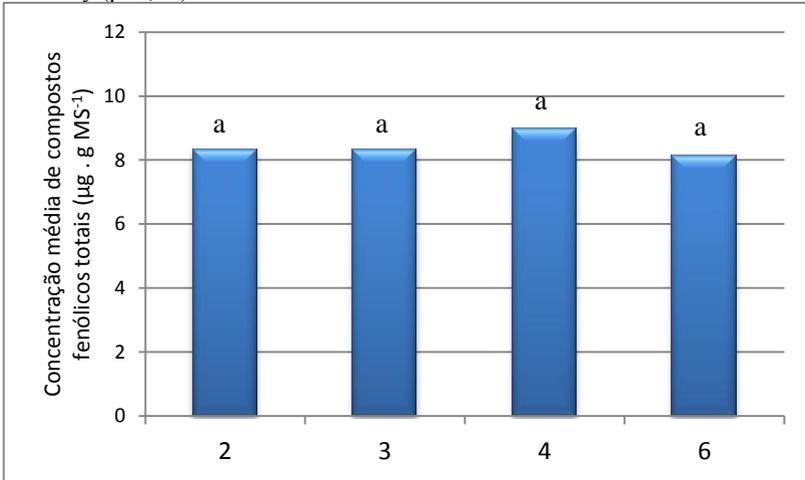
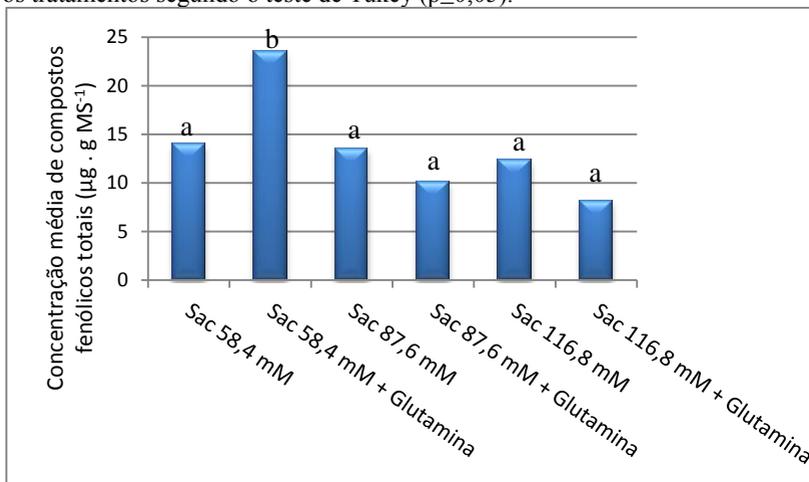


Figura 19: Concentração média de compostos fenólicos totais ($\mu\text{g} \cdot \text{g MS}^{-1} \pm$ desvio padrão) nos extratos metanol/clorofórmio obtidos a partir de culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* do tipo diferenciada 2, crescidas em meio de cultura WPM suplementado com 58,4 mM de sacarose, 121 mM de sorbitol, 2,73 mM de glutamina, ao longo do período de cultivo. As letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos segundo o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).



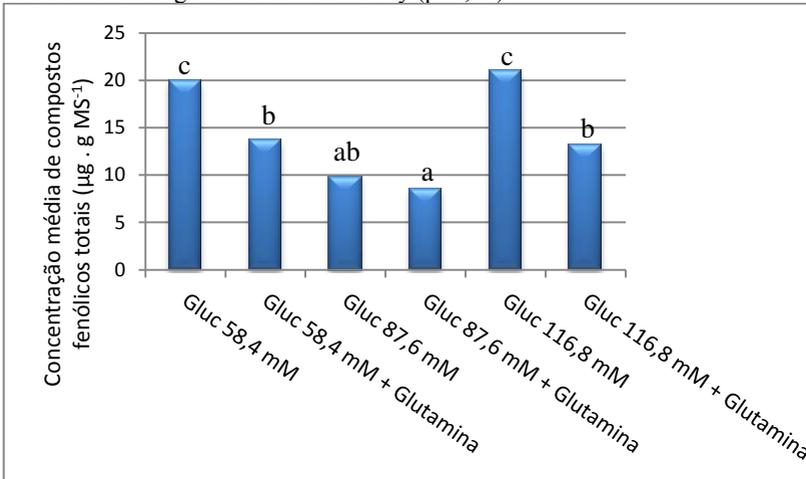
A presença de glutamina combinada com 58,4 mM de sacarose promoveu significativamente a produção de compostos fenólicos ($23,54 \pm 4,56 \mu\text{g} \cdot \text{g MS}^{-1}$) pelas culturas embriogênicas tipo diferenciada 2. Quando avaliada as concentrações médias de fenólicos totais utilizando sacarose como fonte de carbono na presença ou ausência de glutamina (Figura 20) foi observado que na ausência de glutamina os valores são semelhantes independente da concentração deste açúcar (58,4 mM = $13,98 \pm 2,28$; 87,6 mM = $13,55 \pm 1,13$; 116,8 mM = $12,28 \pm 2,83 \mu\text{g} \cdot \text{g MS}^{-1}$). As culturas contendo glutamina nas concentrações 87,6 mM e 116,8 mM apresentaram quantidades menores de compostos fenólicos totais ($10,12 \pm 1,47$ e $8,18 \pm 1,03 \mu\text{g} \cdot \text{g MS}^{-1}$, respectivamente), em relação às mesmas concentrações quando na ausência desta fonte de nitrogênio, não diferindo estatisticamente.

Figura 20: Concentração média de compostos fenólicos totais ($\mu\text{g} \cdot \text{g MS}^{-1}$ seca \pm desvio padrão) nos extratos metanol/clorofórmio obtidos a partir de culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* do tipo diferenciada 2, cultivadas em meio de cultura WPM suplementado com 58,4 mM, 87,6 mM ou 116,8 mM de sacarose, 121 mM de sorbitol, na ausência ou na 2,73 mM de glutamina, após 4 semanas de cultivo. As letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos segundo o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).



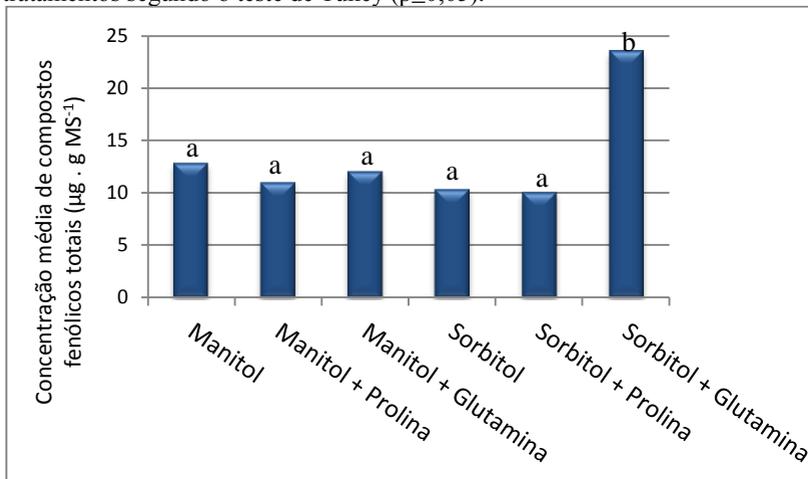
Nas análises realizadas com as culturas embriogênicas do tipo diferenciada 2, cultivadas em meios de culturas suplementados com glucose (Figura 21) aquelas crescidas na ausência glutamina apresentaram concentrações de compostos fenólicos significativamente maiores, (58,4 mM = $19,92 \pm 2,50$ e 116,8 mM = $21,05 \pm 1,80 \mu\text{g} \cdot \text{g MS}^{-1}$). Quando na presença de glutamina as concentrações médias de compostos fenólicos totais não diferem estatisticamente (58,4 mM = $13,65 \pm 1,40$; 116,8 mM = $13,23 \pm 1,36 \mu\text{g} \cdot \text{g MS}^{-1}$) (Tukey $p < 0,05$). Já quanto à concentração média, 87,6 mM na ausência de glutamina, apresenta concentração de compostos fenólicos totais ligeiramente maior ($9,88 \pm 1,12 \mu\text{g} \cdot \text{g MS}^{-1}$) do que na presença ($8,55 \pm 1,03 \mu\text{g} \cdot \text{g MS}^{-1}$) (Figura 21).

Figura 21: Concentração média de compostos fenólicos totais ($\mu\text{g} \cdot \text{g MS}^{-1} \pm$ desvio padrão) nos extratos metanol/clorofórmio obtidos a partir de culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* do tipo diferenciada 2, cultivados em meio de cultura WPM suplementado com 58,4 mM, 87,6 mM ou 116,8 mM de glucose, 121 mM de sorbitol, na ausência ou na 2,73 mM de glutamina, após 4 semanas de cultivo. As letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos segundo o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).



Verifica-se, na Figura 22 que, quando analisadas as quantidades médias de compostos fenólicos totais em culturas embriogênicas do tipo diferenciado 2 cultivadas em meios de culturas contendo diferentes fontes de açúcar álcool (manitol, sorbitol) e presença e ausência de diferentes fontes de nitrogênio (glutamina, prolina), que somente a combinação de sorbitol com glutamina promoveu significativamente a produção de compostos fenólicos ($23,54 \pm 4,55 \mu\text{g} \cdot \text{g MS}^{-1}$), em relação aos demais tratamentos. Nestes tratamentos as concentrações de compostos fenólicos variaram entre $10,09 \pm 0,55$ (sorbitol + prolina) e $12,86 \pm 4,55$ (manitol).

Figura 22: Concentração média de compostos fenólicos totais ($\mu\text{g} \cdot \text{g MS}^{-1} \pm$ desvio padrão) nos extratos metanol/clorofórmio obtidos a partir de culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* do tipo diferenciada 2, cultivadas em meio de cultura WPM suplementado com 58,4 mM de sacarose, 121 mM de sorbitol ou manitol, 2,73 mM de glutamina ou prolina, após 4 semanas de cultivo. As letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos segundo o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).



5.1.4 Avaliação da atividade antioxidante dos extratos - Inibição do radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) em culturas embriogênicas de *OCOTEA CATHARINENSIS*

Os extratos obtidos a partir de culturas embriogênicas do tipo diferenciado 2, ao longo das semanas de cultivo, foram testados quanto à capacidade de inibir o radical DPPH•. Como pode ser observado na Tabela 3, a inibição do radical livre DPPH• pelas culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* ao longo das semanas de cultivo é maior na quarta semana, seguido da terceira semana de cultivo. As culturas embriogênicas do tipo diferenciado 2, ao longo das semanas apresentam uma correlação fortemente positiva (0,99) entre a concentração de compostos fenólicos e inibição do radical DPPH•.

Tabela 3: Inibição do radical DPPH dos extratos MeOH 80% das culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* ao longo do tempo de cultivo (2, 3, 4 e 6 semanas).

Período de cultivo	% inibição do radical DPPH^a
2	33,78 ± 5,75 ^a
3	36,79 ± 12,28 ^{ab}
4	49,74 ± 6,98 ^b
6	29,04 ± 5,56 ^a

^a Valores médios ± desvio padrão de 3 repetições. Letras diferentes na coluna indicam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Os extratos dos diferentes tipos de culturas embriogênicas (friável, diferenciado 1, diferenciado 2) e embriões somáticos no estágio cotiledonar maduro, quando testados frente a sua capacidade de inibição do radical livre DPPH• (Tabela 4) indicaram que as culturas do tipo friável apresentaram inibição do radical livre significativamente maior (15,26 ± 3,57%).

O BHT, controle positivo utilizado para comparação da atividade antioxidante dos extratos apresentou porcentagem de inibição do radical DPPH a 0,05 mg.mL⁻¹ de 85,51 ± 2,02% e 0,1 mg.mL⁻¹ de 91,21 ± 0,91%.

Tabela 4: Inibição do radical DPPH pelo extrato MeOH 80% de culturas embriogênicas *Ocotea catharinensis* dos tipos friável, diferenciada 1, diferenciada 2 e de embriões somáticos no estágio cotiledonar maduro, após 4 semanas de cultivo.

Tipo de cultura embriogênica	Inibição do radical DPPH (%)^a
Friável	15,26 ± 3,57 ^c
Diferenciado 1	2,68 ± 1,12 ^a
Diferenciado 2	7,50 ± 0,47 ^b
Embrião somático cotiledonar	2,98 ± 2,61 ^a

^a Valores médios ± desvio padrão de 3 repetições. Letras similares na coluna não indicam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

5.1.5 Espectroscopia vibracional de infravermelho médio (FT-IR) em culturas embriogênicas de *OCOTEA CATHARINENSIS*

Os perfis espectrais obtidos a partir dos dados obtidos através da espectroscopia vibracional de infravermelho médio por transformada de Fourier (FT-IR) foram comparados através da sobreposição dos mesmos conforme as características do material de origem. A literatura costuma classificar os picos subjetivamente como fracos, moderados ou intensos quanto ao seu tamanho, porém, a condição de aquisição de espectros no presente trabalho não foi de forma quantitativa, sendo possível somente determinar similaridades entre os extratos. A Tabela 5 apresenta os principais sinais espectrais (onda.cm⁻¹) detectados nos extratos e os grupos funcionais dos constituintes respectivos.

Tabela 5: Sinais espectrais de FT-IR (onda.cm⁻¹) das amostras de embriões somáticos de *Ocotea catharinensis*.

Sinal	Grupo Funcional
2924	metil (-CH ₃) e/ou metileno (CH ₂)
2854	metil (-CH ₃) e/ou metileno (CH ₂)
1743	C=O de ácidos ou acetil
1685	C=O de cetonas
1645	C=O de aminas
1585	C=C aromático
1542	NH ₂ de aminas
1520	N-O de nitro compostos
1450	C=C aromático
1419	OH de ácidos carboxílicos ou de C-H
1380	C-CH ₃ -
1235	C-OH éteres - aromático
1130	C-O, C-C, C-O-C (ligação glicosídica)
1076	C-O, C-C, C-O-C (ligação glicosídica)
1054	C-O de alcoóis primários
1012	deformação axial do grupo C-O e deformação angular do grupo OH
990	deformação axial do grupo C-O e deformação angular do grupo OH
930	C-H (carbono anomérico α da D-glucose)
856	C-H (carbono anomérico α da D-glucose)
762	vibração simétrica do anel dos açúcares
706	C=CH de compostos aromáticos
587	C-Cl de cloroalcanos

A Figura 23 apresenta os espectros referentes aos extratos obtidos das culturas embriogênicas do tipo diferenciada 2, cultivadas em meio de cultura WPM suplementado com sacarose em três concentrações (58,4 mM; 87,6 mM; 116,8 mM) na presença ou ausência de glutamina, por quatro semanas. Os extratos analisados apresentaram perfis espectroscópicos semelhantes, formando bandas nas mesmas regiões de comprimento de onda, diferindo apenas nos valores e no ponto específico na formação dos picos (Tabela 6). A análise dos espectros revelou sinais associados à presença de lipídios (2924, 2853, 1740 ondas.cm⁻¹), proteínas (1650-1500 ondas.cm⁻¹), carboidratos

(1200-950 ondas.cm^{-1}) e picos na região que compreende os compostos de origem aromática (2000-1700 e 800-600 ondas.cm^{-1}).

Figura 23: Espectros de FT-IR (3000 – 500 ondas.cm^{-1}) dos extratos metanol:clorofórmio de culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* do tipo diferenciada 2, crescidas em meio de cultura WPM suplementado com sacarose como fonte de carbono nas concentrações 58,4 mM, 87,6 mM e 116 mM, na presença ou ausência de glutamina como fonte de nitrogênio. As cores dos espectros se referem aos tratamentos: **58,4 mM**; **58,4 mM + glutamina**; **87,6 mM**; **87,6 mM + glutamina**; **116,8 mM**; **116,8 mM + glutamina**.

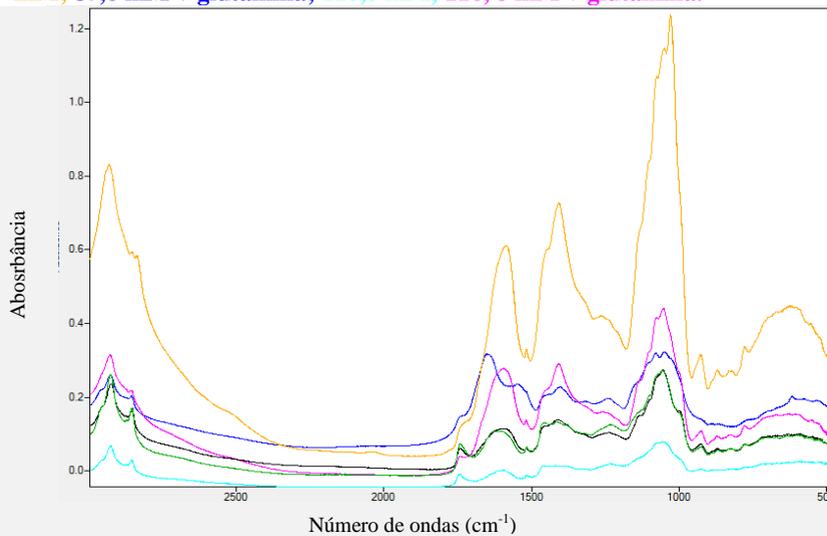


Tabela 6: Valores de número de ondas onde ocorreu a formação de picos de absorvância na espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) (3000 – 500 ondas.cm⁻¹) dos extratos metanol:clorofórmio de culturas embriogênicas cultivadas em meio de cultura WPM suplementado com sacarose como fonte de carbono nas concentrações 58,4 mM, 87,6 mM e 116 mM na presença ou ausência de glutamina como fonte de nitrogênio.

Tratamento	Número de ondas (cm⁻¹)
58,4 mM;	2925,8; 2853,47; 1743,52; 1597,91; 1516,9; 1457,11; 1417,58; 1380,93; 1235,32; 1075,24; 1054,98; 926,73; 876,58; 823,54; 777,26
58,4 mM + glutamina	2923,81; 2852,51; 1737,74; 1595,98; 1516,9; 1462,9; 1410,83; 1227,6; 1055,95; 925,76; 719,4; 588,25
87,6 mM	2924,83; 2853,47; 1740,63; 1616,23; 1515,94; 1455,18; 1415,65; 1235,32; 1055,95; 926,73; 777,26; 699,14; 630,68; 601,75
87,6 mM + glutamina	2927,73; 2854,44; 1740,63; 1595,98; 1517,87; 1407,93; 1262,32; 1077,16; 1054,02; 926,73; 870,8; 827,4; 778,22; 628,75
116,8 mM	2930,62; 2853,47; 1589,23; 1517,87; 1446,51; 1408,9; 1077,16; 1053,06; 1029,91; 926,73; 869,83; 830,29; 778,22; 624,89
116, 8 mM + glutamina	2922,91; 2852,51; 1740,63; 1595,98; 1454,22; 1413,72; 1238,21; 1130,2; 1054,02; 999,05; 926,73; 870,8; 777,26; 631,64; 596,92

A Figura 24 apresenta o padrão espectroscópico das culturas embriogênicas do tipo diferenciada 2 crescidas em meio WPM suplementado com glucose em três concentrações, 58,4 mM, 87,6 mM, 116,8 mM, adicionados ou não de glutamina. É possível observar que a cultura embrionária crescida em meio WPM com 58,4 mM de glucose sem a adição de glutamina e 116,8 mM também sem glutamina foram as únicas que não apresentaram um pico bem pronunciado na região de 2850 ondas.cm⁻¹ (Tabela 7). Os picos obtidos a partir das culturas suplementadas com glucose (Figura 24) se assemelham com os obtidos nas culturas crescidas em meio de cultura suplementado com sacarose (Figura 23), principalmente nas regiões relacionadas aos metabólitos primários, lipídios (2924, 2853, 1740 ondas.cm⁻¹), proteínas (1650-1500 ondas.cm⁻¹), carboidratos (1200-950 ondas.cm⁻¹).

Figura 24: Espectros de FT-IR (3000 – 500 ondas.cm⁻¹) dos extratos metanol:clorofórmio de culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* do tipo diferenciada 2, crescidas em meio de cultura WPM suplementado com glucose como fonte de carbono nas concentrações 58,4 mM, 87,6 mM e 116 mM na presença ou ausência de glutamina como fonte de nitrogênio. As cores dos espectros se referem aos tratamentos: 58,4 mM; 58,4 mM + glutamina; 87,6 mM; 87,6 mM + glutamina; 116,8 mM; 116,8 mM + glutamina.

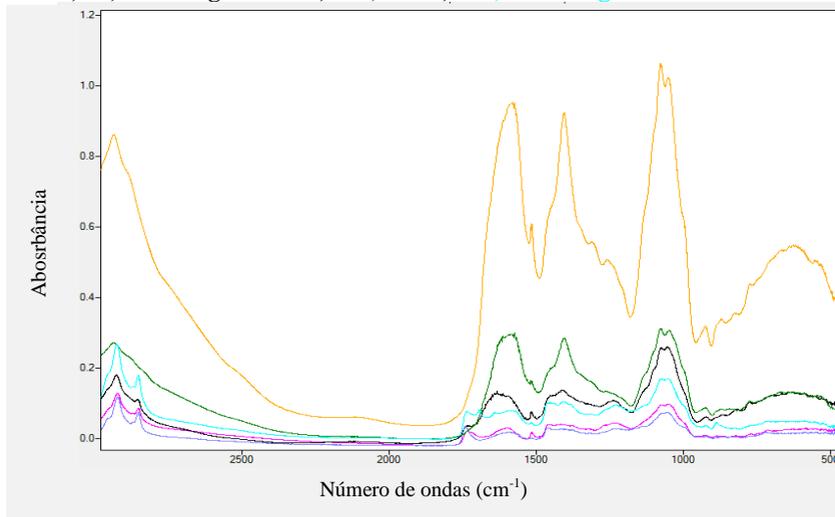


Tabela 7: Valores de número de ondas onde ocorreu a formação de picos de absorvância na espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) (3000 – 500 ondas.cm⁻¹) dos extratos metanol:clorofórmio de culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* do tipo diferenciada 2, crescidas em meio de cultura WPM suplementado com glucose como fonte de carbono nas concentrações 58,4 mM, 87,6 mM e 116 mM na presença ou ausência de glutamina como fonte de nitrogênio.

Tratamento	Número de ondas (cm⁻¹)
58,4 mM;	2937,37; 1595,01; 1517,87; 1407,93; 1263,28; 1080,06; 1054,98; 927,69; 873,69; 827,4; 776,29; 672,14
58,4 mM + glutamina	2922,91; 2852,51; 1735,81; 1598,87; 1515,94; 1454,22; 1419,5; 1379,97; 1269,07; 1238,21; 1077,16; 1052,09; 928,66; 889,12; 822,58; 773,4; 714,57; 630,68; 587,28
87,6 mM	2922,91; 2852,51; 1741,59; 1595,98; 1517,87; 1461,94; 1415,65; 1379; 1231,46; 1138,88; 1071,38; 1056,91; 926,73; 874,65; 832,22; 720,36
87,6 mM + glutamina	2926,76; 2854,44; 1733,88; 1635,52; 1597,91; 1516,9; 1451,33; 1413,72; 1239,17; 1078,13; 1055,95; 925,76; 869,83; 820,65; 777,26; 702,04; 637,04
116,8 mM	2936,41; 1584,41; 1518,83; 1449,4; 1406,97; 1266,17; 1079,09; 1051,13; 926,73; 872,73; 776,29; 670,21
116, 8 mM + glutamina	2925,8; 2852,51; 1737,74; 1694,34; 1641,3; 1581,51; 1517,87; 1462,9; 1410,83; 1386,72; 1231,46; 1078,13; 1054,02; 926,73; 889,12; 719,4; 589,21

Com relação aos espectros apresentados na Figura 25 e Tabela 8, todas as culturas embriogênicas apresentaram picos na região que compreende carboidratos (1200-950 ondas.cm⁻¹). No entanto, a cultura embriogênica friável foi a única a apresentar picos nas três regiões referentes a lipídios (2920, 2850, 1740 ondas.cm⁻¹). Os embriões somáticos cotiledonares maduros apresentaram vários picos nas regiões que compreendem compostos de origem aromática (2000-1700 e 800-600 ondas.cm⁻¹), enquanto culturas embriogênicas do tipo diferenciado 1 não apresentou picos definidos nessas regiões (Tabela 8).

