PROPOSICAO DE UM PROTOCOLO DE CULTURA DE TECIDOS
PARA PRODUCAO DE COMPOSTOS SECUNDARIOS
PARA *Curcuma zedoaria* Roscoe.

JEANETTE INAMINE MIACHIR

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Fevereiro - 1992

PROPOSICAO DE UM PROTOCOLO DE CULTURA DE TECIDOS
PARA PRODUCAO DE COMPOSTOS SECUNDARIOS
PARA *Curcuma zedoaria* Roscoe.

JEANETTE INAMINE MIACHIR

Bióloga

Orientador: Prof. Dr. Otto Jesu Crocomo

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica de Plantas.

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Fevereiro - 1992

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCLQ/USP

M618p Miachir, Jeanette Inamine
Proposição de um protocolo de cultura de tecidos
para produção de compostos secundários para *Curcuma*
zedoaria Roscoe. Piracicaba, 1992.
126p.

Diss. (Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Planta medicinal 2. Zedoária - Cultura de tecidos 3. Zedoária - Cultivo "in vitro" 1. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 633.88

PROPOSICAO DE UM PROTOCOLO DE CULTURA DE TECIDOS
PARA PRODUCAO DE COMPOSTOS SECUNDARIOS
PARA *Curcuma zedoaria* Roscoe.

JEANETTE INAMINE MIACHIR

Aprovada em: 03/04/1992

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Otto Jesu Crocomo	ESALQ/USP
Prof. Dr. Avelino Rodrigues de Oliveira	UNICAMP
Prof. Dr. Murilo Melo	ESALQ/USP

Prof. Dr. Otto Jesu Crocomo
Orientador

A meus pais Nobur e Mitsuco,
avós Choju e Uto,
irmãos Mauro, Jorge e Marisa

OFEREÇO...

A Elio

DEDICO...

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Otto Jesu Crocomo pela orientação, oportunidade concedida e estímulo constante.

Ao Prof. Dr. Murilo Melo pelo incentivo, valiosas sugestões, e constante contribuição para minha formação profissional.

Ao Prof. Dr. Avelino Rodrigues de Oliveira, pela minha iniciação na pesquisa científica.

Ao Prof. Dr. Darcy Martins Silva, pela orientação durante meu estágio no CENA.

Aos membros do Departamento de química Orgânica (USP - São Paulo) : Prof. Dr. Massayoshi Oshida, Prof. Dr. Massuo Kato, Norberto Peporine Lopes e Maria Cristina Vidigal, pelas análises químicas.

A Antônio F. C. Amaral e Ênio Thiago de Oliveira pelo auxílio técnico prestado.

A Romeo A. Rocha pela elaboração de gráficos tabelas e ilustrações.

A Maria Solizete Granziol pela eficiência e disposição constante em ajudar.

A Vera Romani pelo companheirismo e assessoria na utilização da técnica de micorrização.

A Sandra Tabai e Marina Murayama pelo estímulo, cooperação e amizade.

Aos professores Luis Antonio Gallo e Helaine Carrer pela colaboração e incentivo.

Aos pesquisadores e colegas de Pós-Graduação : Carlos, Victor, Fernando, Leonardo, Eri, Denise, Graça e Chaddad, pelo companheirismo.

Ao CEBTEC que possibilitou a execução do trabalho experimental em agradável convivência.

A Eraldo Negri de Oliveira pelos serviços de fotografia.

A FAPESP pelo auxílio financeiro.

Ao CNPq e CNEN pela concessão de bolsa de estudo.

A todos que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	página
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xvi
RESUMO.....	xvii
SUMMARY.....	xx
 1. INTRODUÇÃO.....	 1
 2. REVISÃO DE LITERATURA.....	 4
2.1. Metabolismo primário e secundário em plantas.....	 4
2.2. Plantas: fonte de fármacos importantes.....	7
2.3. Cultura de tecidos de plantas medicinais.....	11
2.3.1. Considerações gerais.....	11
2.3.2. Micropropagação.....	13
2.3.3. Micorrização no processo de aclimação de plântulas.....	 14
2.3.4. Organogênese.....	16
2.3.5. Cultura de células em suspensão.....	18
2.3.5.1. Considerações gerais.....	18
2.3.5.2. Fatores fisiológicos.....	27
a. Regime nutritivo.....	28

	página
b. Fitorreguladores.....	29
c. Valor ph.....	30
d. Luz.....	31
e. Temperatura.....	32
2.3.5.3. Aspectos visando a otimização da produtividade.....	33
a. Imobilização.....	33
b. Biotransformação.....	35
2.4. Zedoária.....	36
2.4.1. Aspectos gerais.....	36
2.4.2. Compostos encontrados em zedoária.....	39
2.4.3. Cultura de tecido de zedoária.....	43
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	46
3.1. Obtenção dos explantes.....	46
3.1.1. Assepsia dos explantes.....	48
3.1.1.1. Discos de tecido do rizoma.....	48
3.1.1.2. Ápices caulinares.....	49
3.2. Meio de cultura básico e condições de cultivo....	50
3.3. Micropropagação.....	51
3.3.1. Teste de fitorreguladores (BAP e NAA).....	51
3.3.2. Teste da idade fenológica do explante.....	52
3.3.3. Aclimação.....	54