Figura 25: Espectros de FT-IR (3000 – 500 ondas.cm⁻¹) dos extratos metanol:clorofórmio de culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* dos tipos friável, diferenciado 1, diferenciado 2 e embriões somáticos no estágio cotiledonar, cultivados em meio de cultura WPM suplementado com sacarose 58,4 mM, após 4 semanas de cultivo. As cores dos espectros referem-se as culturas embriogênicas: **Friável**; **Diferenciado 1** ; **Diferenciado 2**; **Embrião somático cotiledonar**.

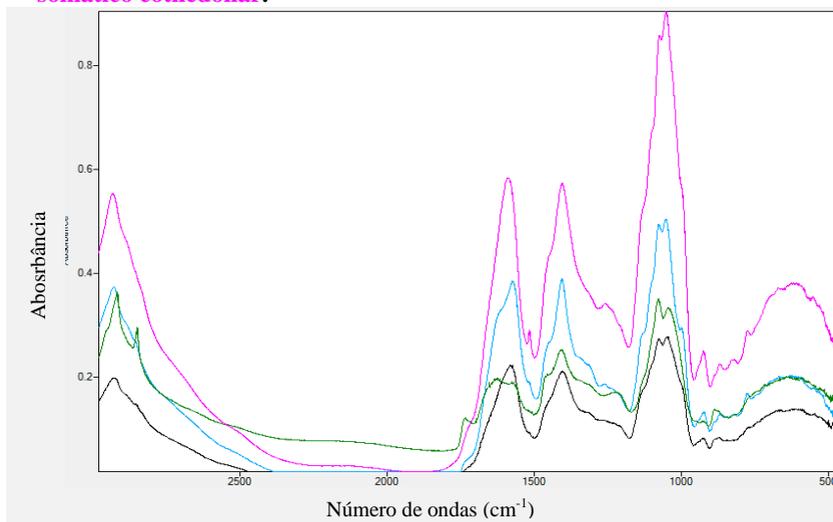


Tabela 8: Valores de número de ondas onde ocorreu a formação de picos de absorbância na espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) (3000 – 500 ondas.cm⁻¹) dos extratos metanol:clorofórmio de culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* dos tipos friável, diferenciada 1, diferenciada 2 e embriões somáticos no estágio cotiledonar maduros, cultivados em meio de cultura WPM suplementado sacarose 58,4 mM, após 4 semanas de cultivo.

Tipo de cultura embriogênica	Número de onda (cm⁻¹)
Friável	2919,05; 2850,58; 1735,81; 1626,84; 1575,73; 1453,26; 1409,86; 1225,67; 1080,06; 1046,31; 928,66; 889,12; 644,18
Diferenciado 1	2929,66; 1584,41; 1406,97; 1079,09; 1050,16; 927,69; 875,62; 677,93; 625,85
Diferenciado 2	2929,66; 1574,76; 1407,93; 1079,09; 1054,02; 1000,98; 925,76; 869,83; 827,4; 778,22; 669,25
Embrião somático cotiledonar	2933,51; 1593,08; 1517,87; 1407,93; 1264,25; 1077,16; 1054,02; 926,73; 870,8; 829,33; 777,26; 673,11; 630,68

A Figura 26 apresenta os perfis espectrais de culturas embriogênicas do tipo diferenciada 2, obtidos ao longo das semanas de cultivo. Como observado nos espectros analisados anteriormente, houve picos pronunciados nas regiões relativas a produtos do metabolismo primário (lipídios, proteínas e carboidratos). Onde as culturas com três semanas apresentaram o menor número de picos pronunciados (12), enquanto as culturas com seis semanas apresentaram 16 picos. Além disso, como observado na Tabela 9, culturas com 3 semanas não apresentaram picos pronunciados na faixa espectral referente a lipídios (2924, 2853, 1740 ondas.cm⁻¹), e culturas com 4 semanas apresentaram apenas 1 pico pronunciados na região espectral referente aos carboidratos (2000-1700) e um pico na região referente a compostos de origem aromática (800-600 ondas.cm⁻¹).

Figura 26: Espectros de FT-IR (3000 – 500 ondas.cm⁻¹) dos extratos metanol:clorofórmio de culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* do tipo diferenciada 2, cultivadas em meio de cultura WPM suplementado com sacarose 58,4 mM, após 2, 3, 4 ou 6 semanas de cultivo. As cores dos espectros referem-se aos tratamentos: **2 semanas**; **3 semanas**; **4 semanas**; **6 semanas**.

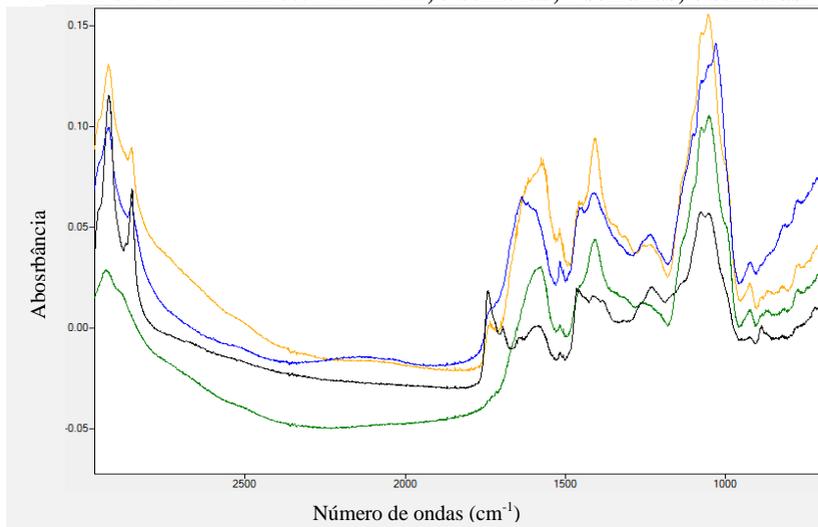


Tabela 9: Valores de número de ondas onde ocorreu a formação de picos de absorvância na espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) (3000 – 500 ondas.cm⁻¹) dos extratos metanol:clorofórmio de culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* do tipo diferenciada 2, cultivadas em meio de cultura WPM suplementado com sacarose 58,4 mM, após 2, 3, 4 ou 6 semanas de cultivo.

Tempo de cultivo (semanas)	Número de onda (cm⁻¹)
2	2924,83; 2853,47; 1735,81; 1574,76; 1517,87; 1455,18; 1408,9; 1258,46; 1076,2; 1054,02; 925,76; 775,33; 633,57
3	2935,55; 1580,55; 1517,87; 1408,9; 1264,25; 1076,2; 1052,09; 925,76; 872,73; 777,26; 631,64; 589,21
4	2923,87; 2852,51; 1741,59; 1695,3; 1642,27; 1588,26; 1516,9; 1462,9; 1414,68; 1383,82; 1231,46; 1079,09; 1053,06; 926,73; 889,12; 720,36
6	2924,83; 2852,51; 1729,06; 1636,48; 1619,12; 1519,9; 1453,26; 1414,68; 1238,21; 1101,31; 1057,24; 1053,06; 1031,84; 925,76; 818,72; 776,29

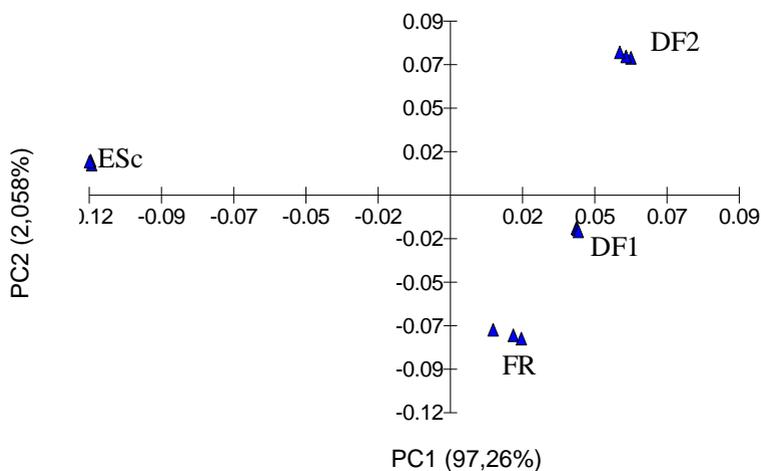
5.1.6 Espectrofotometria de varredura UV-Vis em culturas embriogênicas somáticas secundárias de *OCOTEA CATHARINENSIS*

Os dados obtidos a partir da espectrofotometria de varredura UV-Vis foram submetidos à análise de componentes principais (PCAs), visando o agrupamento das amostras em função da similaridade da composição química. Em todas as análises realizadas foi possível observar que a janela espectral responsável pela distribuição das amostras ao longo dos eixos foi de 290 a 358 nm, típica de compostos fenólicos.

A dispersão das variáveis projetadas de forma bidimensional nos eixos PC1 e PC2 para as para as culturas embriogênicas dos tipos friável, diferenciado1, diferenciado 2 e para os embriões somáticos no estágio cotiledonar maduro, é observada na Figura 27. Os dois primeiros componentes principais (PC1 e PC2) contribuíram para explicar 99,31% da variância presente nos dados. Assim, pode se observar uma clara separação entre as culturas embriogênicas do tipo diferenciado 2 em PC1 e PC2 (+) e embriões somáticos cotiledonar maduro em PC1(-). As culturas embriogênicas do tipo friável e diferenciado 1 foram agrupadas

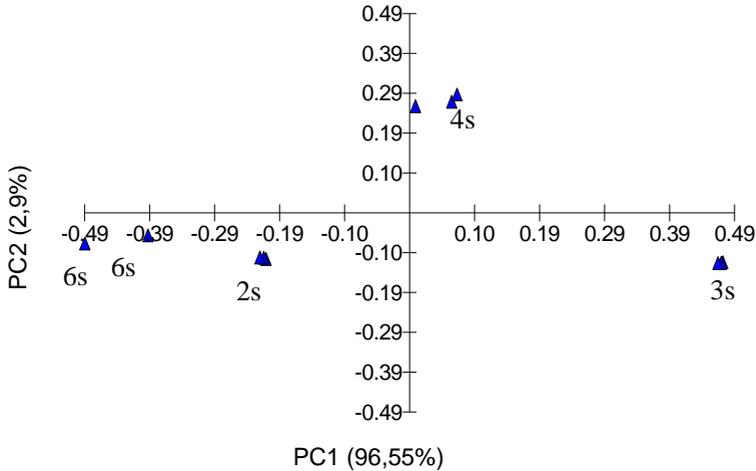
em PC1 (+) e PC2 (-). As janelas espectrais (ηm) de maior influência para a distribuição no PCA foram 290-336 ηm possuindo correlação positiva com PC1, e 290-300 ηm que mostraram correlação negativa com PC2.

Figura 27: Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para os dados obtidos na espectrofotometria de varredura UV-Vis dos extratos obtidos a partir de culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* dos tipos friável (FR), diferenciada 1 (DF1), diferenciada 2 (DF2) e embriões somáticos no estágio cotiledonar (ESc), crescidas em meio de cultura WPM suplementado com 58,4 mM de sacarose, 121 mM de sorbitol, 2,73 mM de glutamina, após 4 semanas de cultivo.



A Figura 28 apresenta as informações geradas com a análise de PCA para os perfis espectrais das culturas embriogênicas do tipo diferenciada 2, ao longo das semanas de cultivo (2,3,4 e 6 semanas). O cálculo de PCA resolveu 99,44% da variabilidade amostral. As culturas embriogênicas crescidas por 2 e 6 semanas aparecem agrupados em PC1 (-). As culturas embriogênicas do tipo diferenciada 2 crescidas por 4 semanas aparecem separados em PC2 (+) apresentando as maiores absorvâncias nos comprimentos de onda de 304 a 312 ηm e os embriões crescidos por 3 semanas em PC1 (+), que apresentaram as maiores absorvâncias nos comprimentos de onda de 290 a 304 ηm e de 314 a 340 ηm .

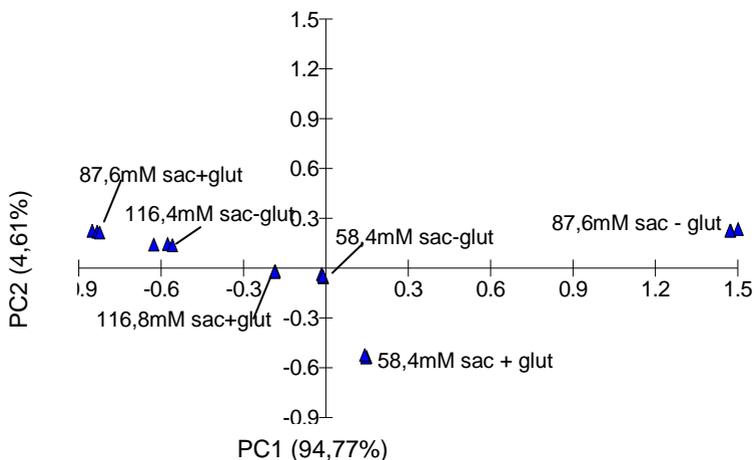
Figura 28: Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para os dados obtidos na espectrofotometria de varredura UV-Vis dos extratos obtidos a partir de culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* do tipo diferenciada 2, crescidas em meio de cultura WPM suplementado com 58,4 mM de sacarose, 121 mM de sorbitol, 2,73 mM de glutamina, ao longo das semanas de cultivo: 2 semanas (2s), 3 semanas (3s), 4 semanas (4s), 6 semanas (6s).



A Figura 29 mostra os resultados de PCA obtidos para as culturas embriogênicas do tipo diferenciada 2, crescidas em meio de cultura contendo sacarose, nas concentrações de 58,4 mM, 87,6 mM, ou 116,8 mM, na presença ou não de glutamina como fonte de nitrogênio, onde PC1 e PC2 explicaram 99,38% da variância dos resultados. A janela espectral de 290-370 nm apresentou maior influência na distribuição ao longo de PC1 e PC2.

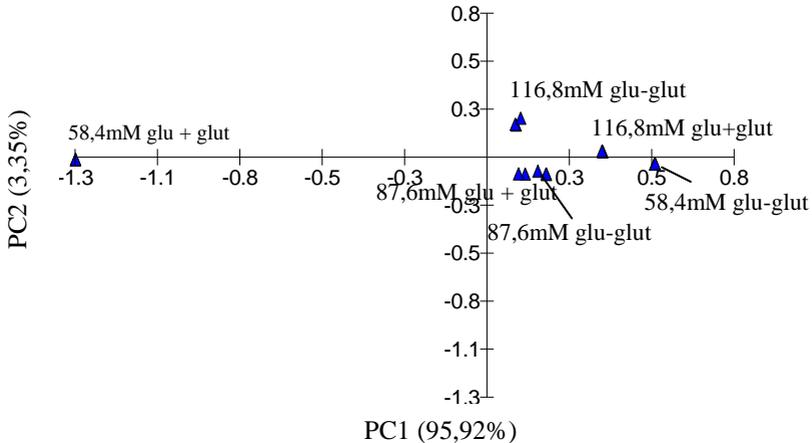
Como é possível observar na Figura 29, a PCA não apresentou agrupamentos claros entre os tratamentos, no entanto, cabe ressaltar que os tratamentos 58,4 mM com adição de glutamina (PC1 + e PC2 -) e 87,6 mM sem adição de glutamina (PC1+) permaneceram bem distanciados dos demais tratamentos, sendo estes os tratamentos que apresentaram maiores picos de absorvância entre 326 e 358 nm.

Figura 29: Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para os dados obtidos na espectrofotometria de varredura UV-Vis dos extratos obtidos a partir de culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* do tipo diferenciada 2, cultivadas em meio de cultura WPM suplementado com sacarose, nas concentrações 58,4 mM, 87,6 mM e 116,8 mM, na presença ou ausência de glutamina (2,73 mM), após 4 semanas de cultivo.



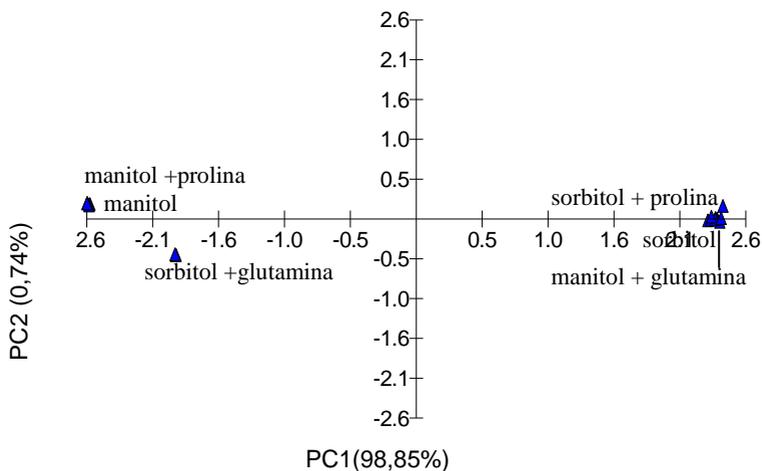
Para as culturas embriogênicas diferenciadas do tipo 2 crescidas em concentrações de glicose com e sem glutamina (Figura 30), pode se observar o agrupamento das amostras ao longo de PC1 (+), com exceção do tratamento com 58,4 mM de glicose com glutamina, que aparece em PC1 (-). A soma dos dois primeiros PC explicou 99,28% a variabilidade dos dados. A janela espectral compreendida entre 290-354 foi correlacionada positivamente com PC1 e entre 324-352 nm positivamente com PC2.

Figura 30: Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para os dados obtidos na espectrofotometria de varredura UV-Vis dos extrato obtidos a partir de culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* do tipo diferenciada 2, cultivadas em meio WPM suplementado com glucose, nas concentrações 58,4 mM, 87,6 mM e 116,8 mM, na presença ou ausência de glutamina (2,73 mM), após 4 semanas de cultivo.



A análise de PCA feita para as culturas embriogênicas do tipo diferenciado 2, crescidas em meio de cultura com variação nas fontes de açúcar álcool (sorbitol e manitol) na presença ou ausência de fontes de nitrogênio (prolina e glutamina) apresentou dois agrupamentos (Figura 31) onde o primeiro agrupamento (PC1 -) é formado pelos tratamentos com sorbitol com glutamina, manitol e manitol com prolina e o segundo agrupamento (PC1+) é formado pelos tratamentos com sorbitol, sorbitol com prolina e manitol com glutamina. Embora a janela espectral que tenha contribuído para estes agrupamentos esteja entre 290-344 nm, foram observadas maiores absorvância neste intervalo para o segundo agrupamento.

Figura 31: Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para os dados obtidos na espectrofotometria de varredura UV-Vis dos extratos obtidos a partir de culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* do tipo diferenciada 2, cultivadas em meio de cultura WPM suplementado com sacarose 58,4 mM, 121 mM sorbitol ou 121 mM manitol, na ausência ou na presença de 2,73 mM de glutamina ou prolina, após 4 semanas de cultivo.



5.2. EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA SECUNDÁRIA EM CULTURAS EMBRIOGÊNICAS DE OCOTEA CATHARINENSIS

5.2.1. Efeito do tempo de desidratação sobre a embriogênese somática secundária

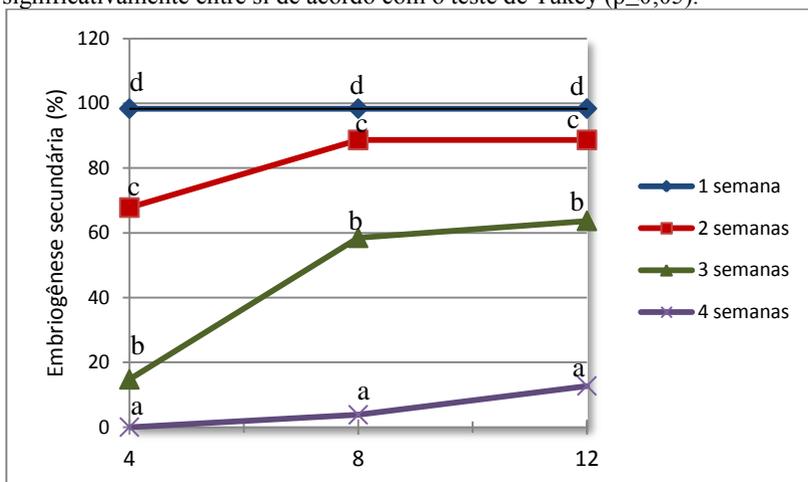
Na Figura 32 estão ilustrados vários exemplos de embriogênese somática secundária a partir de estruturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* oxidadas, desidratadas ou encapsuladas em alginato. Observa-se que os embriões secundários surgem a partir dos tecidos dos embriões somáticos, mesmo estando estes oxidados (Figuras 32 A, D, F, G), encapsulados em alginato (Figuras 32 C, E) ou desidratados (B).

Figura 32: Embriogênese somática secundária em *Ocotea catharinensis* a partir de embriões somáticos oxidados (A, D, F, G), encapsulados em alginato de sódio (C,E) e desidratados (B). As setas indicam embriões somáticos no estágio cotiledonar inicial, ou mais desenvolvidos, produzidos a partir de embriões somáticos oxidados (observar a coloração escura), encapsulados ou desidratados.



Os resultados dos experimentos realizados para investigar a capacidade de embriogênese somática secundária, a partir das estruturas produzidas pelas culturas embriogênicas de *O. catharinensis* do tipo diferenciada 2, após diferentes tempos de desidratação, indicam que, no período de avaliação de quatro semanas, no tratamento com uma semana de desidratação, a taxa de embriogênese secundária foi de 98,35% mas não diferiu estatisticamente da observada no tratamento com duas semanas de desidratação (67,77%), sendo ambas, contudo, superiores às observadas para três (14,75%) e quatro (0%) semanas de desidratação (Figura 33). Entretanto, a partir do intervalo de avaliação de oito semanas foram detectadas diferenças estatísticas entre todos os tratamentos e a taxa máxima de embriogênese secundária obtida para o tratamento de uma semana de desidratação (98,35%) foi significativamente superior às obtidas nos demais tratamentos, respectivamente, 88,66%, 63,68% e 12,72%, para duas, três e quatro semanas de desidratação.

Figura 33: Porcentagem de embriogênese secundária em culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* submetidas à desidratação por 1, 2, 3 e 4 semanas, após 12 semanas de cultivo em meio de cultura padrão WPM suplementado com sacarose 58,4 mM, 121 mM de sorbitol, 2,73 mM de glutamina, 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativo e 2 g.L⁻¹ de Phytigel. Médias de vinte repetições seguidas por letras diferentes, em cada período de avaliação, diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).



Observa-se ainda, na Figura 33, que as culturas desidratadas por duas semanas apresentaram o valor máximo de 88,66% de embriogênese secundária, já na oitava semana de cultivo, enquanto que nas culturas embriogênicas desidratadas durante três semanas houve um atraso na iniciação da embriogênese secundária, e a maior taxa de embriogênese secundária alcançada neste tratamento foi 63,68%, no período de avaliação de doze semanas. Nas culturas embriogênicas desidratadas durante quatro semanas foi observada uma baixa taxa de embriogênese secundária, não ultrapassando 12,72%. Nas culturas embriogênicas desidratadas por cinco semanas não foi detectada embriogênese secundária.