	página
3.4. Produção de calos.....	55
3.4.1. Cultivo de discos de tecido de rizoma.....	55
3.4.2. Testes de tipo de explante, fitorreguladores (2,4-D e NAA) e influência da luz.....	56
3.5. Cultura de suspensões celulares.....	58
3.5.1. Curva de crescimento.....	59
3.5.2. Aplicabilidade do teste de tetrazólio na avaliação do crescimento de células em suspensão.....	60
3.6. Organogênese indireta	61
3.7. Análise química	61
3.7.1. Reagentes e padrões.....	61
3.7.2. Instrumentação.....	61
3.7.3. Obtenção dos extratos.....	62
3.7.4. Análise dos extratos por cromatografia planar.....	63
3.7.5. Análise por cromatografia líquida de alta eficiência.....	63
3.7.6. Análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa.....	64

	página
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	65
4.1. Micropropagação.....	65
4.1.1. Efeito de fitorreguladores (BAP e NAA).....	65
4.1.2. Seleção da melhor idade fenológica para ápices caulinares.....	71
4.1.3. Aclimação.....	77
4.2. Produção de calos.....	86
4.2.1. Cultivo de discos de tecido do rizoma.....	86
4.2.2. Testes de tipos de explantes, fitorregula- dores (2,4-D e NAA) e influência da luz.....	86
4.3. Cultura de células em suspensão.....	96
4.3.1. Curva de crescimento.....	96
4.3.2. Aplicabilidade do uso de tetrazólio na avaliação de crescimento de células em suspensão.....	98
4.4. Organogênese indireta	100
4.5. Análise química	103
5 CONCLUSÕES.....	113
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	115

LISTA DE FIGURAS.

figura	página
1. Origem biossintética de alguns compostos derivados de plantas comercialmente importantes.....	6
2. Esquema geral da cultura de células "in vitro" para produção de compostos secundários.....	21
3. Modelo de curva de crescimento de células em suspensão relacionando o aumento do número de células em função do tempo.....	22
4. Metodologia geral do cultivo de células de zedoária (micropropagação, produção de calos, embriogênese, cultivo de suspensões celulares e análise química do material vegetal).....	47
5. Brotos em diferentes fases do desenvolvimento testados como fonte de explante (ápice caulinar) para micropropagação (a. gema; b. broto jovem; c. broto desenvolvido; d. planta adulta).....	53
6. Diferentes partes da planta de zedoária obtida "in vitro" que foram testadas como explante para produção de calos.....	57
7. Esquema dos tipos morfogênéticos obtidos nos tratamentos com interação BAP e NAA.....	66
8. Relação entre explantes que micropropagaram e explantes que não micropropagaram nos tratamentos de interação BAP e NAA.....	68
9. Porcentagem de ocorrência do tipo morfogênético G (micropropagação) nos tratamentos de interação de BAP e NAA.....	69

10. Taxas de micropropagação (número de brotos/ explante) provenientes dos tratamentos de interação de BAP e NAA.....	69
11. Massa de matéria seca produzida por explantes (ápice caulinar) provenientes de brotos com diferentes idades fenológicas em função do tempo de cultivo.....	72
12. Porcentagem de micropropagação em função do tempo de cultivo de ápices caulinares provenientes de diferentes idades fenológicas.....	72
13. Estágios da fase "in vitro" do processo de micropropagação (a. início do brotamento; b. de- senvolvimento dos brotos; c. enraizamento).....	75
14. Detalhe da formação de brotos na região basal da plântula.....	75
15. Estágio final da fase "in vitro" do processo de micropropagação: plantinhas completas com sistema radicular desenvolvido, prontas para aclimação..	76
16. Efeito da idade da plântula, do tempo de cobertura plástica e do tratamento do substrato com micorriza (sem micorriza), após 50 dias de cultivo	79
17. Efeito da idade da plântula, do tempo de cobertura plástica e do tratamento do substrato com micorriza (com micorriza), após 50 dias de cultivo	80
18. Efeito do tratamento com micorriza no desenvolvimento das plântulas cobertas com plástico a 0, 10 e 20 dias, após 50 dias de cultivo.....	81

19. Efeito do tratamento com micorriza no tamanho do sistema radicular e da parte aérea das plântulas do tipo III, cobertas com plástico por durante 0 e 10 dias, após 50 dias de cultivo	82
20. Efeito do tratamento do substrato com endomicorriza e do tempo de cobertura no pegamento das plantas no processo de aclimação.....	83
21. Apices caulinares cultivados em meios de cultura contendo diferentes concentrações de NAA e 2,4-D em condições de luz e de escuro após 50 dias de cultivo.....	88
22. Apices radiculares cultivados em meios de cultura contendo diferentes concentrações de NAA e 2,4-D, em condições de luz e escuro após 50 dias de cultivo.....	90
23. Segmentos da região mediana da raiz em meios de cultura contendo diferentes concentrações de NAA e 2,4-D, em condições de luz e escuro após 50 dias de cultivo.....	92
24. Calos obtidos do cultivo da porção mediana da raiz e meio de cultura contendo 1 mg/l de NAA e condições de escuro.....	93
25. Produção de calos a partir de ápice caulinar em meio básico MS suplementado com 1,0 mg/l de NAA...	94
26. Curva de crescimento de células de zedoária em suspensão - massa de matéria fresca em função do tempo de cultivo	97
27. Curva de leitura de absorbância do teste com tetrazólio (leitura à 485 nm) em função da concentração celular (mg).....	99