Na Figura 34 estão representados os valores de teor de água das culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* recém retiradas do meio de cultura (0) e ao longo das cinco semanas de desidratação. Embriões recém retirados do meio de cultura apresentam em média 9,5 mg H₂O . mg MS⁻¹, e 90,27% de água. Conforme o demonstrado na Tabela 10, após uma semana de desidratação houve a diminuição de 5,98% no teor de água. Na segunda e terceira semana o teor de água se mantém semelhante, sendo que da terceira para a quarta semana de desidratação, o teor de água diminui drasticamente, aproximadamente 2,8 mg H₂O . mg MS⁻¹ (Tabela 10). O teor de água na quinta semana se assemelha ao encontrado após 4 semanas de desidratação.

Figura 34: Valores médios de teor de água ($\text{mg H}_2\text{O} \cdot \text{mg MS}^{-1}$) \pm desvio padrão em culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* submetidas à desidratação por 1, 2, 3, 4 e 5 semanas e inoculadas em meio de cultura WPM suplementado com sacarose 58,4 mM, 121 mM de sorbitol, 2,73 mM de glutamina, $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ de carvão ativo e 2 g.L^{-1} de Phytigel. Cada tratamento foi realizado com vinte repetições. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os períodos de desidratação de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

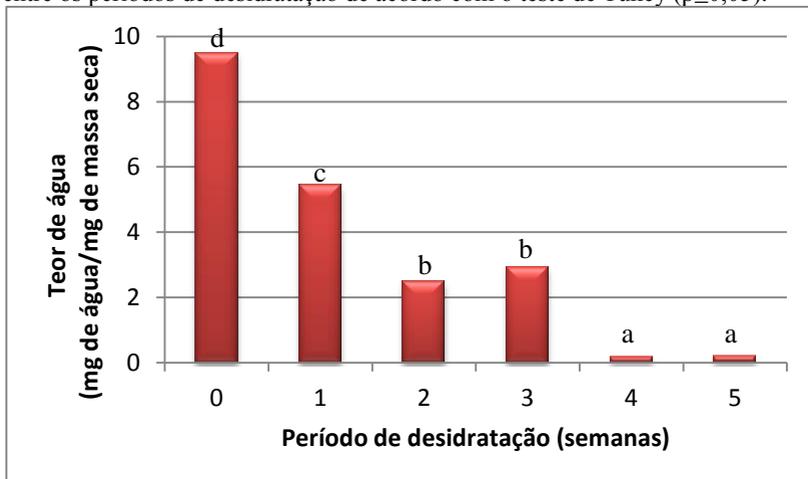


Tabela 10: Teor de água (% da massa fresca) \pm desvio padrão de culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* submetidos à desidratação por 1, 2, 3, 4 e 5 semanas.

Período de desidratação (semanas)	Teor de água (%) ^a
0	90,27 \pm 1,63 d
1	84,29 \pm 1,75 c
2	71,33 \pm 1,13 b
3	74,59 \pm 0,54 b
4	15,28 \pm 2,46 a
5	16,22 \pm 9,21 a

^a Valores médios \pm desvio padrão de 20 repetições. Letras similares na coluna não indicam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

5.2.2 Efeito das formulações salinas de meios de cultura e de fontes de carbono, em diferentes concentrações, sobre a embriogênese somática secundária

5.2.2.1 Efeito de concentrações de fontes de carbono em combinação com o meio de cultura WPM sobre a embriogênese somática secundária

Nas Figuras 35, 36 e 37 estão os resultados de embriogênese somática secundária em função do tempo de cultivo, obtidos em meio de cultura WPM suplementado com concentrações crescentes (58,4 mM, 87,6 mM e 116,8 mM) de sacarose, glucose e frutose a partir de culturas desidratadas por duas semanas. Na presença de sacarose (Figura 35) houve embriogênese secundária em todos os tratamentos, já detectada na segunda semana de avaliação (45,26%), sendo que na sexta semana a maior porcentagem observada (88,66%) foi no tratamento com 58,4 mM de sacarose. Este valor diferiu significativamente do valor obtido com 116,8 mM (67,72%), sendo similar ao verificado com 87,6 mM (85,52%).

Na presença de glucose, verifica-se pela Figura 36 que, em todos os períodos de avaliação, as maiores porcentagens de embriogênese secundária (58,32%, 73,01% e 83,97%, respectivamente após duas, quatro e seis semanas de avaliação) foram obtidas no tratamento com 116,8 mM de glucose e diferiram significativamente dos demais tratamentos.

Figura 35: Porcentagem de embriogênese somática secundária de culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* em meio de cultura WPM suplementado com 2,73 mM de glutamina, 121 mM de sorbitol, 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativado, 2 g.L⁻¹ de Phytigel e com diferentes concentrações de sacarose (58,4 mM, 87,6 mM, 116,8 mM). Cada tratamento foi realizado com vinte repetições. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre as concentrações de sacarose, em cada período de avaliação, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

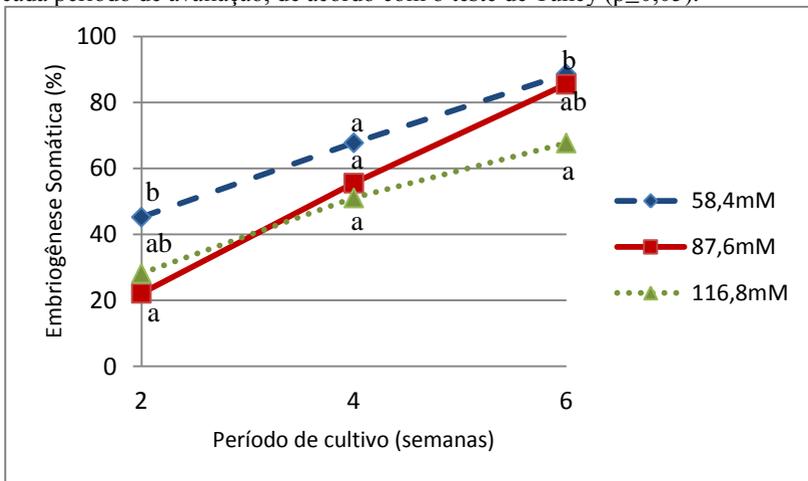
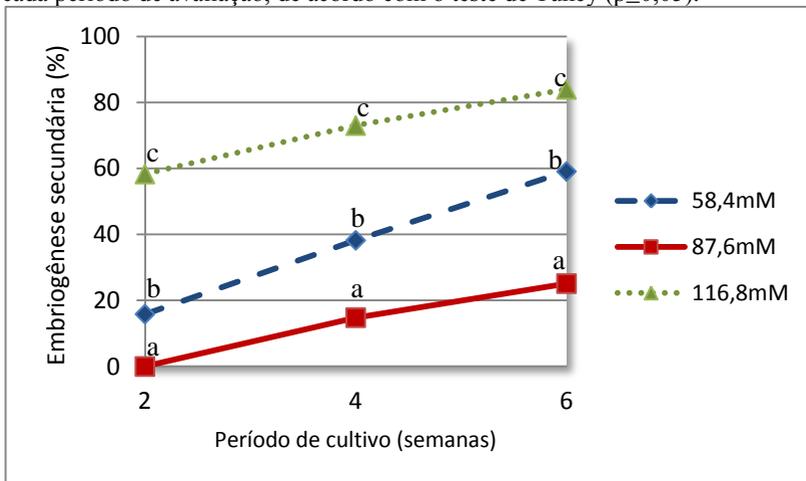
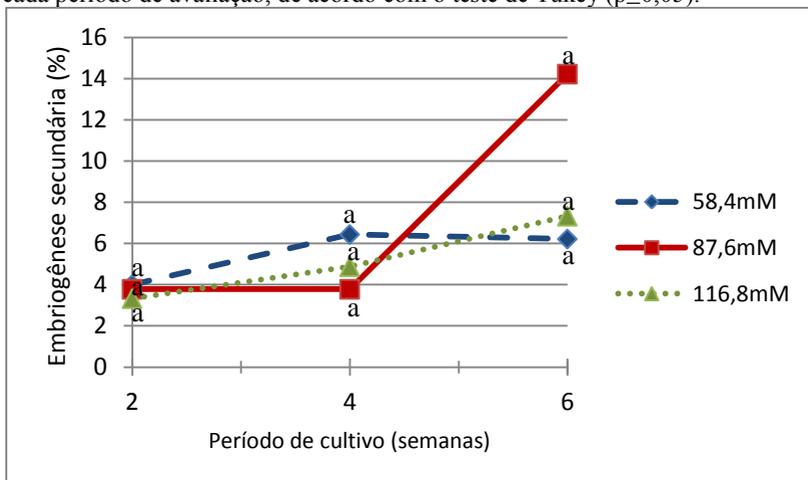


Figura 36: Porcentagem de embriogênese somática secundária de culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* em meio de cultura WPM suplementado com 2,73 mM de glutamina, 121 mM de sorbitol, 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativado, 2 g.L⁻¹ de Phytigel e com diferentes concentrações de glicose (58,4 mM, 87,6 mM, 116,8 mM). Cada tratamento foi realizado com quinze repetições. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre as concentrações de glicose, em cada período de avaliação, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).



As taxas de embriogênese somática secundária obtidas no meio de cultura suplementado com frutose (Figura 37) foram baixas, chegando ao máximo de 14,22%, na concentração de 87,6 mM de frutose, na sexta semana de cultivo, e, em todos os períodos de avaliação não foram detectadas diferenças significativas entre as concentrações de frutose utilizadas.

Figura 37: Porcentagem de embriogênese somática secundária de culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* em meio de cultura WPM suplementado com 2,73 mM de glutamina, 121 mM de sorbitol, 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativado, 2 g.L⁻¹ de Phytigel e com diferentes concentrações de frutose (58,4 mM, 87,6 mM, 116,8 mM). Cada tratamento foi realizado com quinze repetições. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre as concentrações de frutose, em cada período de avaliação, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).



Quando se analisa a eficiência da fonte de carbono, em cada concentração, observa-se pela Tabela 11 que, na concentração de 58,4 mM e 87,6 mM, os maiores valores de embriogênese somática secundária foram obtidos para sacarose (45,26%, 67,78% e 88,66% para 58,4 mM, 22,19%, 55,56% e 85,52% para 87,6 mM), em todos os tempos de cultivo e diferiram significativamente dos tratamentos com glicose e frutose. Contudo, com 116,8 mM, as maiores taxas de embriogênese somática secundária ocorreram com glicose, nos tempos de avaliação de duas e quatro semanas (58,32% e 73,01%, respectivamente), mas na sexta semana as taxas máximas de embriogênese somática secundária observadas com sacarose alcançaram valor estatisticamente semelhante ao valor máximo observado com glicose. Observa-se ainda, pela Tabela 11 que valores máximos de embriogênese somática secundária, variando entre 83,97% e 88,66%) foram obtidos após seis semanas de avaliação, nas concentrações de sacarose de 58,4 mM e 87,6 mM e com 116,8 mM de glicose.

Tabela 11: Comparação do efeito de diferentes fontes de carbono sobre a embriogênese somática secundária (%) de culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* em meio de cultura WPM, suplementado com 2,73 mM de glutamina, 121 mM de sorbitol, 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativado, 2 g.L⁻¹ de Phytigel, em cada uma das concentrações estudadas (58,4 mM, 87,6 mM, 116,8 mM), nos diferentes períodos de avaliação.

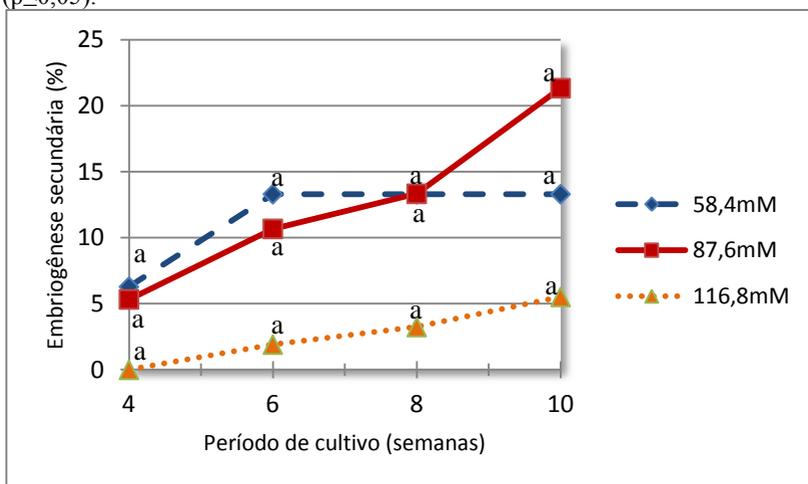
Concentração (mM)	Fontes de carbono	Períodos de avaliação (semanas) ^a		
		2	4	6
58,4	Sacarose	45,25 c	67,78 c	88,66 c
	Glucose	15,86 b	38,23 b	59,09 b
	Frutose	4,00 a	6,44 a	6,22 a
87,6	Sacarose	22,19 b	55,56 b	85,52 b
	Glucose	0 a	14,78 a	25,11 a
	Frutose	3,78 a	3,78 a	14,22 a
116,8	Sacarose	28,20 b	51,08 b	67,72 b
	Glucose	58,32 c	73,01 c	83,97 b
	Frutose	3,33 a	4,88 a	7,33 a

^a Valores médios de quinze repetições, em cada concentração de fonte de carbono e em cada período de avaliação, seguidas por letras semelhantes não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

5.2.2.2 Efeito de concentrações de fontes de carbono em combinação com o meio de cultura MS sobre a embriogênese somática secundária

Nas Figuras 38, 39 e 40 estão os resultados de embriogênese somática secundária em função do tempo de cultivo, obtidos em meio de cultura MS suplementado com concentrações crescentes (58,4 mM, 87,6 mM e 116,8 mM) de sacarose, glucose e frutose a partir de culturas desidratadas por duas semanas. Na presença de sacarose (Figura 38) observa-se que houve embriogênese secundária em todos os tratamentos, mas a maior porcentagem de embriogênese secundária (21,33%) foi observada na concentração de 87,6 mM na décima semana de avaliação, sendo que, em cada período de avaliação não foram detectadas diferenças significativas entre as concentrações utilizadas.

Figura 38: Porcentagem de embriogênese secundária de culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* em meio de cultura MS suplementado com 2,73 mM de glutamina, 121 mM de sorbitol, 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativado, 2 g.L⁻¹ de Phytigel e com diferentes concentrações de sacarose (58,4 mM, 87,6 mM, 116,8 mM). Cada tratamento foi realizado com quinze repetições. Letras semelhantes não indicam diferenças estatísticas entre as concentrações de sacarose, em cada período de avaliação, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).



Quando o meio foi suplementado com glucose verifica-se, pela Figura 39, que nos períodos de avaliação de oito e dez semanas, as maiores porcentagens de embriogênese secundária (17,67% e 26,39%, respectivamente) foram obtidas no tratamento com 58,4 mM. As concentrações de 87,6 mM e 116,8 mM inibiram significativamente a embriogênese secundária nestes períodos de avaliação. Nos demais períodos de avaliação não foram detectadas diferenças significativas entre as concentrações de glucose.

Quando as culturas embriogênicas desidratadas foram cultivadas em meio de cultura MS suplementado com frutose (Figura 40), foram observadas as maiores porcentagens de embriogênese secundária, em todos os períodos de avaliação (43,30%; 44,41%; 50,25% e 55,36%, respectivamente após três, quatro, cinco e seis semanas de avaliação), na concentração de 116,8 mM, enquanto que nas concentrações de 58,4 mM e 87,6 mM não foram detectadas diferenças entre os tratamentos, em nenhum dos períodos avaliados. Apesar do maior valor de porcentagem de embriogênese secundária ter sido

observado após a sexta semana de cultivo, houve a senescência das culturas, que não sobreviveram até a décima semana, como nas culturas suplementadas com as outras fontes de carbono.

Figura 39: Porcentagem de embriogênese secundária de culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* em meio de cultura MS suplementado com 2,73 mM de glutamina, 121 mM de sorbitol, 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativado, 2 g.L⁻¹ de Phytigel e com diferentes concentrações de Glucose (58,4 mM, 87,6 mM, 116,8 mM). Cada tratamento foi realizado com quinze repetições. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre as concentrações de sacarose, em cada período de avaliação, de acordo com o teste de Tukey (p≤0,05).

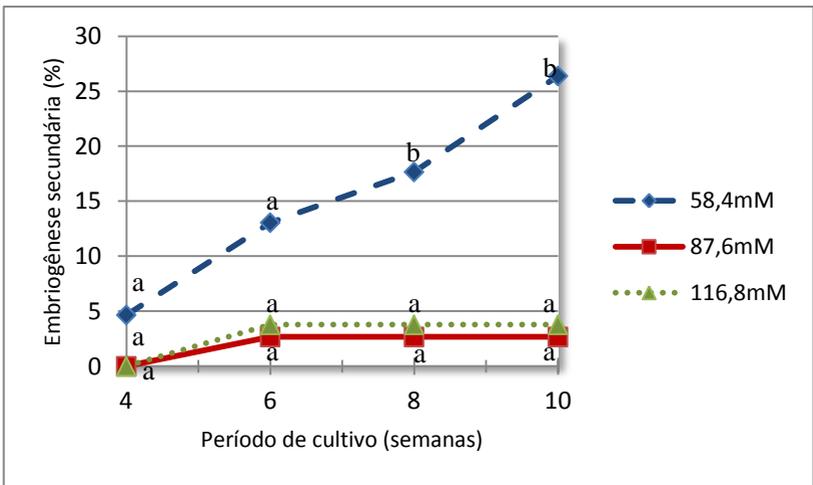
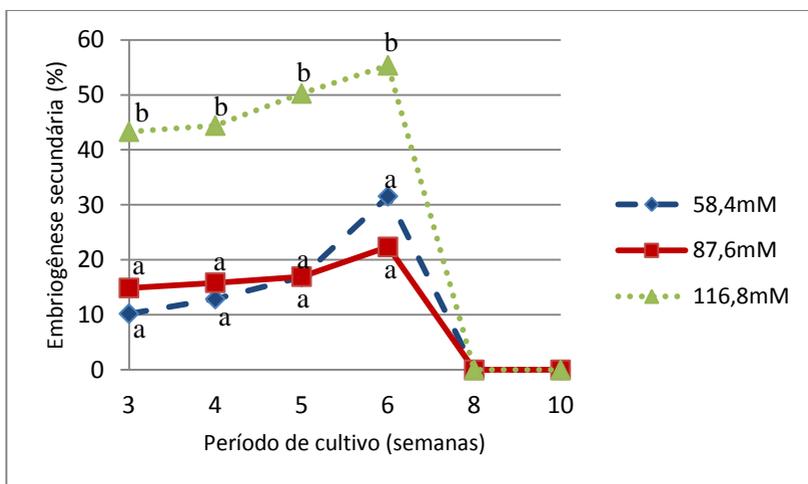


Figura 40: Porcentagem de embriogênese secundária de culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* em meio de cultura MS suplementado com 2,73 mM de glutamina, 121 mM de sorbitol, 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativado, 2 g.L⁻¹ de Phytigel e com diferentes concentrações de frutose (58,4 mM, 87,6 mM, 116,8 mM). Cada tratamento foi realizado com quinze repetições. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre as concentrações de sacarose, em cada período de avaliação, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).



Quando se compara a eficiência da fonte de carbono, em meio de cultura MS, em cada concentração, observa-se pela Tabela 12 que, na concentração de 58,4 mM não foram detectadas diferenças significativas entre as fontes de carbono em nenhum dos períodos analisados. Na concentração de 87,6 mM, a frutose induziu taxas de embriogênese secundária significativamente maiores em todos os períodos de avaliação (14,89%; 15,84%; 16,95% e 22,35%). Contudo, taxas ainda maiores de embriogênese secundária foram observadas com 116,8 mM de frutose, em todos os períodos (44,41%; 50,25% e 55,36%, respectivamente, após quatro, cinco e seis semanas de avaliação). É possível observar ainda, na Tabela 12 que, no meio de cultura MS a máxima taxa de embriogênese secundária (55,36%) foi obtida com 116,8 mM de frutose, após seis semanas de avaliação, enquanto que em todos os outros tratamentos os valores não foram superiores a 31,56%.

Tabela 12: Efeito de fontes de carbono sobre a embriogênese secundária (%) de culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* em meio de cultura MS, suplementado com 2,73 mM de glutamina, 121 mM de sorbitol, 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativado, 2 g.L⁻¹ de Phytigel, em cada uma das concentrações estudadas (58,4 mM, 87,6 mM, 116,8 mM), nos diferentes períodos de avaliação.

Concentração (mM)	Fontes de carbono	Períodos de avaliação (semanas) ^a			
		3	4	5	6
58,4	Sacarose	6,29 a	13,30 a	13,30 a	13,30 a
	Glucose	4,67 a	13,06 a	17,67 a	26,39 a
	Frutose	10,22 a	12,89 a	16,89 a	31,56 a
87,6	Sacarose	5,33 a	10,67 ab	13,33 ab	21,33 b
	Glucose	0 a	2,67 a	2,67 a	2,67 a
	Frutose	14,89 b	15,84 b	16,95 b	22,35 b
116,8	Sacarose	-	1,91 a	3,24 a	5,52 a
	Glucose	-	3,78 a	3,78 a	3,78 a
	Frutose	-	44,41 b	50,25 b	55,36 b

^a Valores médios de quinze repetições, em cada concentração de fonte de carbono e em cada período de avaliação, seguidas por letras semelhantes não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Para 116,8 mM não foram realizadas observações.

5.2.3. Efeito do período de desidratação, sorbitol e fontes de carbono, em meio de cultura WPM, sobre a embriogênese somática secundária

Os resultados da Tabela 13 indicam que a embriogênese somática secundária nas culturas desidratadas por 4 semanas e cultivadas em glucose começou a ocorrer apenas após 14 semanas do início do experimento, enquanto que nos demais tratamentos, tanto na presença como na ausência do sorbitol, já na oitava semana de avaliação foi detectada embriogênese secundária, apesar das porcentagens serem baixas, variando entre 3,56% e 15,11%.

Tabela 13: Embriogênese somática secundária (%), durante 16 semanas de cultivo, a partir de culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* desidratadas por 2 e 4 semanas e cultivadas em meio de cultura WPM suplementado com 2,73 mM de glutamina, 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativado, 2 g.L⁻¹ de Phytigel e com 58,4 mM de sacarose ou 116,8 mM de glucose, na ausência ou presença de 121 mM de sorbitol.

Período de desidratação (semanas)	Fontes de carbono	Sorbitol (mM)	Período de cultivo (semanas) ^a				
			8	10	12	14	16
2	Sacarose	0	15,1 1 a	20,2 2 ab	25,5 6 ab	30,6 7 ab	30,6 7 bcd
		121	13,1 1 a	25,1 1 b	31,5 6 b	34,0 0 b	34,0 0 d
	Glucose	0	3,78 a	4,89 ab	6,22 a	14,0 0 ab	14,0 0 abcd
		121	3,56 a	13,5 6 ab	16,2 2 ab	20,2 2 ab	22,6 7 bcd
4	Sacarose	0	3,78 a	5,11 a	6,44 a	9,11 a	9,11 abc
		121	5,68 a	9,08 ab	10,1 7 ab	11,2 8 ab	12,3 9 abcd
	Glucose	0	0 a	0 a	0 a	0 a	1,33 a
		121	0 a	0 a	0 a	0 a	4,00 ab

^a Valores médios de quinze repetições em cada período de avaliação, seguidas por letras semelhantes não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Nos demais períodos de cultivo verifica-se que as porcentagens de embriogênese secundária no tratamento com 2 semanas de desidratação, sacarose e com sorbitol (25,11%; 31,56%; 34%, respectivamente) foram

significativamente maiores do que as observadas no tratamento com 4 semanas de desidratação, sacarose e sem sorbitol (5,11%; 6,44% e 9,11%, respectivamente). Para as culturas mantidas em meio de cultura contendo glucose, na presença ou ausência de sorbitol, a análise estatística apenas foi possível após 16 semanas, devido ao atraso na indução da embriogênese secundária. O maior valor de embriogênese secundária ocorreu no tratamento em que as culturas foram desidratadas durante duas semanas, introduzidas no meio de cultura contendo sacarose, na presença de sorbitol e após 16 semanas de cultivo. Entretanto, esse valor não diferiu estatisticamente dos demais tratamentos, exceto dos tratamentos de 4 semanas de desidratação, com sacarose, sem sorbitol e dos tratamentos com glucose.