28. Fase inicial da organogênese com formação de regiões clorofiladas e de primórdios foliares.....	101
29. Detalhe da organogênese indireta apresentando regiões de calos com aspecto friável, regiões clorofiladas (em início de diferenciação celular) e primórdios foliares.....	101
30. Desenvolvimento de parte aérea com definição de folhas	102
31. Formação de parte aérea com presença de folhas expandidas.....	102
32. Plântulas completas (parte aérea com folhas expandidas e sistema radicular) individualizadas, com crescimento normal.....	103
33. Cânfora padrão separada por HPLC.....	105
34. Substâncias químicas do extrato diclorometânico de rizoma da planta original separadas por HPLC.....	106
35. Substâncias químicas do extrato diclorometânico de rizoma de planta micropropagada separadas por HPLC.....	107
36. Cânfora padrão separada por cromatografia gasosa...	108
37. Substâncias químicas do extrato diclorometânico de rizoma de planta original separadas por cromatografia gasosa.....	109
38. Substâncias químicas do extrato diclorometânico de rizoma da planta micropropagada separadas por cromatografia gasosa	110
39. Substâncias químicas do extrato diclorometânico de calos separadas por cromatografia gasosa.....	111
40. Substâncias químicas do extrato diclorometânico de folhas separadas por cromatografia gasosa.....	112

LISTA DE TABELAS

tabelas	página
1. Sais componentes e suplementação para a constituição do meio básico MS.....	51
2. Classificação das plântulas obtidas "in vitro" utilizadas para teste de aclimação.....	54
3. Porcentagem de micropropagação e massa de matéria seca dos explantes obtidos durante o cultivo de 90 dias.....	71
4. Taxa de micropropagação e massa de matéria seca dos brotos obtidos após 60 e 90 dias de cultivo..	71
5. Massa de matéria seca produzida pelas plantas aclimatadas provenientes dos diversos tratamentos.....	85
6. Produção de calos utilizando-se diferentes partes da plântula como explante e meios de cultura contendo diferentes concentrações de NAA, cultivados na presença de luz ou no escuro.....	95

LISTA DE ABREVIATURAS

- MS..... Sais nutrientes de MURASHIGE & SKOOG (1962) com
suplementação de vitaminas usado como meio
básico.
- 2,4-DÁcido 2,4 - diclorofenoxiacético.
- NAAÁcido naftaleno acético.
- BAP6 - benzilaminopurina.
- CinCinetina.
- HPLC.....Cromatografia líquida de alta eficiência.
- VAM.....Fungo endomicorrízico vesículo arbuscular.

PROPOSICAO DE UM PROTOCOLO DE CULTURA DE TECIDOS
PARA PRODUCAO DE COMPOSTOS SECUNDARIOS
PARA *Curcuma zedoaria* Roscoe.

Autora: JEANETTE INAMINE MIACHIR

Orientador: Prof. Dr. OTTO JESU CROCOMO

RESUMO

Plantas superiores biossintetizam e acumulam inúmeros compostos que garantem a sua sobrevivência. Entre esses compostos estão os metabólitos secundários os quais possuem relevante valor comercial como produtos medicinais, aromatizantes, corantes, óleos essenciais, pesticidas, enzimas, etc.

Apesar do interesse em se explorar esta fonte de maneira mais extensiva, existem vários fatores como presença em baixa concentração, biossíntese dependente da interação planta - habitat, localização geográfica da planta, etc que inviabilizam a exploração comercial deste recurso natural. Adicionalmente, a produção no campo está sujeita a fatores diversos como condições climáticas,

problemas fitossanitários , sazonalidade etc. Com o advento das técnicas de cultivo "in vitro" novas perspectivas se abriram tornando possível a produção de mudas a partir de matrizes selecionadas, que apresentam alta produtividade de compostos secundários desejáveis, a regeneração de plantas geneticamente modificadas (variantes somaclonais) via organogênese e/ou embriogênese e a utilização de cultura de células em suspensão para biossíntese de metabólitos por processos similares aos fermentativos que ocorrem em microrganismos.

Neste trabalho foram estudados alguns aspectos da utilização de cultura de tecido "in vitro" visando a micropropagação com vista a produção de compostos secundários por *Curcuma zedoaria* Roscoe, que apresenta propriedade medicinal.

Micropropagação a partir de ápice caulinar utilizando-se meio de MURASHIGE & SKOOG (1962) suplementado com BAP na concentração de 2 mg/l resultou na obtenção de plântulas que foram satisfatoriamente aclimatadas em casa de vegetação utilizando-se cobertura plástica por durante no mínimo 10 dias. Tratamento com endomicorriza durante a aclimação mostrou resultados positivos. Produção de calos foi obtida a partir de segmentos de raízes em meio de MURASHIGE & SKOOG contendo 1mg/l de NAA, no escuro. Calos friáveis transferidos para meio de MURASHIGE & SKOOG suplementado com 2mg/l de BAP em presença de luz, apresentou organogênese com regeneração de plantas. Cultivo de

suspensões celulares foi estabelecida no mesmo meio para a produção de calos (1mg/l de NAA). A análise química dos extratos de rizomas, de plantas micropropagadas e não micropropagadas apresentaram resultados similares. Nos extratos de calos observou-se a ausência de vários compostos que estavam presentes no rizoma da planta original mas presença de outros compostos ausentes no rizoma da planta original.

SUGGESTION OF A TISSUE CULTURE PROTOCOL FOR
SECONDARY COMPOUNDS PRODUCTION
FOR *Curcuma zedoaria* Roscoe.

Author: JEANETTE INAMINE MIACHIR

Adviser: Dr. OTTO JESU CROCOMO

SUMMARY

Higher plants synthesize and accumulate an array of organic compounds to assure their survival. Among these compounds are the secondary compounds which present considerable commercial value, mainly as medicinal, flavoring and food coloring products, as well as, essential oils, pesticides and enzymes.

In spite of the great interest in exploring, more extensively, this natural resource there exist several factors as presence of chemicals in low concentration, interaction plant habitat biosynthesis dependence, geographical location of the plant specie that cause unfeasibility of its commercial exploration. Additionally,

the field production is affected by others factors such as climatical conditions, phytopathological and seasonal problems, etc. With the advent of the "in vitro" techniques, new alternatives were created becoming possible the production of new plants showing high yield potential by using selected source of explants, as well as, the obtention of genetical modified plants (somaclonal variants) by organogenesis and/or embryogenesis to produce secondary metabolites.

In this work, it was studied the feasibility of the utilization of tissue culture techniques toward to establish a procedure to exploite the secondary metabolites of *Curcuma zedoaria* Roscoe which present medicinal properties.

Micropropagation by using shoot apex and Murashige & Skoog medium supplemented wich 2mg/l of benzyl amino purine (BAP) resulted on obtention of plantlets which were satisfactory acclimated in greenhouse by using plastic cover for at least 10 days. Treatment with endomycorrhiza at the "ex vitro" transferring time was benefical to acclimatation and plants growth.

Callus production was obtained by inoculating root segments in Murashige & Skoog medium containing 1mg/l of naphthalene acetic acid (NAA) and incubated in the dark. Friable callus transfered to Murashige and Skoog medium containing 2 mg/l of BAP in the light showed organogenesis with plants regeneration.

Cells suspension cultures was established in Murashige & Skoog medium containing 1mg/l of NAA.

Chemical analysis of extracts from rhizome of original and micropropagated plants showed a similar results. Callus extract showed absence of metabolites which were present in original plant rhizome, but showed presence of metabolites not present in plant rhizome.

1. INTRODUÇÃO.

Muitas espécies de plantas superiores biossintetizam e acumulam substâncias orgânicas em quantidades suficientes que permitem ser economicamente úteis como fonte de alimento ou como material para várias aplicações científicas, tecnológicas e comerciais. As substâncias químicas provenientes de plantas que tem sido utilizadas como remédios, cosméticos, antioxidantes na conservação de alimentos, adoçantes, óleos essenciais, e outros são denominados metabólitos secundários. Na planta, estes compostos não estão diretamente envolvidos com o seu crescimento, mas estão fisiológico e bioquimicamente relacionados às respostas da planta ao ambiente. Estas respostas podem estar associadas ao processo de resistência a estresse ambiental, atração de agentes polinizadores, etc...

Com o advento da síntese química no século passado, muitos compostos fitoquímicos passaram a ser substituídos por similares sintéticos. Entretanto, economicamente, a síntese química de vários compostos

importantes não é factível, devido a casos de baixa conversão química ou, essas substâncias muitas vezes serem resultado de uma mistura complexa de compostos, portanto em muitos casos o material vegetal continua sendo o meio mais conveniente de obtenção . Além disso, o que se observa é que apesar de muitos substitutos sintéticos estarem disponíveis no mercado, existe uma demanda crescente por produtos naturais.

Por outro lado, muitas das plantas, principalmente as que apresentam biossíntese de compostos farmacológicos importantes, fazem parte de populações selvagens ou quando cultivadas não apresentam quantidades significantes dos compostos desejados ou são afetadas por condições climáticas além das doenças de planta. Estes fatores dificultam sobremaneira o fornecimento em quantidade e qualidade desses produtos por se tratar de um mercado bastante exigente.

As desvantagens apresentadas podem ser contornadas pela metodologia de cultura de células "in vitro" as quais são metodologias atraentes e importantes para se ter um suprimento constante e homogêneo (CROCOMO & MELO, 1991).

Pelo menos duas alternativas podem ser visualizadas para a utilização de material vegetal como fonte de metabólitos secundários, empregando-se as técnicas de cultura de tecido de planta: uma delas é a micropropagação de plantas selecionadas e posterior cultivo

em condições especiais, a outra alternativa é a cultura de células e tecidos em suspensão, em presença de condições para que metabólitos secundários sejam produzidos e em certos casos secretados no meio de cultura, quando então são extraídos, purificados e comercializados.

Como se pode observar, a abordagem do tema da exploração comercial de plantas de importância medicinal é bastante complexa. Assim sendo, o objetivo deste trabalho foi de estudar um conjunto de aspectos tecnológicos utilizando *Curcuma zedoaria* Roscoe como uma representante da população de plantas que produzem metabólitos secundários de interesse comercial, a definição de um protocolo de micropropagação (produção de plântulas e aclimação em casa de vegetação), a obtenção de calos para estabelecimento de cultura de suspensões celulares, a organogênese indireta a partir de calos visando a variação somaclonal e, análise química de alguns metabólitos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Metabolismo primário e secundário em plantas.