5.2.4. EFEITO DAS BAIXAS TEMPERATURAS SOBRE A EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA SECUNDÁRIA

Os resultados da Tabela 14 apresentam as porcentagens de embriogênese somática secundária obtidas, nos diferentes períodos de avaliação, a partir de culturas embriogênicas desidratadas submetidas aos seguintes tratamentos: 1-desidratação por 2 semanas a 25°C e manutenção a 5°C por 2 semanas antes da inoculação em meio de cultura, 2-desidratação por 2 semanas a 25°C e inoculação em meio de cultura, 3- desidratação por 2 semanas a 25°C e manutenção por mais 2 semanas a 25°C e transferência para o meio de cultura. As culturas mantidas a 25°C começaram a apresentar embriogênese somática secundária a partir da primeira semana de cultivo, enquanto que, nas culturas mantidas a 5°C a embriogênese secundária foi observada a partir da terceira semana de cultivo e nas culturas mantidas por 4 semanas a 25°C, apenas após 7 semanas de cultivo. Os valores de embriogênese somática secundária observados para as culturas mantidas por 2 semanas a 25°C foram significativamente maiores do que os demais tratamentos, em todos os períodos de avaliação, alcançando o máximo de 88,65%, na sexta semana de avaliação. As taxas de embriogênese somática secundárias observadas nas culturas mantidas a 5°C foram significativamente maiores do que as das culturas mantidas por 4 semanas a 25°C, alcançando a taxa máxima de 33,80%, na décima semana de cultivo.

Os embriões somáticos que foram desidratados por 2 semanas em temperatura ambiente e transferidos para a geladeira (5°C) por 4 semanas, congelador (0°C) e freezer (-20°C) por 2 e 4 semanas não apresentaram embriogênese secundária no período avaliado de 10 semanas.

Tabela 14: Efeito da baixa temperatura sobre a embriogênese somática secundária (%) de culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* desidratadas por duas semanas, mantidas por duas semanas a 5°C ou a 25°C e cultivadas em meio de cultura WPM suplementado com 2,73 mM de glutamina, 121 mM de sorbitol, 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativado, 2 g.L⁻¹ de Phytigel e 58,4 mM de sacarose.

Tratamentos	Períodos de avaliação (semanas) ^a				
	2	4	6	8	12
2 semanas a 25°C	45,25	67,77	88,65	88,65	88,65
		b	b	c	c
4 semanas a 25°C	0	0	0	3,44	24,20
				a	a
2 semanas a 25°C + 2 semanas a 5°C	0	9,11	19,78	31,33	33,80
		a	a	b	b

^aValores médios de quinze repetições seguidas por letras semelhantes não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

5.2.5. Efeito de Luz e Escuro sobre a embriogênese somática secundária

Na Tabela 15 estão representadas as taxas de porcentagem de embriogênese somática secundária de culturas desidratadas por duas semanas, transferidas para o meio de cultura WPM contendo 58,4 mM de sacarose ou 116,8 mM de glucose e mantidas na luz ou no escuro, após 4 e 8 semanas de avaliação. Observa-se que, no escuro, as taxas de embriogênese somática secundária obtidas, tanto em sacarose 58,4 mM como em glucose 116,8 mM, foram significativamente menores, após 4 semanas de avaliação (7,39% e 7,24%, respectivamente) e após 8 semanas de avaliação (19,84% e 47,36%, respectivamente), do que as observadas nas culturas mantidas na luz, nas mesmas concentrações de fontes de carbono (67,77% e 73,01%, respectivamente, após 4 semanas e 88,6% e 83,98%, respectivamente, após 8 semanas).

Tabela 15: Efeito de luz e escuro e diferentes fontes de carbono sobre as taxas de embriogênese somática secundária (%) de culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* desidratadas por duas semanas e cultivadas em meio de cultura WPM suplementado com 2,73 mM de glutamina, 121 mM de sorbitol, 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativado, 2 g.L⁻¹ de Phytigel e 58,4 mM de sacarose ou 116,8 mM de glucose.

Condição de luminosidade	Tipos de fontes de carbono	Concentração da fonte de carbono (mM)	Período de avaliação (semanas) ^a	
			4	8
Luz	Sacarose	58,4	67,77 b	88,6 b
	Glucose	116,8	73,01 b	83,98 b
Escuro	Sacarose	58,4	7,39 a	19,84 a
	Glucose	116,8	7,24 a	47,36 a

^a Valores médios de quinze repetições seguidas por letras semelhantes não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

5.3 CARACTERIZAÇÃO HISTOQUÍMICA DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE *Ocotea catharinensis*

Os testes histoquímicos, cujos resultados são mostrados abaixo, foram conduzidos com quatro tipos de materiais: 1- embriões secundários originados a partir de estruturas desidratadas produzidas a partir de culturas embriogênicas tipo diferenciada 2; 2- estruturas globulares produzidas a partir das culturas embriogênicas do tipo diferenciada 1; 3- estruturas cotiledonares iniciais produzidas a partir de culturas embriogênicas do tipo diferenciada 2; 4- embriões zigóticos no estágio cotiledonar maduro.

5.3.1 Teste histoquímico do Coumassie Brilliant Blue (CBB)

Quando se observa a Figura 41 como um todo é possível perceber a tendência das reações das células ao CBB se tornarem menos intensas na medida em que aumenta o nível de diferenciação das estruturas embriogênicas estudadas.

As análises citoquímicas com CBB indicam intensa reação das células dos embriões secundários no estágio globular, originados a partir das estruturas desidratadas produzidas pelas culturas embriogênicas do tipo 2, especialmente na imagem mostrada na Figura 41 C. Observa-se a presença predominante de células com citoplasma e núcleos grandes

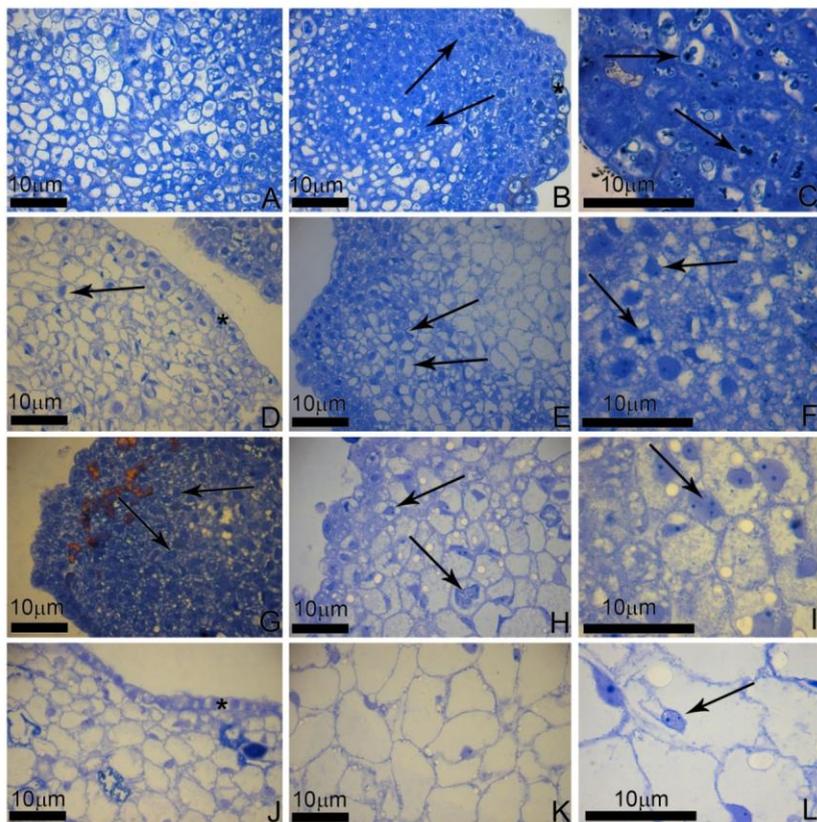
fortemente coradas pelo CBB (Figura 41 – B e C), indicando a característica meristemática dos tecidos localizados na maior parte da estrutura globular. Observa-se pela Figura 41 B, que os vacúolos das células aumentam de tamanho na medida em que se caminha para o interior da estrutura. Na Figura 41 B houve a presença de um grupo de células com as mesmas características anteriores, e um grupo mais para o interior, cujas células se assemelham mais às células da Figura 41 A. Tais, células correspondem às corticais da estrutura embriogênica desidratada, que apresentam pouco conteúdo proteico em seu citoplasma, sendo que este conteúdo está localizado mais próximo à parede celular (Figura 41 A). Estas células apresentam vacúolos que, na maior parte, ocupam grande parte das mesmas, em que as reações positivas ao CBB se restringiram às finas porções do citoplasma na região periférica celular.

Estruturas globulares tipo diferenciada 1, quando submetidas ao CBB, reagiram intensamente ao teste e é possível observar que a região mais externa da estrutura apresenta grande conteúdo proteico em seu citoplasma (Figura 41 E, F), com características parecidas com as estruturas da Figura 41 B e C, mas com algumas diferenças, pois as células que se coram intensamente e totalmente com o CBB, apresentando grandes núcleos também corados, deixam de predominar e estão restritas à periferia da estrutura enquanto que, tendem a predominar, as células vacuoladas, cujos vacúolos aumentam de tamanho nos tecidos localizados mais no interior da estrutura. Nota-se que os grandes núcleos corados das células já apresentam algum nível de vacuolização, como as mostradas na Figura 41 E, deixam de aparecer quando se observa as células do interior da estrutura. Outra diferença em relação à estrutura da Figura 41 B e C é a presença da protoderme bem organizada, com células pequenas com grande núcleo, com um ou mais nucléolos, aparentemente sem vacúolo (Figura 41 E), enquanto as células corticais apresentam núcleo parietal devido à presença de vacúolo (Figura 41 D).

As células da estruturas no estágio cotiledonar inicial produzidas pelas culturas embriogênicas do tipo diferenciada 2 reagiram ao CBB de forma parecida às descritas anteriormente, para as estruturas tipo diferenciada 1, mas é evidente o predomínio de células mais vacuoladas (Figura 41 H, I), em que a reação ao CBB parece menos intensa, com a presença de pequenas vesículas no interior das células e com núcleos bem corados, com nucléolos evidentes.

As células dos embriões somáticos no estágio cotiledonar maduro reagiram mais fracamente ao CBB, em relação às demais estruturas descritas acima, e verifica-se a presença da protoderme bem definida, com pequenas células e grandes núcleos, intensamente corados e com pouco ou nenhum vacúolo (Figura 41 J). Na região cortical, mais para o interior da estrutura, é possível observar que predominam as células que, além de maiores, apresentam grandes vacúolos, núcleo parietal, com nucléolo(s) visível(eis) e que reagiram fracamente ao CBB, apenas no citoplasma situado na região periférica das células, não possuindo muito conteúdo proteico no citoplasma.

Figura 41: Secções histológicas de estruturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* crescidas em meio WPM suplementado com 58,4 mM de sacarose, 121 mM de sorbitol, 2,73 mM de glutamina, após 4 semanas de cultivo, submetidos ao teste histoquímico com CBB. A, B, C: Embriões somáticos secundários produzidos a partir de embriões desidratados; D, E, F: Estruturas globulares de culturas embriogênicas do tipo Diferenciado1; G, H, I: Estruturas cotiledonares iniciais de culturas embriogênicas do tipo Diferenciado 2; J, K, L: Embrião somático no estágio cotiledonar maduro. Grande núcleo com nucléolos evidente (nu), corpos protéicos (setas), e a protoderme (*).



5.3.2 Teste histoquímico do Azul de Toluidina (AT-O)

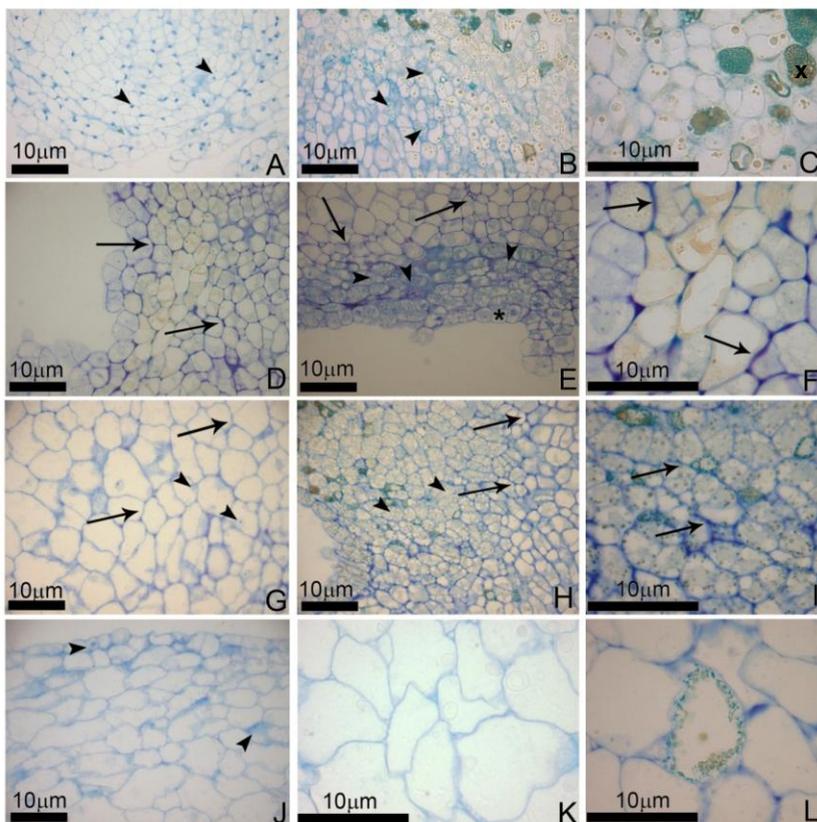
A Figura 42 B mostra dois grupos de células distintas. Um deles pertencente ao embrião somático secundário novo, regenerado a partir de estruturas embriogênicas produzidas pelas culturas embriogênicas do tipo diferenciada 2, após desidratação e cujas células reagiram ortocromaticamente ao AT-O, apresentando citoplasma levemente corado e células vacuoladas, predominantemente, entremeadas por algumas células totalmente coradas. No outro grupo de células, pertencente às estruturas embriogênicas desidratadas, onde a reação ortocromática ao AT-O foi ainda mais leve, os detalhes destas células são mostrados na Figura 42 C. Onde as células das estruturas embriogênicas desidratadas (Figura 42 C), apresentam pequenos grânulos, semelhantes aos que aparecem na Figura 42 I, nas células das estruturas produzidas pelas culturas do tipo diferenciada 2, e parecem acumular compostos não identificados.

Na Figura 42 D e E se observa as estruturas globulares produzidas pelas culturas embriogênicas do tipo diferenciada 1, que apresentam a protoderme e as células abaixo da mesma, com citoplasma denso, onde é possível notar grande acúmulo de grânulos ortocromáticos, que coraram mais intensamente com o AT-O do que as células localizadas mais no interior da estrutura, cujos detalhes são mostrados na Figura 42 E. Em todos os casos nota-se pequena reação metacromática nas paredes celulares, o que evidencia a presença de polissacarídeos ácidos.

Nas células das estruturas no estágio cotiledonar inicial, produzidas pelas culturas embriogênicas do tipo 2, observa-se uma maior vacuolização e grande quantidade de grânulos, quando submetidas à reação com AT-O (Figura 42 H, I), e semelhante às estruturas das culturas do tipo diferenciada 1, paredes celulares levemente metacromáticas (Figura 42 I), indicando a presença de pequena quantidade de polissacarídeos ácidos.

Os embriões somáticos no estágio cotiledonar maduro apresentam células maiores do que os outros tipos de estruturas, com vacúolos muito grandes, com paredes celulares ortocromáticas e quase nenhum grânulo evidenciado, quando submetido ao teste do AT-O (Figura 42 K, L). Apenas algumas células se coraram com o teste do AT-O (Figura 42 J).

Figura 42: Secções histológicas de estruturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* crescidas em meio WPM suplementado com 58,4 mM de sacarose, 121 mM de sorbitol, 2,73 mM de glutamina, após 4 semanas de cultivo, submetidos ao teste histoquímico com AT-O. A, B, C: Embriões somáticos secundários produzidos a partir de embriões desidratados. D, E, F: Estruturas globulares de culturas embriogênicas do tipo Diferenciado1. G, H, I: Estruturas cotiledonares iniciais de culturas embriogênicas do tipo Diferenciado 2. J, K, L: Embrião somático no estágio cotiledonar maduro. Paredes celulares com leve reação metacromática (setas) em estruturas globulares/cotiledonares de culturas embriogênicas dos tipos diferenciado 1 e diferenciado 2 (A, B, C, D, E, F). Grânulos ortocromáticos (pontas de seta), destacando a protoderme (*) e células que sofreram degradação no processo de desidratação ou que acumulam algum tipo de composto (x).



5.3.3 Teste histoquímico do PAS

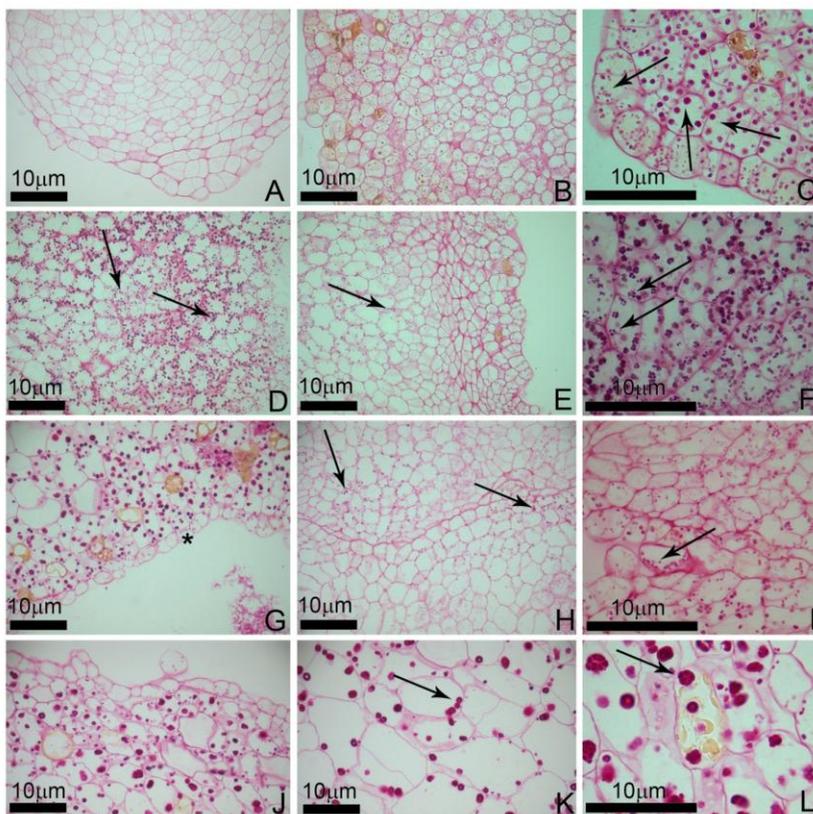
As células dos embriões secundários no estágio globular, originados a partir das estruturas desidratadas produzidas pelas culturas embriogênicas do tipo 2, reagiram ao PAS apresentando parede celular corada positivamente, o que indica presença polissacarídeos neutros, como celulose, e a presença de grânulos de amido, que são mais raros nos tecidos mais internos da estrutura (Figura 43 B), diferente do encontrado nas células mais periféricas do novo embrião secundário (Figura 43 A), onde não foi observado grânulos corados. Nas células das estruturas desidratadas observa-se a presença de grânulos de amido apenas em algumas regiões da estrutura, sendo que os grânulos de amido se apresentam menores na protoderme, e maiores na região cortical do embrião (Figura 43 C).

Quando as estruturas produzidas pelas culturas embriogênicas do tipo DF 1 foram submetidas à reação com PAS, apresentaram reação positiva nas paredes celulares e grande quantidade de grânulos de amido, grânulos estes que, como nas estruturas acima, não se distribuem uniformemente ao longo do embrião (Figura 43 D, E). Além disto, é possível notar que os mesmos se organizam em pequenos agregados na região cortical da estrutura embriogênica (Figura 43 F).

O mesmo padrão de distribuição do amido foi observado nas estruturas das culturas embriogênicas do tipo DF 2, quando submetidas ao teste do PAS, que apresentaram parede celular corada positivamente, e numerosos grânulos de amido de diversos tamanhos, distribuídos por todo o citoplasma nas células mais externas do embrião, e mais próximas a parede celular, nas células da região cortical, devido à maior vacuolização das células (Figura 43 G, H, I).

Da mesma forma, os embriões somáticos no estágio cotiledonar maduro, quando corados com o PAS, apresentaram grânulos de amido muito pequenos na protoderme e grandes grânulos na região cortical, que se organizam de forma agrupada (Figura 43 J, K, L). As células da protoderme das estruturas originadas dos demais tipos de cultura também seguiram este padrão, apresentando poucos grãos de amido.

Figura 43: Secções histológicas de estruturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* crescidas em meio WPM suplementado com 58,4 mM de sacarose, 121 mM de sorbitol, 2,73 mM de glutamina, após 4 semanas de cultivo, submetidos ao teste histoquímico com PAS. A, B, C: Embriões somáticos secundários produzidos a partir de embriões desidratados; D, E, F: Estruturas globulares de culturas embriogênicas do tipo Diferenciado1; G, H, I: Estruturas cotiledonares iniciais de culturas embriogênicas do tipo Diferenciado 2; J, K, L: Embrião somático no estágio cotiledonar maduro. Grânulos de amido corados positivamente (setas), destaque para a protoderme em embriões diferenciado 2 (*).



6. DISCUSSÃO

6.1. CRESCIMENTO E ANÁLISES BIOQUÍMICAS DE CULTURAS EMBRIOGÊNICAS DE *Ocotea catharinensis*

O crescimento das culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* do tipo diferenciada 2 foi avaliado segundo a metodologia das curvas de dissimilação, proposta por Schripsema (1990). A dissimilação de carboidratos causa uma perda de peso da cultura, por ser um método não invasivo e não destrutivo permite determinar em tempo real o padrão de crescimento das culturas selecionadas, baseado no fato de que apenas uma parte dos carboidratos é convertida em biomassa, enquanto que a outra parte é dissimilada para o suprimento de energia, em que o consumo de O₂ durante o processo de respiração celular, gera CO₂ e água. Neste processo, quantidades equimolares de CO₂ são trocadas por O₂, pelas células, gerando a perda de massa no tubo de cultura.

O crescimento celular se baseia nas mudanças das taxas de divisão em fases bem definidas. Inicialmente as células dividem-se lentamente (fase lag), posteriormente ocorrem fases de rápido crescimento (exponencial e linear) e por fim, as células tendem a taxas menores de divisão (fase estacionária) (Street, 1977). As culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* quando na suplementada com sacarose, conforme a análise da curva de dissimilação, apresentou um crescimento linear, apresentando uma dissimilação três vezes maior ao final de 29 dias do que no meio de cultura suplementado com glucose aos 17, sendo que, quando houve a substituição da concentração de 58,4 mM de sacarose para 116,8 mM de glucose, o padrão de crescimento foi modificado, o meio de cultura contendo glucose apresentou mais de um padrão de crescimento, representado pelas diferentes curvas de dissimilação obtidas para o mesmo meio de cultura; no entanto, o valor final de dissimilação foi o mesmo.