Plantas superiores contêm uma variedade de substâncias químicas que são importantes como produtos medicinais, aromatizantes, perfumes, corantes, antioxidantes na conservação de alimentos, adoçantes naturais, óleos essenciais, pesticidas, enzimas, etc... Estes compostos pertencem a um grande grupo de metabólitos denominado "metabólitos secundários". Segundo BALANDRIN & KLOCKE (1988), os compostos orgânicos derivados de plantas podem ser classificados como pertencentes ao metabolismo primário ou ao metabolismo secundário, dependendo do papel que desempenham na vida da planta.

Os metabólitos primários são substâncias que estão amplamente distribuídas na natureza, ocorrendo de uma forma ou outra em quase todos os organismos. Em plantas superiores, estes compostos estão frequentemente concentrados nas sementes (ex: triglicerídeos) e órgãos de reserva (amido e sacarose em raízes, rizomas e tubérculos).

São compostos necessários ao crescimento geral e desenvolvimento fisiológico devido a sua função no metabolismo celular básico (primário).

Estas substâncias são utilizadas como matéria prima na indústria, como alimento ou como aditivo em alimentos. Neste grupo, estão incluídos produtos como os óleos vegetais, ácidos graxos (usados na fabricação de detergentes), carboidratos (açúcar, amido, pectina, várias gomas hidrocoloidais, celulose). A maioria é facilmente encontradas no mercado (BALANDRIN & CLOCKE, 1988).

Por outro lado, os metabólitos secundários são compostos biossinteticamente derivados dos metabólitos primários (Fig 1), entretanto, possuem distribuição limitada no reino vegetal (BALANDRIN & KLOCKE, 1988; WHITAKER & EVANS, 1987). São compostos de baixo peso molecular e normalmente de estrutura complexa (FOWLER, 1982). Embora aparentemente não desempenhem nenhum papel no metabolismo "básico" da planta (uma vez que eles não são diretamente essenciais ao crescimento) os compostos secundários normalmente desempenham função ecológica no processo de interação da planta com o ambiente, sendo portanto, importantes para a sobrevivência dos vegetais (BELL, 1981).

Metabólitos secundários de plantas podem servir como atrativos de agentes polinizadores (insetos, pássaros, pequenos roedores e outros mamíferos); podem

Figura 1. Origem biossintética de alguns compostos derivados de plantas comercialmente importantes (maiores grupos de metabólitos secundários estão indicados nos quadros) (BALANDRIN & KLOCKE, 1988).

também representar adaptações químicas a estresse ambiental; podem servir como defensivos protetores, ou seja, como substâncias tóxicas contra microrganismos, insetos ou herbívoros predadores e também contra outras plantas superiores (por exemplo: como aleloquímico ou herbicida natural) (BELL, 1981; WHITAKER & HASHIMOTO, 1986).

Com relação a economia celular, os metabólitos secundários são geralmente dispendiosos metabolicamente para serem produzidos e acumulados, portanto estão presentes nas plantas geralmente em quantidades extremamente baixas em comparação aos metabólitos primários (BALANDRIN & CLOCKE, 1988).

Na natureza, o acúmulo de grandes quantidades de metabólitos secundários não é normalmente necessário, uma vez que esses compostos foram selecionados por meio de pressões evolutivas, apresentando-se com atividade biológica relativamente potente. Além disso, metabólitos secundários tendem a ser sintetizados por células especializadas e em diferentes fases do desenvolvimento, fazendo com que sua extração, isolamento e purificação sejam difíceis (BALANDRIN & CLOCKE, 1988).

2.2. Plantas: fonte de fármacos importantes.

O homem primitivo certamente experimentava as

plantas do seu ambiente, selecionando algumas para sua alimentação e rejeitando outras por serem prejudiciais ou tóxicas e transmitia a experiência acumulada. Este método de tentativa e erro, ou forma empírica de aquisição de conhecimento não deve ser desprezado; basta lembrar que assim surgiram descobertas fundamentais para a sobrevivência do homem, como o cultivo do trigo, milho, arroz, etc... (SIMÕES et alii, 1986).

Plantas com propriedades terapêuticas foram, na sua grande maioria, descobertas empiricamente; sabe-se que uma certa espécie, preparada e ingerida de maneira específica, tem uma determinada ação terapêutica. A partir desta concepção, as informações etnofarmacológicas são usadas como ponto de partida para o delineamento experimental que visa o estudo da espécie como fonte potencial de fármaco. Assim, a partir da análise de dados etnográficos sobre o uso de plantas medicinais, estabelecem-se hipóteses de trabalho em laboratório. Ou seja, qual ação farmacológica tem o maior potencial de revelar dados que corroborem a indicação popular (ELISABETSKY, 1987).

Com base nestes conhecimentos acumulados pela medicina popular foram desenvolvidos alguns dos mais valiosos medicamentos utilizados na medicina científica, os digitálicos, a quinina, a morfina, a atropina, etc...

Por séculos o homem utiliza extensivamente os produtos secundários de plantas como aromatizantes, óleos essenciais, corantes, perfumes, compostos medicinais, adoçantes, etc... Embora todos esses compostos possam ser economicamente explorados em vários tipos de indústrias, atualmente é na indústria farmacêutica que eles apresentam maior impacto.