A ausência da fase lag já foi relatada anteriormente em culturas embriogênicas e de agregados celulares de *Ocotea catharinensis* (Olmedo, 2005; Garcia, 2005), onde as culturas apresentam um modelo tipicamente exponencial de crescimento durante todo o período de avaliação, no entanto, diferente do ocorrido no presente estudo, com ausência de fase estacionária. O padrão linear de crescimento, com ausência de fase estacionária, comumente observado para cultivos

celulares em meio semi-sólido, foi mostrado também para os cultivos de *Ocotea odorifera* (OLTRAMARI, 2002).

Para que a sacarose seja metabolizada, é necessário que as células das culturas embriogênicas absorvam as moléculas de sacarose do meio de cultura, produzam as invertases, capazes de quebrar a molécula e originar moléculas de D-glucose e de D-frutose, que serão então utilizadas, respectivamente, pelas enzimas hexoquinase e frutoquinase, e transformadas em moléculas de glucose-6-fosfato e de frutose-6-fosfato, para posterior processamento na via glicolítica. As moléculas de glucose-6-fosfato são então, na sequência, transformadas também em moléculas de frutose-6-fosfato, através da enzima fosfohexoisomerase. A outra via de metabolização possível da glucose seria a via da pentosefosfato, que utiliza a glucose-6-fosfato para conversão em moléculas de açúcares de 5 carbonos (Taiz & Zeiger, 2004).

Quando se ministra apenas a glucose ao meio de cultura, portanto, para que esta molécula seja metabolizada, viabilizando o crescimento celular, é necessário que existam nas células duas enzimas ativas, para transformá-la em glucose-6-fosfato, na primeira reação e esta em frutose-6-fosfato, na segunda reação para, a partir daí, a molécula seguir o fluxo da via glicolítica e Ciclo de Krebs, em que outras enzimas serão necessárias. Isto pode explicar a fase *lag* no crescimento das culturas embriogênicas, observada na presença desta fonte de carbono, assim como as taxas de dissimilação mais baixas do que as observadas na presença de sacarose. Uma hipótese é que, com a ministração da sacarose, a metabolização mais rápida da frutose, liberada pela quebra da molécula de sacarose, que necessita da ação de apenas uma enzima para ser transformada em frutose-6-fosfato e seguir o fluxo da via glicolítica, faz com que a geração de energia para o crescimento das células, via Ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa seja mais rapidamente viabilizada do que a partir da glucose e seja responsável pela dissimilação total maior na presença de sacarose.

Outro fator que poderia estar contribuindo para diminuir as taxas de dissimilação das culturas embriogênicas, na presença de glucose, seria a possível diminuição do potencial osmótico do meio de cultura, que poderia tornar o crescimento das culturas mais lento, pois nestes experimentos foi utilizada a concentração de 116,8 mM de glucose, enquanto que no experimento com sacarose, foi utilizada a concentração de 58,4 mM. O próprio aumento do potencial osmótico do meio de cultura, causado pela adição da alta concentração da glucose,

poderia estar dificultando a absorção de água e, conseqüentemente, de nutrientes pelas culturas, retardando o crescimento e diminuindo as taxas de dissimilação.

O fato de terem sido observados padrões diferentes de dissimilação das culturas embriogênicas com a mesma concentração de glucose, em dois experimentos independentes, pode ser devido à heterogeneidade das culturas embriogênicas utilizadas. É possível que as culturas utilizadas apresentassem perfis de composição de estruturas embriogênicas distintas, com perfis metabólicos e de crescimento também diferentes, já que o sistema embriogênico desenvolvido para *Ocotea catharinensis* não é sincronizado. Como observado nos estudos histoquímicos, nas culturas do tipo diferenciada 2 predominam estruturas com um certo nível de diferenciação, mas ainda com alta atividade mitótica, outrossim as análises bioquímicas revelaram que estas culturas apresentaram a maior concentração de carotenóides, o que automaticamente requer grande demanda de energia e de esqueletos de carbono, que é suprida pelo metabolismo dos carboidratos presentes no meio de cultura. Porém, a heterogeneidade na composição poderia fazer com que estivessem presentes estruturas, com outros níveis de diferenciação, que não necessariamente estivessem demandando o mesmo nível de energia para manutenção do seu metabolismo.

As culturas embriogênicas de *O. catharinensis* foram subcultivadas durante a sua fase de crescimento exponencial, entre a terceira e quarta semanas de cultivo, mostrando melhor crescimento. O fato de as culturas estarem estabelecidas em meio suplementado com sacarose, há várias gerações, pode ter influenciado o padrão das curvas de dissimilação, pois as culturas embriogênicas transferidas para um meio de cultura, com uma fonte de carbono diferente, passam por um período de adaptação em que o seu metabolismo necessita ser reajustado às novas condições. Culturas de *Picea glauca-engelmannii* e *P. mariana* também demonstraram a necessidade de serem subcultivadas, durante a fase de crescimento exponencial, o que possibilitou condições de cultura mais estáveis (Lulsdorf *et al.*, 1992).

Durante a maturação de sementes *in vivo* ocorre uma série de mudanças morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, tanto no fruto quanto na semente, como o aumento de tamanho, do vigor e da germinação, variação no teor de água, acúmulo de biomassa seca (Barros, 1986; Carvalho & Nakagawa, 2000). Também diversos compostos orgânicos solúveis, como açúcares, ácidos graxos e aminoácidos são convertidos a compostos de maior complexidade

estrutural química como carboidratos, gorduras e proteínas, que se acumulam principalmente nas células do endosperma e/ou cotilédones. Além disto, pequenas quantidades de alcalóides, taninos, glucosídeos, óleos essenciais, vitaminas, enzimas, reguladores de crescimento e alguns pigmentos como antocianinas e carotenos são acumulados nos diversos tecidos da semente (Liberal & Coelho, 1980; Mayer & Polyjakoff-Mayer, 1963).

Pouco se tem pesquisado sobre a presença de carotenóides em embriões somáticos, porém, foi possível observar, no presente trabalho, a maior concentração de carotenóides nas culturas embriogênicas do tipo diferenciada 2, assim como uma alta inibição do radical DPPH pelos extratos destas culturas, o que pode ser uma indicação do possível envolvimento dos carotenóides na atividade antioxidante das mesmas. As diferenças nas concentrações de carotenóides detectadas, entre os tipos de cultura embriogênicas estudadas neste trabalho e nos embriões somáticos no estágio cotiledonar maduro indicam diferenças no metabolismo dos diferentes tipos de culturas embriogênicas estudadas e do embrião somático no estágio cotiledonar maduro. Os carotenóides foram acumulados em menor quantidade, nas culturas embriogênicas do tipo friável, seguido pelas culturas do tipo diferenciada 1, que apresentaram níveis semelhantes aos embriões somáticos no estágio cotiledonar maduro, em que esta concentração diminuiu.

As concentrações de carotenóides nas culturas embriogênicas do tipo diferenciada 2 se mantiveram altas e constantes a partir da terceira semana de cultivo, permanecendo no mesmo nível, até o início da senescência das culturas. Foi observado então que na segunda semana, a concentração de carotenóides foi próxima a zero, mas nos períodos em que as culturas estiveram em crescimento exponencial, com condições ótimas, que foram a terceira e quarta semanas, as concentrações se mantiveram estáveis. A presença de carotenóides pode estar relacionada à fotoproteção destes embriões, que apesar de estarem *in vitro*, estavam sendo submetidos à fotoperíodos de 16 horas de luz. A avaliação das quantidades de carotenóides nas culturas mantidas no escuro poderia confirmar ou não esta hipótese. Já, no início da senescência, na sexta semana de cultivo, essa concentração diminuiu. Apesar da possibilidade da conversão dos carotenóides em compostos aromáticos, foi observado apenas um pico na região compostos aromáticos (FT-IR), tornando mais aceitável que essa diminuição na concentração se deveu à depleção de nutrientes no meio de cultura.

A degradação de carotenóides é considerada chave na formação de muitos compostos aromáticos em plantas, mas a natureza dos mecanismos bioquímicos, enzimáticos ou não enzimáticos, mediante as degradações oxidativas, ainda não estão bem elucidadas (Lewinsohn *et al.*, 2005). Dois tipos de enzimas são responsáveis pela oxigenação e degradação dos carotenóides, as lipoxigenases, advindas dos cloroplastos, responsáveis por catalisar a conversão de lipídios insaturados em compostos de aroma em plantas, e as peroxidases, da mitocôndria, ambas necessitam de oxigênio molecular e cofatores para suas atividades. Estas oxigenações envolvem a clivagem das ligações C (9-10), (8-9), (7-8) e (6-7) para gerar compostos cíclicos com 13, 11, 10 e 9 carbonos, respectivamente (Weeks, 1986). Quando observados os espectros de FT-IR, é possível notar a presença de compostos aromáticos nos embriões somáticos no estágio cotiledonar maduro, que podem ter sido originados a partir da degradação dos carotenóides produzidos na fase cotiledonar inicial, o que explicaria a diminuição destes compostos nos embriões somáticos em estágio mais diferenciado.

O fato das maiores concentrações de carotenóides nas culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* do tipo 2 serem observadas nos meios de cultura contendo 58,4 mM de sacarose, na presença ou ausência de glutamina, e não dos tratamentos em que foram utilizadas concentrações maiores de sacarose pode ter sido devido ao possível efeito das altas concentrações dos açúcares sobre a diminuição do potencial osmótico do meio de cultura. Segundo Fernandes (2005), são múltiplos os causadores de estresse em plantas, afetando o crescimento, o desenvolvimento e a produção das culturas, nas situações adversas, a planta desvia parte de seu metabolismo para se adaptar ou sobreviver ao fator limitante. O aumento da concentração de sacarose de 58,4 mM para 87,6 mM no meio de cultura, fez com que a quantidade de carotenóides diminuísse drasticamente, aparentemente inibindo a biossíntese, principalmente quando na presença de glutamina. O aumento da concentração de sacarose no meio de cultura aumenta o estresse hídrico, através da diminuição do potencial osmótico do meio de cultura (Ferreira, 1988). A diminuição do potencial osmótico do meio de cultura pode ter dificultado a absorção de água e nutrientes, causando uma situação de estresse hídrico, dificultando a biossíntese de compostos pelas culturas. Isto explicaria a diminuição das concentrações de carotenóides nos tratamentos em que foram utilizadas maiores concentrações de sacarose em relação à concentração de 58,4 mM, mas não explicaria o porquê das culturas crescidas com 116,8 mM de

sacarose na presença ou ausência de glutamina, apresentarem concentrações de carotenóides maiores do que as observadas com 87,6 mM.

Os carotenóides incluem os carotenos e as xantofilas e são moléculas que demandam grande quantidade de átomos de carbono para serem construídas, o que pode justificar a alta taxa de dissimilação discutida anteriormente, para este tipo de cultura embriogênica, no meio de cultura contendo sacarose. O fornecimento, portanto, de concentrações crescentes de sacarose poderia contribuir para suprir a demanda de átomos de carbono para a biossíntese destes compostos. Por outro lado, o fornecimento de glutamina poderia significar o aumento do aporte de nitrogênio, para a formação de aminoácidos e de proteínas, muitas delas enzimas, que poderiam otimizar os mecanismos de biossíntese. Assim, poderíamos esperar que um aporte maior de átomos de carbono, pelas concentrações crescentes de sacarose, e de nitrogênio, através do fornecimento de glutamina, poderiam otimizar a produção dos carotenóides, mas isto aconteceu apenas na concentração de 58,4 mM de sacarose e não nas demais concentrações. E na concentração de 87,6 mM a glutamina inibiu a produção dos carotenóides, sendo possível que nesta concentração específica, sejam ativadas outras rotas metabólicas, que não a de biossíntese de carotenóides, que estejam consumindo os átomos de carbono fornecidos no meio de cultura.

Os níveis de carotenóides, detectados nos tratamentos com 116,8 mM de sacarose, foram semelhantes aos encontrados nos meios de cultura contendo glucose como fonte de carbono, em que foi possível observar que, não houve diferença entre os tratamentos, indicando que, a biossíntese dos carotenóides não foi influenciada pelas concentrações de glucose e/ou pela adição de glutamina. O fato das concentrações de carotenóides nos meios de cultura contendo glucose terem sido menores do que as observadas com 58,4 mM de sacarose é um indicativo de que a rota de biossíntese destes compostos pode ser otimizada através da manipulação das fontes de carbono, além de indicar a maior eficiência da sacarose no processo. Isto talvez pelo fato das células das culturas embriogênicas do tipo diferenciada 2 não apresentarem sistemas de enzimas eficientes para metabolizar as moléculas de glucose.

Vários autores citam que o estresse salino leva a um incremento na atividade das enzimas glutamina sintase (Roosens *et al.*, 1998; Viéga & Silveira, 1999) e glutamato sintase (Berteli, 1995), envolvidas na assimilação do íon amônio. Neste caso, a glutamina fornecida no meio

de cultura também poderia ser utilizada para aumentar a produção de moléculas de glutamato, para assimilar mais íons amônio do meio de cultura, desta forma, potencializando ainda mais a biossíntese de glutamina pelas células. Mas a síntese de glutamato também depende de um precursor do Ciclo de Krebs, o α -cetoglutarato, cujo aporte depende do ótimo metabolismo das fontes de carbono pela via glicolítica. A capacidade de incorporar íon amônio em condições de estresse seja osmótico (Flores e Galston, 1982), salino (Lovatt, 1990) ou nutricional (Rabe e Lovatt, 1986) pode representar um mecanismo homeostático importante frente a condições de estresse em vegetais (Camara *et al.*, 2000). Quando a planta é fotossinteticamente ativa, a resposta ao estresse oxidativo se dá pelo aumento nas concentrações de carotenóides (Simão, 2010). No entanto, muito pouco se sabe sobre como ocorre a síntese e acúmulo de carotenóides em culturas embriogênicas, sendo necessário conduzir novas investigações sobre os efeitos das concentrações de sacarose sobre os mecanismos de promoção e inibição da biossíntese de carotenóides.

Segundo Viana e Mantell (1999), a presença de compostos fenólicos em culturas *in vitro* pode causar o escurecimento do meio de cultura, e associado à depleção dos nutrientes, leva a oxidação e início do processo de senescência celular. A investigação sobre a produção de compostos fenólicos pelas culturas embriogênicas é a etapa inicial da investigação sobre o potencial de utilização deste sistema para posterior utilização, já que são várias as atividades biológicas destes compostos, como a prevenção de doenças crônico-degenerativas (Torres *et al.*, 1987). A capacidade redutora desses compostos pode ser uma das propriedades utilizadas para justificar a quantificação inicial (Antolovich *et al.* 2000), além de que alguns compostos fenólicos apresentam atividade antifúngica e/ou antimicrobiana (Conner, 1993).

Os tipos de cultura embriogênicas de *Ocotea catharinensis* estudadas neste trabalho apresentaram diferentes concentrações de compostos fenólicos, sendo crescentes, de acordo com o nível de diferenciação, mas menores que os níveis apresentados pelos embriões somáticos no estágio cotiledonar maduro. Olmedo (2005) afirma que os compostos fenólicos liberados no meio de cultura podem atuar como promotores de embriogênese repetitiva, na ausência de reguladores de crescimento. Os compostos fenólicos também estão envolvidos na regulação do crescimento, organogênese e controle da dormência, acreditando-se que atuem na diferenciação reduzindo a plasticidade da parede celular (Cvikrová *et al.*, 1998). Foi possível observar que, ao

longo das semanas de cultivo a concentração média dos compostos fenólicos manteve-se constante, diferente do que foi relatado por Olmedo (2005) e Viana & Mantell (1999), que relataram o aumento nas concentrações de compostos fenólicos ao longo das semanas de cultivo, alcançando seu máximo na quarta semana. Esta diferença pode estar relacionada ao fato dos perfis metabólicos e de diferenciação das culturas estudadas no presente trabalho serem diferentes nas culturas testadas anteriormente e de serem cultivadas em meio de cultura contendo carvão ativo.

O fato da maior concentração de compostos fenólicos ter sido detectada na concentração de 58,4 mM, na presença de glutamina e de haver uma diminuição na concentração média de compostos fenólicos nas concentrações de sacarose maiores é um indicativo de, assim como no caso dos carotenóides, estar havendo uma influência das concentrações de sacarose no potencial osmótico do meio de cultura, o que indiretamente estaria afetando o metabolismo secundário. A promoção da biossíntese de fenólicos, através da adição da glutamina, poderia ser explicada pelo fato desta molécula ser precursora do glutamato, disponibilizando uma quantidade maior destas moléculas, para assimilar os íons amônio do meio de cultura em mais compostos orgânicos nitrogenados, além de que, poderia ser utilizada diretamente, pelas transaminases como moléculas doadoras de nitrogênio para a síntese de ácidos nucléicos e especialmente de aminoácidos, que poderiam ser utilizados na otimização da biossíntese de enzimas do metabolismo secundário para a produção de compostos fenólicos.

Nas concentrações mais altas de sacarose, a adição de glutamina poderia inibir as rotas de biossíntese de fenólicos ou promover, alguma outra via metabólica, desviando os átomos de carbono para síntese de outras moléculas, da mesma forma como observado para os carotenóides, uma vez que as vias metabólicas são interdependentes e a modificação em uma das vias pode ocasionar a mudança por completo no metabolismo da cultura (Pratelli & Pilot, 2007; Kissen *et al.*, 2010).

O fato das culturas embriogênicas, crescidas com glucose, apresentarem um padrão diferente das crescidas com sacarose, apresentando maiores concentrações de compostos fenólicos com 58,4 mM e com 116,8 mM, na ausência de glutamina, indica que as fontes de carbono podem interferir no perfil metabólico das culturas, no que se refere à produção de fenólicos. Neste caso, o possível estresse osmótico, causado pela alta concentração de glucose, pode não ter sido responsável pela resposta observada, mas também é possível que, as

diferentes concentrações de glicose fornecidas estejam promovendo a biossíntese de fenólicos através de mecanismos diferentes, ou desencadeiem nas células algum mecanismo metabólico de evitar a inibição da biossíntese verificada nos demais tratamentos. É importante notar que as concentrações de compostos fenólicos, em ambas as concentrações de glicose, foram similares, apenas não foi verificada a inibição ocorrida nos outros tratamentos. As culturas crescidas com 87,6 mM de glicose e glutamina além de apresentarem a menor concentração de compostos fenólicos, foram as que apresentaram menor frequência de embriogênese secundária. Outros fatores devem ser avaliados nesta concentração de glicose para que seja possível elucidar a razão da baixa produção de compostos fenólicos.

Quando houve a variação das fontes de açúcar álcool e nitrogênio as concentrações médias de compostos fenólicos mantiveram-se semelhantes entre si, sendo que somente o meio contendo glutamina e sorbitol apresentou diferença. Este resultado poderia ser explicado pela influência do sorbitol em causar certo nível de estresse osmótico nas células, já que é um agente osmótico. É interessante notar que, neste caso, a resposta foi potencializada pela glutamina.

A maior porcentagem de inibição do radical livre DPPH• de culturas embriogênicas do tipo 2, que indica maior atividade antioxidante foi detectada na quarta semana de cultivo, coincidindo com as maiores concentrações de carotenóides nas culturas e alta concentração de compostos fenólicos. Os compostos fenólicos são potentes antioxidantes, o que se deve principalmente à sua estrutura química e suas propriedades redutoras. Estas características fazem com que desempenhem um papel importante na neutralização ou sequestro dos radicais livres, agindo no oxigênio singleto, atuando nas oxidações lipídicas, e quelação de metais de transição (Sauté-Garcia *et al.*, 1997; Hopia & Heinonem, 1999), agindo tanto na etapa de iniciação como na desenvolvimento do processo oxidativo (Soares, 2002; Haslam, 1996; Chun *et al.*, 2005). Estudos apontam também a capacidade antioxidante dos carotenóides, que são constituídos de cadeias de polienos, em um longo sistema de duplas ligações conjugadas, rico em elétrons, responsável pela atividade antioxidante, tanto na absorção do oxigênio singleto, quanto de radicais livres, interrompendo as reações em cadeia em que estes estão envolvidos (McNulty, *et al.*, 2007; Quirós & Costa, 2006; Sikora *et al.*, 2008).

Quando avaliada a atividade antioxidante entre as culturas embriogênicas de *O. catharinensis* estudadas, foi possível observar uma fraca correlação negativa entre a concentração de compostos fenólicos e a inibição do radical livre DPPH•. As culturas embriogênicas do tipo friável foi a que apresentou a maior porcentagem de inibição, entretanto, as concentrações de compostos fenólicos e de carotenóides nestas culturas foram muito baixas. Há, portanto, a necessidade de investigações mais aprofundadas, nestas culturas, sobre a razão da atividade antioxidante tão pronunciada. Um aspecto importante, observado nestas culturas, é que demoram mais para entrar em senescência em relação aos outros tipos de cultura estudados. Um outro resultado interessante foi o fato das culturas embriogênicas do tipo diferenciada 2 apresentarem atividade antioxidante e alta concentração de carotenóides. No entanto, a porcentagem de inibição do radical DPPH• foi metade da inibição observada para o tipo de cultura friável.

No presente trabalho, os espectros de FT-IR serviram como forma de complementar as investigações metabólicas, realizadas com compostos fenólicos e carotenóides, fornecendo também dados que podem ser aproveitados em investigações futuras, quanto à caracterização do metabolismo das culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis*, sendo possível identificar a ocorrência de diferentes grupos funcionais que constituem moléculas do metabolismo primário e secundário (Pilatti, 2011). A comparação do perfil metabólico se deu pela sobreposição dos espectros e análises quimiométrica.

As culturas embriogênicas do tipo diferenciada 2 apresentaram maior número de picos de transmitância na região de 1300-1000 cm^{-1} , que identificam ligações encontradas em moléculas de amido, sacarose, celulose e terpenos, o que explicaria o valor mais elevado na concentração de carotenóides. Já os embriões somáticos no estágio cotiledonar maduro apresentaram picos em 1600-1400 cm^{-1} , que identificam as ligações C=C, C=O, referentes às amidas primárias, da estrutura de proteínas, lipídeos, terpenos e compostos aromáticos, que podem ser advindos da metabolização dos carotenóides, como discutido anteriormente. As culturas do tipo friável apresentaram picos de transmitância na região de 2850, 1735, 1626, 1225 cm^{-1} , não observados nas outras culturas ou nos embriões somáticos no estágio cotiledonar maduro. A região de 2850 cm^{-1} se refere às ligações C-H alifáticas CH_2 e CH_3 (carbono primário/secundário), 1740-1720 cm^{-1} C=O (aldeído), 1630 cm^{-1} C=N, 1225 cm^{-1} C-N alifática. Estes resultados indicam a eficiência da espectroscopia vibracional de infravermelho médio por

transformada de Fourier (FT-IR) na caracterização metabólica dos tipos de culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* e de embriões somáticos, fornecendo dados prévios para o direcionamento e realização de novas investigações quanto o metabolismo primário e secundário desta espécie.

Já a análise dos espectros referentes aos experimentos em que foram manipuladas as concentrações de sacarose, o tratamento com 87,6 mM sacarose sem glutamina, revelou picos na região de $800-600\text{ cm}^{-1}$, referentes à presença de compostos halogenados (C-Cl), e picos referentes à ligação C=C (aromáticos), que podem de alguma forma estar influenciando no metabolismo primário e secundário das culturas, que pode ser observado pela inibição da síntese de carotenóides nas culturas. Nas culturas com glucose, os picos de transmitância de todas as concentrações e combinações se apresentaram semelhantes, o que não justificaria as baixas concentrações de compostos fenólicos nas culturas contendo 87,6 mM de glucose e glutamina.