Segundo estimativa da Organização Mundial de Saúde (OMS), 80 % da população mundial usa medicações tradicionais (populares) para suprir as necessidades de assistência médica primária. Nos países desenvolvidos, as drogas químicas derivadas de plantas também desempenham um papel importante na composição dos medicamentos. Por exemplo, nos EUA, 25% de todas as receitas médicas de 1959-1980 continham extratos de plantas ou princípios ativos preparados de plantas superiores, e em 1980 os consumidores americanos gastaram US\$ 8 bilhões em receitas médicas que continham compostos obtidos a partir de espécies vegetais. Em torno de 7.000 compostos atualmente utilizados na medicina moderna são derivados de produtos naturais. Em países altamente industrializados, 40-45 % dos produtos farmacêuticos comerciais são de origem natural (ELISABETSK 1986 e 1987).

Tradicionalmente, o reino vegetal é fonte de remédios e poções, vários dos quais de eficiência duvidosa,

entretanto, 25% das drogas prescritas e altamente purificadas são derivadas do reino vegetal, incluindo agentes terapêuticos valiosos como digoxina (glicosídeo cardiotônico), quinina (alcalóide anti-malária) e codeína (alcalóide analgésico) (FOWLER, 1982; TYLER, 1988; WHITAKER & HASHIMOTO, 1986; BAJAJ et alii, 1988).

Segundo FUJITA & TABATA (1987), entre 1980 e 1984, foram emitidas no Japão, 39 patentes para utilização de compostos químicos vegetais; 32 das quais (82%) foram para produtos secundários com propriedades medicinais.

BALANDRIN & KLOCKE (1988), alertam que apesar dos recentes avanços da tecnologia de extração, técnicas de separação (cromatografia), instrumentação analítica e espectroscópica, sabe-se ainda muito pouco sobre o metabolismo secundário da maioria das espécies de plantas superiores existentes, especialmente, as presentes nas florestas tropicais. Embora os trópicos contenham a maioria das espécies de planta do mundo, estima-se que mais da metade dessas são desconhecidas da ciência (nunca foram descritas), e que a maioria nunca teve seus constituintes químicos analisados. Segundo GOTTLIEB & MORS (1980), nada se sabe do aspecto químico de 99% das espécies de plantas que constitui a flora brasileira. O mesmo ocorrendo com a maioria das florestas dos países da América Latina.

Esta falta de conhecimento torna-se

alarmante, quando se observa a atual taxa de extinção e devastação da flora e ecossistemas tropicais, antes que se tenha feito um estudo adequado e catalogamento destas plantas. Se continuar essa destruição, fitoquímicos e outros cientistas de plantas podem ter apenas algumas décadas para avaliar os constituintes químicos de uma grande parte do reino vegetal para novos compostos potencialmente úteis.

2.3. Cultura de tecido de plantas medicinais.

2.3.1. Considerações gerais.

Os altos preços dos metabólitos secundários são devido a dois fatores principais: o alto custo dos métodos para isolamento e purificação e produção extremamente baixa pela planta.

Quando se trata de compostos simples, tem se tentado produzi-los através de síntese química. Muitas vezes, este procedimento tem se mostrado desestimulante devido a baixa produção, alto custo, dificuldade na conversão química, ou a necessidade de método eficiente para purificação de um isômero particular a partir de uma mistura complexa. Na maioria dos casos os metabólitos secundários possuem estereoestruturas extremamente complexas que são essenciais à atividade biológica.

As técnicas atuais de engenharia genética utilizando microorganismos também ainda não estão em condições de serem utilizadas. Portanto, em muitos casos a própria planta continua sendo o meio mais conveniente de obtenção.

Apesar da importância de certos compostos secundários, atualmente encontram-se dificuldades em se garantir o seu fornecimento. A grande maioria das plantas que produz esses metabólitos não está ainda estabelecida como cultura, com raríssimas exceções (*Papaver somniferum*, *P. bracteatum*, *Digitalis lanata*, *Chamomilla recutita*, *Mentha piperita* e *Cinchona spp*) (TYLER, 1988); a maioria faz parte, geneticamente falando, de uma população selvagem, sendo portanto uma fonte esgotável de recursos. Além disso, o extrativismo não garante a quantidade e nem a qualidade do produto de acordo com a exigência do mercado. Também, por outro lado, tem se observado, que em alguns casos, o processo de domesticação dessas plantas leva à baixa produção ou mesmo a não síntese do composto desejado, devido a não reprodutibilidade das condições ideais de síntese (ex: *Pilocarpus spp* e *Catharanthus spp*).

As técnicas de cultura de tecido de plantas apresenta-se como importante abordagem biotecnológica para viabilizar a exploração deste potencial natural de recursos de maneira racional. Esta pode ser utilizada, a princípio,

com duas alternativas: a) micropropagação e cultivo em condições especiais de plantas altamente produtivas; b) o cultivo de células em suspensão visando a síntese do composto secundário "in vitro" de maneira similar a métodos fermentativos utilizados com microorganismos. Ambas as alternativas se complementam e podem ser utilizadas concomitantemente, bem como a indução de produção de embriões somáticos em calos embriogênicos.

2.3.2. Micropropagação.

Segundo BAJAJ (1988), durante os últimos anos, o interesse na propagação em massa de plantas medicinais "in vitro" tem aumentado sensivelmente, por que muitas destas plantas quando propagadas por métodos convencionais apresentam longo tempo para multiplicação, baixa taxa de estabelecimento de frutos, baixa taxa de germinação de sementes ou estão frequentemente sob proteção ou ameaçadas de extinção.