Apesar do fato de a maioria dos espectros apresentarem picos nas mesmas regiões de comprimento de onda, o ponto exato onde ocorreram a formação de alguns picos diferiu entre os tratamentos, indicando diferenças de nível quali-quantitativo, apesar de possuírem constituições muito parecidas. O *fingerprinting* se baseia na idéia de que a composição molecular de uma substância ou mistura complexa, como é o caso do material celular vegetal, produz um perfil espectroscópico único, que permite a sua caracterização e identificação. A habilidade de monitorar rápida e simultaneamente vários componentes torna este método ideal para selecionar espécies e linhagens de células de interesse, além de acompanhar a produção de metabólitos ao longo do cultivo (Schulz & Baranska, 2007).

A espectrofotometria de varredura UV-Vis é mais uma ferramenta útil para a identificação de das classes de compostos secundários majoritários nos diferentes tipos de culturas embriogênicas de *O. catharinensis*. O uso da análise de componentes principais (PCAs), tornou mais visível as similaridades entre os tipos de cultura estudadas, tempos de cultivo e formulações do meio de cultura, confirmando os resultados obtidos anteriormente, ou auxiliando no direcionamento das análises de quantificação de metabólitos que não foram investigados. O emprego desta ferramenta se mostrou eficiente na visualização das diferenças entre os tipos de culturas embriogênicas analisadas. Em todos os casos, os espectros obtidos na região onde ocorreu a absorção de luz UV por compostos fenólicos, 280-400nm

(Harborne, 1998), corroboraram com os resultados obtidos na avaliação da concentração de compostos fenólicos, discutida anteriormente.

6.2 EFEITO DA DESIDRATAÇÃO, CONDIÇÕES DE CULTIVO E FORMULAÇÕES DOS MEIOS DE CULTURA, SOBRE A EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA SECUNDÁRIA DE *Ocotea catharinensis*

A embriogênese somática secundária é um processo de extrema importância para viabilizar a disponibilidade constante de culturas embriogênicas, desenvolvimento de experimentos, otimização dos estudos sobre as fases da embriogênese somática, sobre conservação *in vitro* de germoplasma, análises de metabólitos secundários, proteômica e genômica. Isto porque, para muitas espécies, como é o caso da *Ocotea catharinensis*, que apresenta dificuldade na produção e manutenção da viabilidade das sementes, ter que iniciar culturas embriogênicas a partir de embriões zigóticos tornaria os estudos demorados ou até mesmo inviáveis.

Os resultados obtidos a partir dos estudos conduzidos, para verificar o efeito do tempo de desidratação sobre a embriogênese somática secundária das culturas embriogênicas do tipo diferenciada 2 de *Ocotea catharinensis* indicaram que houve relação entre a manutenção do potencial de embriogênese secundária e o nível de desidratação dos tecidos, sendo que tanto as porcentagens finais de culturas com embriogênese secundária como o estabelecimento inicial do processo foram influenciados pelo nível de água nas células. Mesmo com 3-4 semanas de desidratação, quando os níveis de desidratação das culturas caíram de 3,0 para 0,2 mg H₂O. mg MS⁻¹, que é uma redução bastante significativa em relação ao valor inicial de 9,5 mg H₂O. mg MS⁻¹, foi possível obter um nível de resposta, em termos de embriogênese secundária. A tolerância das células a estes níveis de desidratação indicam que esta abordagem, de baixo custo, pode ser adotada para armazenamento das culturas por curtos períodos de tempo, quando as repicagens a cada 3 semanas não forem possíveis. Outro aspecto importante é que os níveis de desidratação verificados, também podem servir de base para o desenvolvimento de protocolos de criopreservação e conservação de germoplasma por longos períodos, uma vez que a desidratação pode funcionar como um crioprotetor para tornar as células resistentes à exposição ao nitrogênio líquido.

A tolerância à dessecação se refere à capacidade de sobreviver à desidratação, ou seja, a perda da camada de hidratação das moléculas

gradualmente, incluindo também a capacidade das células de reidratar com sucesso. Na natureza, a capacidade de sobrevivência com pouca, ou nenhuma água, tem a função de garantir a sobrevivência a períodos de condições adversas (Hoekstra *et al.*, 2001). Além disso, a desidratação é um requerimento para a maturação de muitas espécies, durante a maturação, as sementes podem reduzir o seu conteúdo de água de 5 a 10% da sua matéria fresca (Ooms *et al.*, 1994). Quando desidratados por uma semana, os embriões somáticos que reduziram cerca de 6% do seu teor de água, o que resultou em 100% de embriogênese secundária. As culturas desidratadas por 2 e 3 semanas reduziram em média 17% do teor de água em relação ao material fresco, este período de desidratação apresentou os melhores resultados quanto à formação de novos embriões somáticos, além de uma maior frequência de embriões nos estágios cotiledonar inicial e maduro, após 4 semanas de cultivo.

O mecanismo de tolerância à dessecação pode estar ligado, através da desidratação, ao do ácido abscísico (Ingram & Bartels, 1996; Bartels *et al.*, 1997). Em sementes ortodoxas, a expressão do gene associado com a tolerância à dessecação ocorre como parte do processo de maturação. Como resultado, os embriões tornam-se tolerantes à dessecação, consideravelmente, antes da secagem durante a maturação. A diminuição no teor de água é causada pelo acúmulo gradual de matéria seca (Barlow, 1980). Segundo Bewley e Black (1994), nas sementes em maturação de muitas espécies, as concentrações de certos açúcares e oligossacarídeos aumentam em associação com a indução à tolerância à desidratação. Após a perda de água, a diminuição do volume celular provoca aglomeração de componentes citoplasmáticos e o conteúdo celular se torna mais viscoso, aumentando a chance de interações moleculares que podem causar a desnaturação de proteínas e fusão de membranas. Uma série de compostos, que podem evitar tais interações moleculares adversas, foi identificada, entre eles a prolina, glutamato, glicina betaína, carnitina, manitol, sorbitol, frutanos, polióis, trealose, sacarose e oligossacarídeos. Embora sejam quimicamente diferentes, estes compostos são preferencialmente excluídos da superfície das proteínas, mantendo assim as proteínas hidratadas (Arakawa, 1991; Xie & Timasheff, 1997).

A utilização de embriões somáticos, cultivados em meio de cultura suplementado com sorbitol, para a posterior desidratação, pode estar relacionada à capacidade destes embriões de tolerarem a desidratação, por períodos de até quatro semanas, de se reidratar com

sucesso, formando novos embriões somáticos. Segundo Viana (1998), a suplementação do meio de cultura com agentes osmóticos pode provocar desidratação dos embriões somáticos e no caso de *O. catharinensis*, o nível de sorbitol utilizado, pode desencadear rotas que iniciam a indução da tolerância à desidratação nos embriões.

O fato do potencial de embriogênese secundária das culturas variarem de acordo com as fontes de carbono, e para uma mesma fonte de carbono, de acordo com a concentração utilizada, é um reflexo dos diferentes níveis de eficiência das culturas para processar estes carboidratos, comprovado e discutido anteriormente a partir das diferenças detectadas nos perfis metabólicos das culturas embriogênicas do mesmo tipo, não desidratadas, crescidas na presença das mesmas fontes de carbono. A frutose, por exemplo, parece não ter sido metabolizada com eficiência pelas culturas embriogênicas em comparação com a glicose e sacarose, e mesmo nos casos destas fontes de carbono, as concentrações ótimas para a indução do processo de embriogênese secundária também variaram (116,8 mM para a glicose, 58 mM e 87,6 mM para a sacarose), indicando diferenças específicas para cada tipo de carboidrato utilizado. Estes resultados sugerem que investigações mais aprofundadas sobre a elucidação dos mecanismos de assimilação e metabolismo destas moléculas devem ser conduzidos para explicar estes resultados e servirem de base para a otimização do sistema de embriogênese secundária de *Ocotea catharinensis*. O fato da concentração de 116,8 mM de sacarose ter induzido um baixo percentual de culturas com embriogênese secundária pode ter sido devido ao possível efeito osmótico no meio de cultura.

Uma observação interessante foi que na presença de 116,8 mM de glicose, já na segunda semana de cultivo, 60% das culturas já apresentavam embriogênese secundária, enquanto que com sacarose 58,4 mM, apenas 40% das mesmas iniciaram o processo, sugerindo que o mesmo pareceu acontecer mais rapidamente no meio de cultura contendo a glicose. Como não foram realizadas as curvas de dissimilação das culturas em embriogênese secundária, iniciadas a partir de estruturas desidratadas, não foi possível saber como seriam as dissimilações de tais culturas, mas supondo-se que fossem as mesmas obtidas para as culturas frescas, poderíamos inferir que o fato da dissimilação ser mais lenta com glicose, não estaria retardando o processo de embriogênese secundária, pelo contrário, estaria estimulando a indução mais rápida do mesmo.

Segundo Han & Park (1999), a concentração e o tipo de carboidrato no meio de cultura afetam muitos aspectos da embriogênese somática, como indução de competência em células não-embriogênicas, e indução da embriogênese secundária. Em *Olea europaea* o uso de sacarose se mostrou mais eficiente na produção de novos embriões e germinação do que quando se usou glucose (Trabelsi *et al.*, 2003), do mesmo modo, Compton & Gray (1996) demonstraram que as concentrações de sacarose até 120 g.L^{-1} melhoram o crescimento das culturas embriogênicas. Diferente do que foi encontrado por Bensaad e colaboradores (1996) que relataram uma maior eficiência com uso de glucose no cultivo de anteras, enquanto na presença de sacarose ou manitol não houve formação de embriões somáticos. Nos vegetais, os carboidratos desempenham inúmeras funções essenciais, sendo substrato para respiração, representando um importante papel na rota biosintética de diversos compostos, sendo utilizados como blocos construtores de macromoléculas (Calamar & De Klerk, 2002). Os açúcares também atuam como moléculas sinalizadoras, onde os caminhos de transdução podem influenciar os processos de desenvolvimento e rotas metabólicas (Smeekens, 2000). Alguns dos efeitos sobre o crescimento e desenvolvimento das plantas sugerem uma interação dos sinais dos açúcares com a regulação hormonal (Rolland *et al.*, 2002, 2006). A sacarose é utilizada como fonte preferencial de carbono em culturas de células, tecidos ou órgãos vegetais, provavelmente por ser o principal açúcar transportado pelo floema das plantas (García *et al.*, 2002; Pérez *et al.*, 2000; Petersen *et al.*, 1999). Para a utilização da sacarose em culturas de células vegetais, como fonte de carbono, é necessário a sua degradação, mediada por duas enzimas, invertase e sacarose sintase, permitindo a utilização de duas hexoses produzidas. Quando em pH ótimo, os tecidos cultivados possuem dois tipos de invertases, a invertase ácida no vacúolo e parede celular, e uma invertase alcalina localizada no citoplasma (Hauch & Magel, 1998).

A substituição de sacarose por frutose, no meio nas culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis*, não apresentou resultados satisfatórios, durante o tempo de cultivo avaliado, tanto em meio MS quanto em meio WPM. Em *Picea glauca* e *Picea mariana* foi observada uma melhor produção de embriões somáticos, quando utilizada sacarose como fonte de carboidrato, promovendo também um maior acúmulo de amido celular e aumento gradativo de proteínas totais. Quando a sacarose foi substituída pela glucose e frutose, houve um menor número de embriões somáticos normais encontrados, menores níveis de amido e

conteúdo constante de proteínas (Iraqi & Trambly, 2001). No entanto, há evidências que, para *Coffea canephora*, dependendo do genótipo, a produção de embriões somáticos pode ser de três a seis vezes maior quando a sacarose é substituída por frutose ou maltose (Fuentes *et al*, 2000). Culturas celulares de *Ocotea odorífera* apresentaram um incremento maior de massa seca quando mantidas em meio de cultura com glucose, frutose e amido, do que em sacarose (Oltramari, 2002), para *Paeonia lactiflora* o uso da glucose juntamente com reguladores de crescimento promoveu a produção de novos brotos e raízes *in vitro*, enquanto o seu uso isolado diminuiu a produção de brotos e folhas conforme o aumento da concentração de glucose (Gabryszewska, 2010).

Slesak e colaboradores (2004) observaram a redução do conteúdo de sacarose no meio de cultura de *Brassica napus*, acompanhada pelo aumento nas concentrações de glucose e frutose, o que evidencia a presença de um mecanismo enzimático, envolvido na hidrólise da sacarose em frutose e glucose, para serem posteriormente absorvidas. Além disso, as culturas de hipocótilo tiveram um incremento da sua massa fresca, quando cultivadas em meio de cultura suplementado com sacarose ou glucose, sendo que, quando a fonte de carbono era frutose, foi detectada uma redução na massa fresca, sugerindo que os tecidos do hipocótilo eram susceptíveis aos compostos furfurais, produtos tóxicos oriundos da degradação da frutose, após autoclavagem. O mesmo ocorreu no presente trabalho, onde a suplementação com frutose não estimulou o crescimento das culturas.

Os açúcares adicionados ao meio de cultura, além de fornecer energia para as culturas, funcionam como agentes osmóticos, Agarwal e colaboradores (2004) observou que, concentrações elevadas de carboidratos causam estresse osmótico nas culturas, aumentando assim a embriogênese em *Morus alba*. Sob condições de estresse osmótico, tecidos vegetais podem responder aumentando a síntese de poliaminas (Litz, 1986) e as poliaminas aumentam a sincronia e eficiência da embriogênese somática (Bardley *et al*, 1984).

A embriogênese somática é, teoricamente, a melhor opção para a propagação de espécies frutíferas *in vitro*, por apresentar alta taxa de multiplicação comparada a qualquer outro processo de propagação, possibilidade de produção em larga escala pela manutenção da cultura com menor custo de produção, além do fato da planta obtida ser geneticamente idêntica à planta-mãe (Barros, 1999). A falta de sincronia das culturas é considerada uma das limitações do processo de embriogênese repetitiva (Guerra *et al.*, 1999), que pode ser corrigida

com a manipulação do meio de cultura e diferentes tempos de desidratação dos embriões somáticos.

Viana e Mantell (1999), afirmam que uma característica importante da embriogênese somática em *O. catharinensis* é a capacidade de multiplicação das culturas, sem a necessidade da adição de reguladores de crescimento ao meio basal. Inúmeros sinalizadores desencadeiam respostas fisiológicas que regulam o desenvolvimento vegetal, entre eles estímulos ambientais, reguladores de crescimento e moléculas de açúcar e nitrogênio. Segundo muitas pesquisas, há a possibilidade das respostas a estes estímulos formarem uma teia interconectada (Gibson, 2000).

A importância nutricional das fontes de carbono já é bastante conhecida, no entanto, a adição de componentes ao meio de cultura, principalmente macronutrientes e fontes de carbono, pode reduzir drasticamente o potencial osmótico do meio (George, 1993). O componente osmótico do meio influencia fortemente as células, tecidos, crescimento de órgãos e morfogênese vegetal (Lipavska' & Vreugdenhil, 1996; Rout et al., 2000). As culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* crescidas na presença de concentrações médias glucose, na presença de sorbitol, apresentaram menor porcentagem de crescimento, quando relacionado com a maior e menor concentração deste açúcar. Para as culturas suplementadas com sacarose, o uso da sua menor concentração foi mais eficiente na indução da embriogênese secundária. Jeannin e colaboradores (1995) trabalharam com uma variedade de meios de culturas, com diferentes concentrações e fontes de carbono, bem como o potencial osmótico. Estes autores observaram que um limiar mínimo de oferta de açúcar e potencial osmótico foi necessário para o crescimento de embriões zigóticos imaturos de girassol, mas ineficaz para a organogênese. Biahoua e Bonneau (1999) sugerem que a embriogênese somática *in vitro* da espécie arbórea *Euonymus europaeus*, pode ser controlada pela fonte de carbono e do potencial osmótico do meio. O estresse osmótico atua no controle de muitos processos durante a embriogênese e a germinação de embriões zigóticos, como a acumulação de proteínas de reserva, açúcares e amido, além da prevenção da germinação precoce pela manutenção dos embriões em estágio de maturação (Find, 1997).

O uso de carvão ativado e sorbitol em culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* foi relatado anteriormente por Santa-Catarina (2001) e Olmedo (2005), havendo um incremento em matéria fresca e na manutenção dos embriões somáticos no estágio globular, o que

sugere que houve uma diminuição do potencial osmótico do meio de cultura, possibilitando o acúmulo de substâncias de reserva, como amido nas estruturas embriogênicas. No presente trabalho, as culturas desidratadas por duas e quatro semanas apresentaram uma maior taxa de embriogênese secundária quando na presença de sorbitol. O sorbitol, neste caso poderia estar tendo efeito via estresse osmótico, controlando a absorção dos demais nutrientes do meio de cultura e/ou sendo metabolizado pelas células, como fonte de carbono.

O uso do carvão ativado pode ter um efeito vantajoso, segundo George (1996), como a adsorção de compostos fenólicos produzidos pelos tecidos vegetais. No entanto, estudos demonstraram que o carvão ativado acidifica o meio de cultura durante a autoclavagem e o pH muito mais baixo ocasiona a hidrólise ácida do sorbitol e da sacarose (Druart & De Wulf, 1993), o que ocasiona o aumento nos níveis de glicose e frutose, além disso, a frutose tem sido identificada como inibidor do crescimento *in vitro* de algumas espécies, o que está de acordo com os resultados obtidos para embriões somáticos de *Ocotea catharinensis*.

Para embriões somáticos de *Glycine max*, a suplementação do meio de cultura com 3% de sorbitol causou a inibição do incremento da massa fresca, no entanto promoveu a conversão em plantas e a germinação. Os autores afirmam que há uma relação inversa entre potencial de conversão dos embriões e o tamanho dos embriões maduros, sendo assim é importante o uso de suplementos osmóticos que proporcionem uma melhoria na resposta embriogênica, impedindo a histodiferenciação (Walker & Parrot, 2001). O uso de sorbitol em cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) aumenta a frequência de regeneração de plântulas a partir de embriões somáticos, além de ser possível alterar a baixa frequência de regeneração de determinados genótipos através da adição de sorbitol no cultivo contínuo juntamente com outros açúcares (Pengpeng *et al.*, 2008)

A presença da luz influenciou positivamente na embriogênese secundária, sendo que em culturas embriogênicas com sacarose a frequência foi quatro vezes maior, após 8 semanas de cultivo, já quando as culturas foram suplementadas com glicose, essa diferença foi de pouco menos de duas vezes. No entanto, apesar de haver a embriogênese secundária nas culturas mantidas no escuro, estas apresentavam menor quantidade de biomassa e aspecto branco-translúcidas, enquanto que as culturas mantidas na luz apresentavam branco-amareladas e opacas. O aspecto das estruturas embriogênicas é considerado importante na caracterização do nível de diferenciação,

embriões somáticos maduros translúcidos, por exemplo, podem refletir uma deficiência no conteúdo de substâncias de reserva, como amido e proteínas. O acúmulo destas substâncias de reserva faz com que se tornem opacos, sendo uma etapa fundamental na embriogênese zigótica, pois o amido será utilizado pelo embrião até a planta se tornar autotrófica (Bewley & Black, 1994; Tulecke & McGranahan, 1985).

Os meios de cultura com composições salinas diferentes, como o WPM e MS, testados neste trabalho, apresentaram respostas bem distintas, sendo que o meio WPM foi o que apresentou os melhores resultados quando testado com as três fontes de carbono, em concentrações distintas. As culturas com sacarose e glucose apresentaram as maiores frequências de embriogênese secundária neste meio, enquanto a utilização da frutose foi inibitória de embriogênese secundária. Apesar do meio de cultura MS ser o mais utilizado em cultura de tecidos de plantas, este apresentou uma baixa frequência de embriogênese secundária, retardando a embriogênese secundária nas culturas suplementadas com sacarose e glucose, enquanto que, na presença de frutose alcançou mais de 50% de embriogênese secundária na sexta semana de cultivo, no entanto, ocorreu morte celular logo após este período. Estes resultados indicam que novas investigações devem ser feitas com este meio de cultura, por períodos mais longos. No caso das culturas suplementadas com frutose há a necessidade de testes de novas metodologias, como multiplicação em meio contendo frutose para observar se a resposta embriogênica continua ocorrendo, ou se este fato ocorre foi devido aos compostos de reserva pré-existentes nas estruturas. McCown & Sellmer (1987), afirmam que a inibição da embriogênese somática no meio K, pode ser devido à grande quantidade de cloreto de cálcio presente em sua formulação, pois, algumas espécies podem ser altamente sensíveis ao sal. Segundo os mesmos autores, a força iônica total do meio de cultura, que varia conforme a concentração de íons inorgânicos presentes, a concentração de nitrogênio inorgânico (amônio e nitrato) e a razão amônio/nitrato, podem influenciar no crescimento *in vitro*. Segundo estes autores o meio de cultura WPM possui 42,39 mM de íons inorgânicos, 14,58 mM de nitrogênio e razão amônio/ nitrato igual a 0,51, já o meio MS possui duas vezes mais de íons inorgânicos (94,25 mM), quatro vezes mais nitrogênio e razão amônio/nitrato semelhante (0,52).

A utilização de baixas temperaturas, durante a desidratação, foi testada como alternativa para o armazenamento das culturas embriogênicas do tipo 2, fora do meio de cultura, por um maior período

de tempo, diminuindo assim, a necessidade de repicagens a cada três ou quatro semanas de cultivo. Além disso, estudos feitos com flores e inflorescências de diversas espécies, em baixas temperaturas, têm estimulado a resposta embriogênica em anteras. Grãos de pólen, tratados com baixas temperaturas, por períodos adequados, apresentam resposta embriogênica mais elevada em comparação com explantes não tratados. No entanto, muito pouco se sabe sobre os efeitos da baixa temperatura sobre a reprogramação celular, de células não embriogênicas para que se tornem células embriogênicas durante o cultivo *in vitro* (Teixeira & Marbach, 2002). No entanto, foi possível observar que as culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* mantidas desidratando por 2 semanas a 25°C, seguida de duas semanas em geladeira (5°C), apresentaram uma frequência de embriogênese somática significativamente maior do que a das culturas embriogênicas mantidas durante as quatro semanas de desidratação a 25°C, apresentando também uma maior sincronia das culturas, em que foi observado um elevado número de embriões somáticos no estágio cotiledonar inicial.

6.3 CARACTERIZAÇÃO HISTOQUÍMICA DE CULTURAS EMBRIOGÊNICAS DE *Ocotea catharinensis*

Segundo Yeung (1995) o início da diferenciação estrutural do embrião somático se dá com a formação da protoderme circundando o embrião, como foi observado no presente trabalho, nos embriões somáticos no estágio globular, produzidos a partir das estruturas das culturas embriogênicas do tipo diferenciada 2, nas estruturas globulares produzidas pelas culturas embriogênicas do tipo diferenciada 1, nas estruturas cotiledonares iniciais, predominantes nas culturas diferenciada tipo 2, e nos embriões somáticos no estágio cotiledonar maduro. Assim sendo, foi possível observar neste trabalho que, cada tipo de estrutura e de cultura embriogênica estudada, está em um estágio de diferenciação específico.

Segundo os testes histoquímicos realizados com as estruturas provenientes de diferentes tipos de culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis*, foi possível observar diferenças nos padrões de reserva e localização dos polissacarídeos ácidos, neutros e proteínas. Foi possível observar, também, que os embriões secundários no estágio globular, originados das estruturas cotiledonares das culturas embriogênicas tipo diferenciada 2, as estruturas globulares produzidas pelas culturas embriogênicas do tipo diferenciada 1 e aquelas produzidas pelas cultura

tipo diferenciada 2 apresentaram maior atividade mitótica do que os embriões somáticos no estágio cotiledonar maduro. O aumento do volume celular, com expansão do vacúolo, por sua vez, foi característico dos embriões somáticos no estágio cotiledonar maduro.