A alternativa para esta situação é a rápida multiplicação "in vitro" de plantas e cultivo sob condições especiais, com as seguintes vantagens: a) Aumento da taxa de multiplicação de plantas; b) Rápida multiplicação de plantas que em determinadas condições não produzem sementes ou cujas sementes apresentam baixa capacidade de germinação; c)

Disponibilidade de plantas durante o ano todo, independente da estação do ano; d) Resistência de plantas a insetos, doenças e herbicidas; e) Plantas uniformes de genótipo selecionado; f) Produção de plantas com genótipo alterado (tetraplóides, haplóides, híbridos); g) Conservação de recursos genéticos de espécies de plantas ameaçadas de extinção; h) Melhoramento de plantas pela técnica de regeneração juntamente com manipulação de células "in vitro"

i) Possibilidade de manipulação das vias metabólicas visando aumento de síntese de compostos específicos.

2.3.3. Micorriza e aclimação de plântulas.

Pelas informações bibliográficas observa-se que a maioria das plantas cultivadas tem sido avaliada quanto a possibilidade de formação de micorrizas (associação entre raízes de plantas e várias espécies de fungos formando uma simbiose) e apresentaram resultados positivos mostrando que esta associação pode ser benéfica à planta.

Existem muitas evidências que sugerem que a associação de raízes de planta hospedeira com fungos micorrízicos vesículo-arbuscular refletem em melhor desenvolvimento da planta principalmente quando o sistema radicular é deficiente (MOSSE, 1986; MILLER, 1987)

Foram feitos estudos em laboratórios (POPE et

alii, 1983; GRAHAN & SYVERTSEN, 1985; HENDRICK et alii, 1988) utilizando-se plantas individuais para correlacionar a morfologia do sistema radicular e a eficiência de colonização dos fungos micorrízicos e concluíram que quanto mais pobre o sistema radicular maior a dependência de colonização micorrízica, principalmente em solos deficientes. No campo ST JOHN (1980), ANDERSON & LIBERTA (1987) e BRUNDRETT & KENDRICK (1988) tentaram relacionar a morfologia do sistema radicular e a dependência micorrízica.

Existem muitas dificuldades em se estudar a influência da morfologia do sistema radicular pois estes podem diferir dependendo da época do ano, tipo de solo, temperatura, etc...

A infecção radicular por fungo micorrízico vesículo-arbuscular (MVA) pode aumentar a eficiência de absorção de nutrientes, favorecendo o crescimento da planta micorrizada, principalmente quando existe baixa disponibilidade de fósforo no solo (KOIDE, 1991).

Esta associação também pode alterar a relação planta : água, promovendo uma recuperação muito rápida provocada pelo estresse hídrico com grande extração de água do solo, mesmo quando o potencial hídrico está baixo (SAFIR, et alii, 1971, HARDIE & LEYTON, 1981). Estas modificações no comportamento do sistema radicular da planta pode ser atribuído à alta condutividade hidráulica das raízes de

plantas micorrizadas, que também modificam o tamanho da planta quando se compara uma planta micorrizada com uma não micorrizada (HARDIE & LEYTON, 1981; SAFIR & NELSEN, 1985).

O potencial de utilização de VAM em sistemas de produção agrícola e em particular na aclimação de plantas micropropagadas já tem sido demonstrado (BRANZANTI et alii, 1990; RAVOLANIRINA et alii, 1990) utilizando-se plantas de espécies temperadas. Muito pouco tem sido feito para espécies tropicais, principalmente utilizando-se plantas micropropagadas (BLAL & GIANINAZZI-OPEARSON, 1990). Nos trópicos a produção é frequentemente limitada pela deficiência de P que os solos apresentam (assim como N e água), principalmente devido a alta fixação do fosfato, onde a associação micorrízica poderia atuar com sucesso.

2.3.4. Organogênese.

Na natureza, este processo ocorre nas plantas para regeneração de partes perdidas, por exemplo na regeneração de parte aérea e raízes quando estas são destacadas. A organogênese natural está sob controle hormonal. O principal mecanismo que determina se ocorrerá desenvolvimento de parte aérea ou raízes é a proporção de auxina e citocinina. A auxina é produzida na região apical e citocinina, no sistema radicular. A perda do sistema

radicular leva ao aumento da taxa auxina/citocinina e estimula a formação de novas raízes, por outro lado a perda do ápice caulinar, reduz a taxa de auxina/citocinina e estimula o crescimento de brotos (GOLDSWORTHY, 1988).

Em cultura de tecido, este mesmo mecanismo controla a organogênese. Altas concentrações de auxina (por exemplo 2,4-D e NAA) causam a desdiferenciação e formação de calos, diminuição na taxa de auxina/citocinina (por exemplo cinetina e BAP) em calos, pode induzir organogênese. Este fenômeno foi descoberto por Skoog & Miller em 1957 (GOLDSWORTHY, 1988).

A composição celular de calos tem sido demonstrado ser citologicamente bastante heterogênea. É comum a ocorrência de células ou grupos de células meristematicamente ativas. Estas células são as precursoras de órgãos (parte aérea ou raízes). O nível de ploidia em calos também pode variar tremendamente (TISSERAT, 1985).

O sucesso de muitas técnicas "in vitro" utilizando-se plantas superiores (fusão de protoplastos, isolamento de mutantes, engenharia genética etc...) depende do sucesso de regeneração da planta (FLICK, et alii, 1983).

Um outro aspecto da organogênese também bastante explorado é a regeneração de plantas a partir de cultura de tecido indiferenciado (calos) como fonte de variabilidade genética. Este processo é definido como

variação somaclonal.