Assim como os embriões zigóticos os embriões somáticos armazenam em seus tecidos de reserva, proteínas, lipídios e carboidratos (Gupta *et al.*, 1991). As reservas de proteínas, carboidratos e lipídeos começam a ser produzidas após o período inicial do crescimento mitótico, sendo que as proteínas são depositadas em corpos protéicos, carboidratos são convertidos em amido ou entram na composição da parede celular e lipídeos em corpos lipídicos ou oleaginosos. (Bewley e Black, 1994).

Segundo Scott e Dorling (1995 *apud* Bouzon, 1999), as reações de parede celular com AT-O diferem quantitativamente e qualitativamente, conforme as diferentes frações ácidas dos polissacarídeos. Quando corados com AT-O, apenas as paredes celulares de algumas células das estruturas produzidas a partir das culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* dos tipos diferenciada 1 (estruturas globulares) e diferenciada 2 (embriões somáticos no estágio cotiledonar inicial) apresentaram uma leve reação metacromática, apresentando coloração violácea. Resultado diferente foi obtido por Santa-Catarina (2001), com embriões somáticos de *O. catharinensis*, em que houve intensa reação metacromática na parede celular, devido à presença de polissacarídeos ácidos em grande quantidade. Isto ocorreu, talvez pelo fato dos embriões somáticos utilizados no presente trabalho estarem em estados de diferenciação diferentes e é um indicativo de que os polissacarídeos da parede celular podem estar sofrendo alterações, qualitativas e quantitativas, de acordo com o estágio de desenvolvimento dos embriões somáticos. Assim, tais moléculas poderiam funcionar como marcadores bioquímicos do desenvolvimento, mas para comprovar esta hipótese, estudos mais detalhados sobre as alterações na quantidade e na composição dos polissacarídeos da parede celular de embriões em diferentes estágios de desenvolvimento devem ser conduzidos. Além disto, no presente estudo também foram detectados grânulos ortocromáticos no citoplasma das células das estruturas embriogênicas estudadas.

A reação de PAS é a utilizada para a identificação dos polissacarídeos neutros, onde o ácido periódico oxida moléculas que possuem os grupos 1,2-glicol, que é geralmente encontrado nas moléculas de celulose e amido (Trick e Pueschel, 1990). Nas estruturas

embriogênicas de *Ocotea catharinensis* analisadas no presente trabalho foi possível observar grãos de amido nas células da protoderme e nas células parenquimáticas do tecido de reserva dos cotilédones, sendo que o tamanho dos grãos de amido variou conforme a região em que se encontrava no embrião somático, e também conforme o tipo de estrutura embriogênica estudada.

Resultados semelhantes foram encontrados, para a mesma espécie, em que as células da protoderme apresentaram grãos de amido pequenos, enquanto que nas células localizadas na parte mais interna dos cotilédones os grãos observados foram maiores (Santa-Catarina, 2001). Do mesmo modo, embriões zigóticos de *Vicia faba* apresentaram grãos pequenos na protoderme e maiores nas células parenquimáticas do tecido cotiledonar (Borisjuk et al., 1995). Conforme estudos realizados com as espécies *Aspidosperma polyneuron* (Ribas et al., 2005) e *Araucária angustifolia* (Steiner et al., 2009), os grãos de amido têm sido apontados como indicadores do processo embriogênico, estes autores sugerem ainda a relação da presença de grãos de amido com processos de embriogênese somática *in vitro*. Para verificar se há diferença na quantidade de amido produzido pelos diferentes tipos de culturas embriogênicas e pelos embriões secundários no estágio globular e cotiledonar maduro, o que seria indicativo de diferenças no metabolismo de carboidratos, novos experimentos devem ser conduzidos.

Bouzon (1999) afirma que as proteínas são as principais constituintes estruturais das membranas das organelas celulares e estão presentes no citoplasma, como moléculas envolvidas em diversas rotas metabólicas, muitas delas atuando como enzimas. A alta afinidade de ligação a proteínas que CBB possui, faz com que seja o corante mais utilizado para identificação e quantificação de proteínas totais (Cawood et al., 1978). Quando coradas com CBB, as células dos embriões somáticos secundários, produzidos a partir das estruturas desidratadas, assim como as estruturas embriogênicas produzidas pelas culturas dos tipos diferenciadas 1 e 2 de *Ocotea catharinensis* evidenciaram componentes protéicos abundantes, nas paredes celulares e distribuídos por todo o citoplasma, mas que diminuíram nos embriões somáticos no estágio cotiledonar maduro, o que indica a coincidência da atividade protéica intensa com os momentos fisiológicos que requerem grande atividade mitótica, em tecidos de natureza meristemática, pouco diferenciados.

A maior concentração de componentes protéicos distribuídos pelo citoplasma indica intensa produção de organelas celulares. A síntese protéica para a gênese de organelas celulares torna o citoplasma compacto e muito ativo, o que é típico de células em multiplicação e divisão celular. Grande quantidade de proteínas de reserva, em forma de unidades granulares e corpos protéicos, também foram observados em embriões zigóticos de *Theobroma cacao* (Alemanno, *et al.* 1997). Já, no presente trabalho, nas células dos embriões somáticos maduros de *Ocotea catharinensis*, a reação positiva ao CBB foi menos intensa no citoplasma e ficou mais restrita às regiões nuclear e perinuclear (onde se concentram as organelas citoplasmáticas), resultado semelhante ao obtido por Santa-Catarina (2001) em embriões somáticos maduros da mesma espécie.

Análises quantitativas e qualitativas das proteínas produzidas pelos diferentes tipos de culturas embriogênicas, estudadas no presente trabalho e pelos embriões somáticos, nos diferentes estágios, serão de fundamental importância para a identificação de possíveis marcadores moleculares do desenvolvimento e elucidação dos eventos metabólicos, que ocorrem durante o processo de diferenciação dos embriões somáticos. Tais estudos, associados aos estudos de genômica funcional, poderão contribuir para um conhecimento mais aprofundado sobre o controle gênico dos processos de embriogênese somática, em cada estágio de desenvolvimento e deverão ser realizados futuramente.

7. CONCLUSÕES

Tomados em conjunto os resultados encontrados no presente estudo permitiram as seguintes conclusões sobre o sistema de embriogênese somática de *Ocotea catharinensis*:

- As análises das curvas de dissimilação apresentaram padrão linear de crescimento das culturas crescidas em meio de cultura com sacarose, entrando na fase estacionária após o 20º dia, enquanto as culturas embriogênicas crescidas em meio de cultura com glicose apresentaram mais de um padrão de crescimento.
- As características das formulações salinas dos meios de cultura, assim como das morfologias influenciam no conteúdo de metabólitos secundários. Sendo que o período de cultivo interfere na quantidade de carotenóides, mas não de compostos fenólicos
- O perfil metabólico das culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* obtidos através da espectrofotometria de varredura em UV-Vis e espectroscopia de FT-IR corroboram os resultados obtidos na quantificação de metabólitos secundários.
- A atividade antioxidante avaliada nos extratos de culturas embriogênicas ao longo das semanas apresentou alta correlação com a concentração de compostos fenólicos. A cultura embriogênica do tipo friável apresentou maior atividade antioxidante, não apresentando correlação com a concentração dos metabólitos secundários avaliados.
- Períodos e baixas temperaturas durante a desidratação dos embriões somáticos, influenciaram na indução da embriogênese somática secundária em *Ocotea catharinensis*.
- Culturas embriogênicas somáticas mantidas na presença de fonte luminosa apresentam maiores valores médios de embriogênese somática secundária, quando na ausência de fonte luminosa e glicose a 116,8mM apresentam maior embriogênese somática

secundária quando comparada as culturas mantidas na presença de sacarose 54,8mM.

- Culturas embriogênicas mantidas em meio de cultura suplementado com 54,8 mM de sacarose e 116,8 mM de glucose ambos com 121 mM de sorbitol, 2,73 mM de glutamina, 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativo e 2 g.L⁻¹ de Phytigel, apresentaram os melhores resultados na indução de embriogênese secundária.
- A partir da caracterização histoquímica foi possível observar que as estruturas embriogênicas somáticas secundárias produzidas a partir de embriões desidratados, culturas do tipo diferenciado 1 e 2, apresentam grande quantidade de proteínas dissolvidas no citoplasma, apresentando baixa concentração de polissacarídeos ácidos. Conforme a diferenciação das culturas, maior a organização dos grãos de amido em agregados.
- A produção de estruturas embriogênicas somáticas secundárias de *Ocotea catharinensis* em diferentes condições, para a investigação da produção de compostos do metabolismo secundário é possível, havendo a necessidade de estudos de longo prazo para a confirmação dos resultados obtidos.

8. REFERÊNCIAS

AHARONI, A.; JONGSMA, M.A.; KIM, T.-Y., RI, M.B., GIRI, A.P.; VERSTAPPEN, F.W.A.; SCHWAB, W.; BOUWMEESTER, H.J. Metabolic engineering of terpenoid biosynthesis in plants. **Phytochemistry Reviews**, 5:49-58. 2006

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

ALEMANNI, L.; BERTHOULY, M.; MICHAUX-FERRIERE, N. A comparison between *Theobroma cacao* L. zygotic embryogenesis and somatic embryogenesis from floral explantes. **In vitro Cell Development Biology**, 33: 163-172. 1997.

ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, K. R.; RYAN, D. Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. **Analyst**, 125:989-1009. 2000.

ARAKAWA, T.; KITA, Y.; CARPENTER, J. Protein–solvent interactions in pharmaceutical formulations. **Pharmaceutical Research** 8:285–291. 1991.

ARGAWAL, S.; KANWAR, K.; SHARMA, D.R. Factors affecting secondary somatic embryogenesis and embryo maturation in *Morus alba* L. **Scientia Horticulturae**. 102:359–368. 2004.

ARNOLD, W.; MITRENGA, D.; MAYRESBACH, H. Gefriertro und einbsttung in glycolmethacrylat (GMA)- Ergebnisse Histochemischer Reaktionen. **Acta Histochemica**. 14: 271 – 277. 1975.

ARNOLD, S.V.; SABALA, I.; BOZHOKOV, P.; DYAKHOV, J.; FILANOVA, L. Developmental pathways of embryogenesis. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, 69:233-249, 2002.

ARUOMA, O.I. Methodological characterizations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. **Mutation Research**, 9:523-524, 2003.

BAITELLO, J.B. Novas espécies de Lauraceae para a Flora brasileira. **Acta Botanica Brasilica**. 15(3):445-450. 2001.

BARBOSA, R.C.S.B.C.; GIESBRECHT, A.M.; BARBOSA-FILHO, J.M.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O.R. Avaliação da atividade antibiótica de extratos de Lauraceae. **Acta Amazonica (Supl)**, 18(1,2):91-94, 1988.

BARDLEY, P.M.; EL-FIKI, F.; GILES, K.L., Polyamine and arginine affect somatic embryogenesis of *Daucus carota*. **Plant Science Letters**. 34:397-401. 1984.

BARROS, A. S. R. Maturação e colheita de sementes. In: CÍCERO, S. M.; MARCOS-FILHO, J.; SILVA, W. R. **Atualização em produção de sementes**. Campinas: Fundação Cargill, 107-134. 1986.

BARROS, C. F; CALLADO, C. H; COSTA, C. G; PUGIALLI, H. R. L; CUNHA, M; MARQUETE, O. **Madeiras da Mata Atlântica**, Vol I. 1a ed. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 86p. 1997.

BARROS, L.M. Embriogênese somática. **Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento**, 7(2):36-39, 1999.

BARROSO, G.M.; GUIMARÃES, E.F.; ICHASO, C.L.F.; COSTA, C.G.; PEIXOTO, A.L. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. v.1, 2 ed. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa. 2002.

BARLOW, E.W.R.; LEE, J.W; MUNNS, R.; SMART, M.G. Water relations of the developing wheat grain. **Australian Journal of Plant Physiology** . Ingram 7:519-525. 1980.

INGRAM, J.; BARTELS, D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. **Annual Review of Plant Biology**. 47:377-403. 1996.

BARTELS, D.; CHANDLER, J.; BOCKEL, C.; FRANK, W.; KLEINES, M.; RODRIGO, M.J.; PHILIPS, J.; MARIAUX, J.B.; FURINI, A.; SALAMINI, F. Investigating the molecular basis of desiccation tolerance using the resurrection plant *Craterostigma*

plantagineum as an experimental system. **Acta Physiol. Plant** 19:399–403. 1997.

BENSAAD, Z.M.; HENNERTY, M.J.; ROCHE, T.D. Effects of cold pre-treatment, carbohydrate source and gelling agents on somatic embryogenesis from anthers from *Vitis vinifera* L.cvs. 'Regina' and 'Reichensteiner'. **Acta Horticulturae**, 440:504-509. 1996.

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

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2° Ed.; Plenum Press, New York, 445p. 1994.

BIAHOUA, A.; BONNEAU, L., Control of in vitro somatic embryogenesis of the spindle tree (*Euonymus europaeus* L.) by the sugar type and the osmotic potential of the culture medium. **Plant Cell Reports**. 19:185–190. 1999.

BOESEWINKEL, F. D.; BOUMAN, F. The Seed Structure. *In*: JOHRI, B. M. **Embryology of Angiosperms**. Springer-Verlag. Berlin. 1984.

BOUZON, Z.L. **Aspectos histoquímicos e ultraestruturais da porção vegetativa e reprodutiva de estiquídios de *Hypnea musciformis* (Gigartinales- Rhodophyta)**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR. 1993.

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

BORISJUK, L.; PANITZ, H. W.; MANTEUFFEL, R.; WOBUS, U. Embryogenesis of *Vicia faba* L.: Histodifferentiation in relation to starch and storage protein synthesis. **Plant Physiology**. 143: 203-218. 1995

BRITTON, G. UV/visible spectroscopy. *In*: BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H. (Eds.). **Carotenoids**. 1(B):13-62, 1995.

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

BRUSH, S.B. **Genes in the field: On farm** conservation of crop diversity. Rome-Italy: IPGRI, Lewis Publishers, Boca Raton-USA-IDRC, 2001.

CALAMAR, A.; DE KLERK, G.J. Effect of sucrose on adventitious root regeneration in apple. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, 70:207-212. 2002.

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

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

CARMO, F.M.S.; BORGES, E.E.L.; MASSARONI, T. Alelopatia de extratos aquosos de canela-sassafrás (*Ocotea odorifera* (Vell.)Rohwer). **Acta botanica brasílica**. 21(3): 697-705. 2007.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies florestais brasileiras**. Recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. EMBRAPA-CNPQ/SPI, Brasil, 1994.

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: Ciência, Tecnologia e Produção**. FUNEP, 4ª Ed. 588p. 2000.

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

COMPTON, M.E., GRAY, D.J. Effects of sucrose and methylglyoxal bis-(guanylhydrazone) on controlling grape somatic embryogenesis. **Vitis**, 35:1-6. 1996.

CONNER, D.E. Naturally occurring compounds. In: DAVIDSON, P.M.; BRANEM A.L. **Antimicrobials and Foods**. New York: M. Dekker. 441-468. 1993.

CONSERVATION INTERNATIONAL DO BRASIL, FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA, FUNDAÇÃO BIODIVERSITAS, IPE, SMA-SP e SEMAD-MG. Avaliação e ações prioritárias para conservação da biodiversidade da Mata Atlântica e Campos Sulinos. Brasília: **Ministério do Meio Ambiente/ SBF**. 2000.

CORRÊA, M.P. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**. Ministério da Agricultura, IBDF, Vol. 1. 458 p.. 1984.

CORRÊA, A.D.; BATISTA, R.S.; QUINTAS, L.E.M. **Plantas Medicinais: Do Cultivo à Terapêutica**. Petrópolis: Vozes, 156-157. 1998.

COSTA FILHO, P. A.; POPPI, R.J. Determination of triglycerides in human plasma using near-infrared spectroscopy and multivariate calibration methods, **Analytica Chimica Acta** 446:39–47, 200.

COSTA, P. H. M. ; VIANA, A. M. ; MANTELL, S. H. . Direct somatic embryogenesis and plantlet regeneration of *Ocotea catharinensis* an endangered brazilian hardwood forest tree. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 35:279-286, 1993.

CROTEAU, R., KUTCHAN, T.M.; LEWIS, N.G. Natural products (secondary metabolites). In: B. Buchanam, W. Grisseem & R. Jones (eds.). **Biochemistry & molecular biology of plants**. **American Society of Plant Physiologists**, 1367 p. 2000.

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

CVIKROVÁ, M., MALÁ, J.; EDER, J.; HRUBCOVA, M., VÁGNER, M. Abscisic acid, polyamines and phenolic acids in sessile oak somatic embryos in relation to their conversion potential. **Plant Physiology Biochemistry**, 36 (3):247-255, 1998.

DELGADO-VARGAS, F., JIMÉNEZ, A.R. PAREDES-LÓPES, Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains characteristics, biosynthesis, processing, and stability. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. 40:173. 2000.

DINIZ, M.F.; FERREIRA, L.T. Bancos genéticos de plantas, animais e microrganismos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. 13:34-38, 2000.

DRUART, P.H.; DE-WULF, O. Activated charcoal catalyses sucrose hydrolysis during autoclaving. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 32: 97-99, 1993.

DUBIS, E.N.; DUBIS, A.T.; MORZYCKI, J.W. Comparative analysis of plant cuticular waxes using HATR FTIR reflection technique. **Journal of Molecular Structure**, 511–512: 173 – 179. 1999.

EMMERICH, M.; SENNA, L. M. Estudos de etnobotânica no Parque indígena do Xingu II. Dois componentes do ritual de pajelância: o cigarro e a semente do pajé. **Bradea**, 26(4):170 – 175, 1985.

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

FIND, J.I. Changes in endogenous ABA levels in developing somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) in relation to maturation médium, desiccation and germination. **Plant Science** n.128, p.75-83. 1997.

FERNANDES, P.D. Metabolismo do algodoeiro em ambientes adversos. In: Congresso Brasileiro de Algodão, 5., 2005, Salvador. Algodão, uma fibra natural: **Anais..** CD-ROM . [S.l.]: Abapa: Embrapa: Abrapa: Governo da Bahia, 2005.

FERREIRA, L.G.R. **Fisiologia vegetal: relações hídricas**. Fortaleza, Edições Universidade Federal do Ceará, 137p.1988.

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

FUENTES, S.R.L.; CALHEIROS, M.B.P.; MANETTI FILHO, J.; VIEIRA, L.G.E. The effects of silver nitrate and different carbohydrate sources on somatic embryogenesis in *Coffea canephora* P. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 60: 5-13, 2000.

FELTL, L.; PACAKOVA, V.; STULIK, K.; VOLKA, K. Reliability of Carotenoid Analyses: A review. **Current Analytical Chemistry**. 93-102. 2005.

FUNASAKI, M.; LACAVA, A.L.; CATARINA, C.S.; VIANA, A. M.; FLOH, E.I.S.; YOSHIDA, M.; KATO, M.J. Neolignans and sesquiterpenes from leaves and embryogenic cultures of *Ocotea catharinensis* (Lauraceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 20:853-859, 2009.

GABRYSZEWSKA, E. The Effects of Glucose and Growth Regulators on the Organogenesis of *Paeonia lactiflora* Pall. *In vitro*. **Journal of Fruit and Ornamental Plant Research**. 18:309-320. 2010.

GAHAN, P.B. **Plant histochemistry and cytochemistry: an introduction**. Academic Press. London. 301p. 1984.

GAMA, M.I.C.S. **Produção de plantas transgênicas de batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) por transformação de calos embriogênicos através de *Agrobacterium tumefaciens***. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro. 130p. 1993.

GARCÍA, J.L.; TRONCOSO, J.; SARMIENTO, R.; TRONCOSO, A. Influence of carbon source and concentration on the *in vitro* development of olive zygotic embryos and explants raised from them. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 69:95-100, 2002.

GARCIA, M.G. **Potencial de Crescimento e Parâmetros Bioquímicos em Agregados Celulares de *Ocotea catharinensis* (Mez.) Lauraceae.** Dissertação de mestrado em Biotecnologia. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). 116 p. 2005.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture.** Part 2. Practice. 2 ed. Edington: Exegetics, England. 1361p. 1996.

GENTRY, A.H. Neotropical floristic diversity: phytogeographical connections between Central and South America, pleistocene climatic fluctuations, or an accident of the andean orogeny? **Annals of Missouri Botanical Garden** 85:156-159. 1982.

GENTRY, A.H. Changes in plant community diversity and floristic composition on environmental and geographical gradients. **Annals of Missouri Botanical Garden** 75:1-34. 1988.

GENTRY, A.H. **Four neotropical rain forests.** Yale University Press, London. 1990.

GIBSON, S.I. Plant sugar-response pathways. Part of a complex regulatory web. **Plant Physiology**, 124:1532-1539, 2000.

GIBSON, J.P.; WHEELWRIGHT, N.T. Mating system dynamics of *Ocotea tenera* (Lauraceae), a gynodioecious tropical tree. **American Journal of Botany**. 83:890-894. 1996.

GORDON, E.M.; McCANDLESS, E.L. Ultrastructure and histochemistry of *Chondrus crispus* Stackhouse. **Proceedings of Nova Scotia Institute of Science**, vol. 27:111– 133. 1973.

GOULART, E .G.; JOURDAN, M .C.; BRAZIL, B.G.; GILBERT, B; LOPES, J.N.C; SARTI, S.J.; VICHNEWSKI, W.; THAMES, A. W. Atividade bloqueadora de produtos naturais na evolução externa de *Strongyloides stercoralis* e ancilostomídeos. **Revista Brasileira de Farmácia**, 56(9-12)123–137, 1975.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A., Micropropagação. *In*: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S., BUSO, J.A. **Cultura de Tecidos e**

Transformação Genética de Plantas. Brasília: Embrapa. Serviço de Produção de Informação. 183-260. 1998.

GUERRA, M.P.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, J.B. Embriogênese Somática e Sementes Sintéticas. *In:* TORRES, A.C.; CALDAS, L.S., BUSO, J.A. **Culturas de Tecidos e Transformação Genética de Plantas.** Brasília, Embrapa-CBAB. 2:533-568. 1999.

GUPTA, P. K.; TIMMIS, R.; PULLMAN, G.; YANCEY, M.; KREITINGER, M.; CARLSON, W.; CARPENTER, C. Development of an embryogenic system for automated propagation of forest trees. *In:* VASIL, I. K. **Scale-up and automation in plant propagation.** California: Academic Press. 75-93. 1991

HAN, K.H; PARK, Y. G. Somatic embryogenesis in black locust (*Robinia pseudoacacia* L.) *In:* JAIN, GUPTA, P., NEWTON, R. **Somatic embryogenesis in woody plants.** 5:149-161. 1999.

HARBORNE, J.B. **Phytochemical Methods.** 3rd ed. Chapman & Hall. 1998.

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

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

HAUCH, S.; MAGEL, E. Extractable activities and protein content of sucrose-phosphate synthase, sucrose synthase and neutral invertase in trunk tissues of *Robinia pseudoacacia* L. are related to cambial wood production and heartwood formation. **Planta**, 207:266-274, 1998.

HERRMANN, K.M.; WEAVER, L.M. The shikimate pathway. Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 50: 473-503. 1999

HOEKSTRA, F.A.; GLOVINA, E.A.; BUINTINK, J. Mechanisms of plant desiccation tolerance. **Trends in Plant Science** 6:431-438. 2001.

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

IRAQI, D.; TREMBLAY, F.M. Analysis of carbohydrate metabolism enzymes and cellular contents of sugars and proteins during spruce somatic embryogenesis suggests a regulatory role of exogenous sucrose in embryo development. **Journal of Experimental Botany**, 365(52):2301-2311, 2001.

JEANNIN, G.; BRONNER, R.; HAHNE, G., Somatic embryogenesis and organogenesis induced on the immature zygotic embryo of sunflower (*Helianthus annuus* L.) cultivated in vitro: role of the sugar. **Plant Cell Report**. 15:200-204. 1995.

JURGENS, G.; MAYER, U. *Arabidopsis*. In: BARD, J. **A Colour Atlas of Developing Embryos**. London: Wolfe Publications. 1992.

KACURÁKOVÁ, M.; WILSON, R. H. Developments in mid-infrared FTIR spectroscopy of selected carbohydrates. **Carbohydrate Polymers**. 44:29-303. 2001.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 2. ed., 431p. 2008.

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

KING, P.J.; MA, G.; MIAO, W.; JIA, Q.; MCDOUGHALL, B.R.; REINECKE, M.G.; CORNELL, C.; KUAN, J.; KIM, T.R.; ROBINSON Jr., W.E. Structure–activity relationships: analogues of the dicaffeoylquinic and dicaffeoyltartaric acids as potent inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 integrase and replication. **Journal of Medicine Chemistry**, 42:497–509, 1999.

KISSEN, R.; WINGE, P.; TRAN, D.H.T.; JØRSTAD, T.S.; STØRSETH, T.R.; CHRISTENSEN, T.; BONES, A.M. Transcriptional

profiling of an Fd-GOGAT1/GLU1 mutant in *Arabidopsis thaliana* reveals a multiple stress response and extensive reprogramming of the transcriptome. **BMC Genomics**, 11: 190. 2010.

LEWINSOHN, E.; SITUT, Y.; BAR, E.; AZULAY, Y.; IBDAH, M.; MEIR, A.; YOSEF, E.; ZAMIR, D.; TADMOR, Y.; **Food Science and Technology**, vol. 16, 407p. 2005.

LIBERAL, O.H.T; COELHO, R.C. **Manual do laboratório de análise de sementes**. Niterói: Pesagro, 95p.1980.

LIPAVSKA', H.; VREUGDENHIL, D. Uptake of mannitol from the media by in vitro grown plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 45:103–107. 1996.

LITZ, R.E., **Effect of osmotic stress on embryogenesis in *Carica* suspension culture**. Journal of the American Society for Horticultural Science. 111:969-972. 1986.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by use of shoot-tip culture. **Proceedings of the International Plant Propagators Society**, 30:421-437, 1981.

LORDELLO, A.L.L. **Constituintes químicos de folhas e de cultura de células e tecidos de *Ocotea catharinensis* Mez (Lauraceae)**. Tese de Doutorado - Universidade de São Paulo. São Paulo,SP. 156p. 1996

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa, SP, Editora Plantarum, Vol. II, 1998.

LOTT, J.N.A. Protein bodies in seeds. **Nordi Journal of Botany**. 1: 421-432p. 1981.

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

LULSDORF, M.M.; TAUTORUS, T.E., KIKCIO, S.I.; DUNSTAN, D.I. Growth parameters of embryogenic suspension culture of Interior spruce (*Picea glauca-engelmannii* complex) and Black spruce (*Picea mariana* Mill.). *Plant Science*. 82:227-234. 1992.

MAGGI-CAPEYRON, M.F.; CEBALLOS, P.; CRISTOL, J.P.; DELBOSC, S.L.E.; DOUCEN, C.; PONS, M.L.E.; GER, C.L.; DESCOMPS, B. Wine phenolic antioxidants inhibit AP-1 transcriptional activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 49:5646–5652, 2001.

MANN, J. **Chemical aspects of biosynthesis**, Oxford Chemistry Primers, Oxford University Press, Oxford 1994.

MATOS, F.J.A. **Introdução a Fitoquímica Experimental**. UFC, Fortaleza, 1988.

MARQUES, C.A, Importância Econômica da Família Lauraceae Lindl. **Floresta e Ambiente**. 8:195 - 206, 2001.

MAYER, A. M.; POLJAKOFF-MAYER, A. **The germination of seeds**. New York: Pergamon Press, 236p. 1963.

McCOWN, B.H.; SELLMER, J .C. General media and vessels suitable for woody plant culture. **In Cell and Tissue Culture in Forestry**, Vol. 1. General Principles and Biotechnology. 1987.

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

McNULTY, H.P.; BYUN, J.; LOCKWOOD, S.F.; JACOB, R.F.; MASON, P. Differential effects of carotenoids on lipid peroxidation due to membrane interactions: X-ray diffraction analysis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1768, n. 1, p. 167-174, 2007.

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

MIDDLETON JR., E.; KANDASWAMI, C. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. In: HARBORNE, J.B. (Ed.). **The Flavonoids**. London:Chapman & Hall, 619–652, 1994.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, **Instrução Normativa N° 06**, de 23 de Setembro de 2008

MORI, S.A.; BOOM, B.M.; CARVALINO, A.M.; SANTOS, T.S. Ecological importance of Myrtaceae in a eastern brazilian wet forest. **Biotropica** 15:68-70. 1983.

MOSER, J.R.; GARCIA, M.G.; VIANA, A.M. Establishment and growth of embryogenic suspension cultures of *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, 78:37-42, 2004.

MOURA-COSTA, P.M.; VIANA, A.M.; MANTELL, S.H. In vitro plantlet regeneration of *Ocotea catharinensis* Mez (Lauraceae), an endangered forest tree. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 35:279-286. 1993.

MURASHIGUE, T.; SKOOG, F.. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.** 15: 473-497, 1962.

OLMEDO, A.S. **Caracterização do Crescimento e Parâmetros Bioquímicos em Culturas Embriogênicas de *Ocotea catharinensis* (Mez.) Lauraceae**, Dissertação de Mestrado em Biotecnologia, UFSC, 2005

OLTRAMARI, A.C. **Engenharia do metabolismo de células de canela sassafrás *Ocotea odorifera* (Vell) Rohwer: análise da produção de biomassa celular e da síntese de safrol**. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia (UFSC), 2002.

OOMS, J.J.J.; VAN DER VEEN, R.; KARSSSEN, C.M. Abscisic acid and osmotic stress or slow drying independently induce desiccation

tolerance in mutant seeds of *Arabidopsis thaliana*. **Physiolgia Plantarum**, 92:506-510. 1994

PAIVA, P.D.O.; CARDOSO, M.G.; PASQUAL, M.; PAIVA, R. Identificação de compostos liberados no meio de cultura pelo processo de oxidação em cultivo *in vitro* de estrelícia (*Strelitzia reginae* Ait.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, 24:50-55, 2000.

PEÑA, L.; SÉGUIN, A. Recent advances in the genetic transformation of trees. **Trends in Biotechnology**, 19(12):500-506, 2001.

PÉREZ, F.J.; MEZA, P.; BERTI, M.; PINTO, M. Effect of carbon source and sucrose concentration on growth and hexose accumulation of grape berries cultured *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, n. 61, p. 37-40, 2000.

PESCADOR, R.; ARAÚJO, P.S.; MAAS, C.H.; REBELO, R.A.; GIOTTO, C.R.; WANDHAUSES JR, R.; LARGURA, G.; TAVARES, L.B.B. Biotecnologia da Piper hispidinervium-Pimenta longa. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, 13: 18-23, 2000.

PÉREZ, F.J.; MEZA, P.; BERTI, M.; PINTO, M. Effect of carbon source and sucrose concentration on growth and hexose accumulation of grape berries cultured *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 61:37-40, 2000.

PETERSEN, K.K.; HANSEN, J.; KROGSTRUP, P. Significance of different carbon sources and sterilization methods on callus induction and plant regeneration of *Miscanthus x ogiformis* Honda 'Giganteus'. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, n. 58, p. 189-197, 1999.

PILLATTI, F. K. **Crescimento, Perfil Metabólico e Citoquímica de Calos de *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae)**. Dissertação de mestrado em Biotecnologia. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). 116 p. 2011.

PINTO, J.E.B.; LAMEIRA, O.A. **Textos acadêmicos: micropropagação e metabólitos secundários *in vitro* de plantas medicinais**. Lavras: FAEPE/UFLA. 101p. 2001.

PENGPENG G.; HONGGUI L.; HUAQI W.; ELLIOT J.C.S., Effect of sorbitol concentration on regeneration of embryogenic calli in upland rice varieties (*Oryza sativa* L.), **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, n.92, p.303–313. 2008.

PRAKASH, C. S.; VARADARAJAN, U. Genetic transformation of sweetpotato. *In*: HILL, W. A.; BONSI, C. K.; LORETAN, P. A. **Sweetpotato technology for the 21th century**. Tuskegee University. 27-37, 1992.

PRANCE, G.T. The taxonomy and phylogeography of the Chrysobalanaceae of the atlantic coastal forests of Brazil. **Revista Brasileira de Botânica** 2:19-39. 1979.

PRANCE, G.T. Forest refuges: evidences from woody angiosperms.. *In*: Prance, G.T. (ed.), **Biological diversification in the tropics**. Columbia University Press, New York. 137-158. 1982.

PRATELLI, R; PILOT, G. Altered Amino Acid Metabolism in *Glutamine Dumper1* Plants. **Plant Signaling & Behavior**, vol. 2-3: 182 – 184. 2007.

PRANCE, G.T. The taxonomy and phylogeography of the Chrysobalanaceae of the atlantic coastal forests of Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, 2:19-39. 1979.

PORTAL SOS MATA ATLANTICA, Mata Atlântica, disponível em: <<http://www.sosma.org.br/>> acesso em: 30 de maio de 2010.

PÔRTO, K. C.; CABRAL, J. J. P.; TABARELLI, M. (eds.). Brejos de Altitude: história natural, ecologia e conservação. Ministério do Meio Ambiente, Brasília. p. 279-290.

QUINET, A. Sinopse taxonômica da família Lauraceae no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Acta Bot. Bras.** 19(3): 563-572. 2005.

QUIRÓS, A. R.; COSTA, H. S. Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples: A review. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 97-111, 2006.

RABE, E; LOVATT, C. Increased arginine biosynthesis during phosphorus deficiency. **Plant Physiology**, 81:774-779, 1986.

RAO, C.V.; DESAI, D.; SIMI, B.; KULKARNI, N.; AMIN, S.; REDDY, B.S. Inhibitory effect of caffeic acid esters on azoxymethane-induced biochemical changes and aberrant crypt foci formation in rat colon. **Cancer Research**, 53:4182-4188, 1993.

REITZ,R.; KLEIN,R.M.; REIS,A. **Projeto Madeira de Santa Catarina**. 320 p. 1978.

RIBAS, L. L. F.; ZANETTE, F.; KULCHETSCKI, L.; GUERRA, M. P. Micropropagação de *Aspidosperma polyneuron* (peroba-rosa) a partir de segmentos nodais de mudas juvenis. **Revista Árvore**, Viçosa, 29 (4):517-524, 2005.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, 2:152-159, 1997.

RIZZINI, C.T.; MORS, W.B. **Botânica econômica brasileira**. EPU, Editora da USP, p.118-119, 1976.

RANDHIR, R; PREETHI, S; KALIDAS, S. L-DOPA and total phenolic stimulation in dark germinated fava bean in response to peptide and phytochemical elicitors. **Process Biochemistry** 37: 1247-1256. 2002.

RHODES, M.J.C. Physiological roles for secondary metabolites in plants: from progress, many outstanding problems, *Plant Mol. Biol.*, 24:1-20, 1994. *In*: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Ed. 5. Porto Alegre/Florianópolis, Editora da UFRGS / Editora da UFSC, 2004.

ROGINSKY, V.; LISSI, E.A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry** 92: 235-254. 2005.

- ROHWER, J.G. Lauraceae. In: KUBITZKI, K.; ROHWER, J.G.; BITTRICH, V. **The Families and Genera of Vascular Plants**, 2:366-391. Springer-Verlag, 1993.
- ROLLAND, F.; MOORE, B.; SHEEN, J. Sugar sensing and signaling in plants. **Plant Cell** **14** (Suppl.): 185-205. 2002.
- ROLLAND, F.; BAENA-GONZALEZ, E.; SHEEN, J. Sugar sensing and signaling in plants: Conserved and novel mechanisms. **Annual Review of Plant Biology**. **57**: 675-709. 2006.
- RÖMER, S.; LUBECK, J.; KAUDER, F.; STEIGER, S.; ADOMAT, C.; SANDMANN, G. Genetic engineering of a zeaxanthin-rich potato by antisense inactivation and co-suppression of carotenoid epoxidation. **Metabolic Engineering** **4**: 263-272. 2002.
- ROOSENS, N.H.C.J.; TRAN, T.T.; HAYATI, M.I.; JACOBS, M. Isolation of the ornithine- α -aminotransferase cDNA and effect of salt stress on ornithine expression in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, **117**:263-271, 1998.
- ROSA, F.A.F.; NASCIMENTO, M.G.; REBELO, R.A.; PESCADOR, R. Avaliação da atividade regulatória de crescimento de compostos análogos ao ácido indolacético em sementes de alface. In: 23a **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**. Livro de Resumos, v.2, QB-010, Poços de Caldas, 2000.
- ROSSI, J.A.; KASUM, C.M. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. **Annual Review of Nutrition** **22**:19-34. 2002.
- ROUT, G.R.; SAMANTARAY, S.; DAS, P. *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. **Biotechnology Advances**. **18**:91-120. 2000.
- SANCHEZ-MORENO, C., LARRAURI, J.A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. **76**:270-276. 1998.

SANTA-CATARINA, C.; OLTRAMARI, A.C.; VOLTOLINI, J.A.; PEDROTTI, E.L.; MARASCHIN, M. *Ocotea odorifera* (Mez) Cell Suspension cultures - an alternative approach for biomass and safrol production. . In: 5 Congresso e Exposição Internacional sobre Florestas - FOREST'99, Curitiba-PR. **Anais..** 1999. CD-ROM.

SANTA-CATARINA, C. **Crescimento in vitro e caracterização bioquímica, morfológica e histoquímica de culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae).** Dissertação de Mestrado em Biologia Vegetal, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA V.; BALBUENA, T.S.; VIANA, A. M.; ESTELITA, M. E. M.; HANDRO W.; FLOH E.I.S. . IAA, IBA, polyamines and free amino acids associated with zygotic embryo development of *Ocotea catharinensis* (in press). **Plant Growth Regulation**, 2/3: 237-247, 2006.

SANTA-CATARINA, C.; HANAI, L.R. ; VIANA, A. M. ; DORNELAS, M.C. ; FLOH E.I.S. SERK gene homolog expression, polyamines and amino acids associated with somatic embryogenesis competence of *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae)- no prelo - pré-publicado em PDF no site da Kluwer Academic Publishers em 23/03/2004. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 1:1-10, 2004.

SANTA-CATARINA, C. ; RANDI, A. M. VIANA, A.M. Growth and accumulation of storage reserves by somatic embryos of *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 74:67-71, 2003.

SANTA-CATARINA, C.; OLMEDO, A.S.; MEYER, G.A.; MACEDO, M. ; AMORIM, W. ; VIANA, A. M. . Repetitive somatic embryogenesis of *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae): effect of embryoid developmental stage, activated charcoal and dehydration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 78:51-53, 2004.

SATUÉ-GARCIA, M.T.; HEINONEN, M.; FRANKEL, E.N. Anthocyanins as antioxidants on human lowdensity lipoprotein and lecithin-liposome systems. **J. Agric. Food Chem.**, v. 45, n. 9, p. 3.362-3.367, 1997.

SCHLEMPER, S.R.M; SILVA, D; CECHINEL-FILHO, V; FLORIANI, A. E. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de plantas da flora Catarinense: *Persea cordata* (Lauraceae) e *Alternanthera brasiliana* (Amaranthaceae). **Alcance (Pesquisa)**, Itajaí, 2, v. 5, p. 31 – 35, 1998.

SCHMIDT, E. C. **Efeitos da radiação ultravioleta-B sobre a morfologia de *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty Ex P. Silva (Gigartinales) variantes pigmentares verde e vermelha.** Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC. 2009.

SCHULTHEIS, J.R.; CHÉE, R. P.; CANTLIFFE, D. J. Embriões somáticos e sementes sintéticas. *In*: TORRES, A.C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas.** Brasília, Imprensa Nacional, 433p. 1990.

SCHRIPSEMA, J.; MEIJER, A. H.; VAN IREN, F.; TEN HOOPEN, H. J. G.; VERPOORTE, R. Dissimilation curves as a simple method for the characterization of growth of plant cell suspension cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 22: 55 – 64. 1990.

SCHULZ, H.; BARANSKA, M. Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, vol. 43: 13 – 25. 2007.

SÉNÉ, C. F. B.; McCANN, M. C.; WILSON, R. H.; GRINTER, R. Fourier-transform and Raman-transform infrared spectroscopy: an investigation of five higher plants cell walls and their components. **Plant Physiology**, vol. 106: 1623 – 1631. 1994.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Phenolics in food and nutraceuticals.** CRC Press, London, 566 p. 2006.

SIANI, A.C. **Desenvolvimento Tecnológico de Fitoterápicos:** Plataforma Metodológica. Rio de Janeiro: Scriptorio Comunicação, 2003.

SIKORA, E.; CIESLIK, E.; LESZCZYNSKA, T.; FILIPIAK-FLORKIWUACZ, A.; PISULEWSKI, P. M. The antioxidant activity of

selected cruciferous vegetables subjected to aquathermal processing. **Food Chemistry**, London, v. 107, p. 50-55, 2008.

SIMÃO, A.A. **Antioxidantes, clorofila e perfil de ácidos graxos em folhas de mandioca**. Dissertação de Mestrado em Agroquímica. Universidade Federal de Lavras, 2010.

SLESÁK, H.; SKOCZOWSKI, A.; PRZYWARA, L. Exogenous carbohydrate utilization by explants of *Brassica napus* L. cultured *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, n. 79: 45-71, 2004.

SMEEKENS, S. Sugar-induced signal transduction in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. 51: 49-81. 2000.

SOARES, S. E.; Rev. Phenolic acids as antioxidants. **Revista de Nutrição**, Campinas, 15(1):71-81, jan./abr., 2002.

SOEJARTO, D.D. Biodiversity, prospecting and benefit sharing: perspectives from the field. **Journal of Ethnopharmacology**, 15:1-15, 1996.

STEINER, N. **Embriogênese somática em *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze, *Pinus sylvestris* (Linneaus) e *Picea abies* (Linneaus) Karsten: ontogênese, padrão de expressão protéica e do gene SERK**. Tese de Doutorado Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 163 p., 2009.

STREET, H.E. Cell (Suspension) Cultures - Techniques. *In*: STREET, H.E. **Plant Tissue and Cell Culture**. University of California Press. Berkeley and Los Angeles. p. 61-102. 1977.

SU, Q.; ROWLEY, K.G.; BALAZS, N.D.H. Carotenoids: separation methods applicable to biological samples. **Journal of Chromatography B**. 708:393-418. 2002.

SUGIHARA, N.; ARAKAWA, T.; OHNISHI, M.; FURUNO, K. Anti- and pro-oxidative effects of flavonoids on metal-induced lipid hydroperoxide-dependent lipid peroxidation in cultured hepatocytes

loaded with alpha-linolenic acid. **Free Radicals in Biology and Medicine**, 27:1313–23, 1999.

TABARELLI, M.; CAVALCANTI, D. R. Distribuição das plantas amazônico-nordestinas no centro de endemismo Pernambuco: brejos de altitude vs. florestas de terras baixas. *In*: PÔRTO, K. C.; CABRAL, J. J. P.; TABARELLI, M. **Brejos de Altitude**: história natural, ecologia e conservação. Ministério do Meio Ambiente, Brasília. 279-290. 2004.

TABARELLI, M.; MANTOVANI, W. A riqueza de espécies arbóreas na floresta Atlântica de encosta de São Paulo (Brasil). **Revista Brasileira de Botânica**. 22:217-223. 1999.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**, 3 ed. Artmed. Porto Alegre, RS. 722p. 2004.

TAPIERO, H.; TEW, K.D.; NGUYEN Ba, G.; MATHE, G. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? **Biomed Pharmacother** 56:200-7. 2002.

TARAZI, R. **Caracterização da Estrutura Genética e Conservação de Populações Naturais de Canela –Preta (*Ocotea catharinensis* Mez.) no Estado de Santa Catarina**. Dissertação de Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 114p. 2006.

TEIXEIRA, J.B.; MARBACH, P.A.S. Otimização do Processo de Embriogênese Somática em Cacau, **Biociência e Desenvolvimento**, nº 29, p. 100-103. Disponível em: <<http://www.biociencia.com.br/revista/bio29/cacau.pdf>> Acesso em 22/03/2011.

TERMIGNONI, R.R. **Cultura de Tecidos Vegetais**. Porto Alegre: Editora da UFRGS. 2005.

TORRES, A.M.; LASTOVICKA, T.M.; REZAALYAN, R. Total phenolics and highperformance liquid chromatography of phenolic acids of avocado. **Journal Agricultural Food Chemistry**, n. 35, p. 921-925, 1987.

TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Embrapa. Serviço de Produção de Informação, 509p. 1998.

TRABELSI, E.B.; BOUZID, S.; BOUZID, M.; ELLOUMI, N.; BELFELEH, Z.; BENABDALLAH, A.; GHEZEL, R. In-Vitro Regeneration of Olive Tree by Somatic Embryogenesis, **Journal of Plant Biology**, 46(3):173-180 2003.

TRICK, H. N.; PUESCHEL, C. Cytochemical of pit plugs in *Bossiela californica* (Corallinales, Rhodophyta). **Phycologia**, 29: 403-409. 1990.

TULECKE, W.; McGRANAHAN, G.. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cotyledons of walnut, *Juglans regia* L. **Plant Science** 40:57-63, 1985.

VERPOORTE, R. Secondary metabolism. In: VERPOORTE, R.; ALFERMANN, A.W. **Metabolic engineering of plant secondary metabolism**, 1ed. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, p. 1-29. 2000.

VIANA, A.M. Somatic embryogenesis in *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae). In: BRUNS, S.; MANTELL, S.H.; TRAGARDH, C.; VIANA, A.M. (Eds.). **Recent Advances in Biotechnology for Conservation and Management**, p. 244-253. IFS, Stockholm, 1998.

VIANA, A.M.; MAZZA, C.; MANTELL, S.H.. Biotechnology: Potential Applications for the Conservation and Sustainable Exploitation of Plants from Brazilian Rain Forests. In: BENSON, E.E. **Plant Conservation Biotechnology**. Taylor and Francis Ltda., London, 1999.

VIÉGAS, R.A.; SILVEIRA, J.A.G. Ammonia assimilation and proline accumulation in young cashew plants during long term exposure to NaCl-salinity. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 11:153-159, 1999.

XIE, G.; TIMASHEFF, S.N. The thermodynamic mechanism of protein stabilization by trealose. **Biophysical Chemistry**, 64:25-43, 1997.

ZIMMERMAN, J.L. Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants. **The Plant Cell**. 5:1411-1423. 1993.

WALKER, D.R.; PARROT, W.A. Effect of polyethylene glycol and sugar alcohols on soybean somatic embryo gemination. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, n. 64:55-62, 2001.

WEEKS, W.W. **Em Biogenesis of Aromas**; Parliament, T. H.; Croteau, R., eds.; American Chemical Society: Washington D. C., 1986.

WILLIAMS, E.G.; MAHESWARAN, G. Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. *Annals of Botany*. 57:443-462. 1986.

YANG, J.; YEN, H.E. Early salt stress effects on the changes in chemical composition in leaves of ice plant and *Arabidopsis*: a Fourier Transform infrared spectroscopy study. **Plant Physiology**, vol. 130: 1032 – 1042. 2002.

YEUNG, E. C. Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis. *In*: THORPE, T. A. ***In vitro* embryogenesis in plants**. Dordrecht: Kluwer Academic, p.205-248. 1995.