2.3.5. Cultura de células em suspensão.

2.3.5.1. Considerações gerais.

A manipulação de células vegetais "in vitro" apresentou ao longo das últimas 3 décadas excelente progresso. No início, toda abordagem em relação à cultura de células não era muito reproduzível. A composição do meio não era muito elaborada e frequentemente mal definida. O meio típico consistia de sais minerais, suplementos orgânicos tais como sacarose, tiamina, glutathione, cisteína e ácido indol acético. Em vários casos, eram utilizados água de coco (líquido do endosperma do coco), que apresenta composição variável.

Durante o período de 1940-1960, foi conseguido progresso constante para o entendimento do sistema de cultura de células de plantas. Informações mais detalhadas sobre fisiologia e bioquímica do crescimento de células em cultura em suspensão começaram a ser publicadas e os estudos sobre síntese de produtos naturais tornou-se mais intenso.

Na década seguinte (1960-1970), foram estabelecidos e definidos meios de cultura e as taxas de

crescimento aumentadas, foram identificadas culturas que poderiam sintetizar substâncias características da planta e ocorreram também progressos na cultura de células em larga escala e houve sensível melhora do conhecimento de bioquímica e fisiologia.

Assim, estudos de produção de metabólitos de plantas via calos e cultura de células em suspensão tem sido feitos em escala crescente desde o fim dos anos 50. O cultivo em larga escala de células de tabaco e células de uma variedade de leguminosa foi experimentado no final da década de 1950 e no início de 1960. Os resultados estimularam muito os estudos da aplicação industrial da cultura de células e de tecidos de plantas em vários países.

O Japão possui uma tecnologia de fermentação altamente desenvolvida, muitas companhias, em colaboração com pesquisadores de Universidades, tem tentado aplicar esta técnica na produção comercial de compostos úteis. Entretanto, apesar de várias tentativas, na década de 70, a maioria dessas empresas não continuaram os estudos nesta área, uma vez que a produção em larga escala ainda estava longe de ser conseguida.

Por outro lado, grupos da Alemanha apresentaram vários progressos na aplicação industrial em um simpósio realizado em Munique, 1976, com excelentes resultados que tem encorajado pesquisadores de outros

países.

Em 1982, no V Congresso Internacional de Cultura de Células e Tecidos de Plantas, realizado no Japão, mais de 700 participantes provenientes de 46 países compareceram. Cerca de 70 dos 372 trabalhos apresentados relacionavam-se com a produção de metabólitos secundários em células de plantas cultivadas e com resultados comercialmente promissores. Assim, pesquisas neste campo foram reativadas recentemente, principalmente no Japão (MISAWA, 1985).

Neste método, células ou tecidos são cultivados em meio líquido sob agitação (suspensão); fornece-se condições para que os metabólitos secundários sejam sintetizados, e em certos casos, secretados para o meio de cultura. Dessas suspensões celulares os metabólitos são extraídos, purificados e comercializados.

O procedimento para produção comercial de metabólitos secundários de plantas "in vitro" pode ser conduzido em várias etapas consideradas básicas, resumidas na Fig 2.

A cultura de células em um volume fixo de meio de cultura, apresenta um padrão de crescimento característico (Fig 3). Ela aumenta em biomassa pela divisão e crescimento celular até que um fator no ambiente de cultura (nutriente, disponibilidade de oxigênio, metabólitos

Figura 2. Esquema geral da cultura de células "in vitro" para produção de compostos secundários (WHITAKER & HASHIMOTO, 1986).

tóxicos) se torne limitante. As células então entram em uma fase estacionária durante a qual a massa de matéria seca das células tende a ficar constante. A estabilidade das células na fase estacionária depende da espécie da planta e

da natureza do fator limitante de crescimento (células que atingem a fase estacionária por limitação de nitrogênio conserva viabilidade mais longa que quando limitada por carboidrato) (STREET, 1977).

Figura 3. Modelo de curva de crescimento de células em suspensão relacionando o aumento do número de células em função do tempo (STREET, 1977).

Quando as células da suspensão na fase estacionária são subcultivadas, as células sucessivamente passam à fase "lag", nesta fase há novamente síntese massiva de novo citoplasma e organelas associadas, replicam seu DNA e então começam a se dividir. Em seguida passam a um período de crescimento exponencial, uma fase de crescimento linear. (taxa de crescimento máximo), um período de declínio da taxa de crescimento, e então novamente a fase estacionária. Dependendo do tipo de cultura de células e meio de cultura, há um mínimo de densidade celular, abaixo do qual a cultura não cresce.

Nos últimos anos, vários trabalhos tem sido publicados apontando as vantagens desses sistemas em relação aos métodos tradicionais de produção de compostos naturais de plantas.

A produção de plantas no campo está sujeita a fatores ambientais incontrolláveis tais como seca, calor, frio, pragas que podem afetar a quantidade e qualidade do composto desejado. A cultura por sua própria natureza é sazonal, afetando o fornecimento do produto no mercado. Produção em bioreatores possui alto grau de controle e flexibilidade de acordo com a demanda (WHITAKER & EVANS, 1987; FOWLER, 1986 e BUTCHER, 1977), e também está livre de interferências políticas (MORRIS et alii, 1985; FOWLER, 1986).

BUTCHER (1977), comenta em seu trabalho que células cultivadas oferecem muitas vantagens sobre plantas intactas para estudos biossintéticos devido ao maior controle das condições de cultivo. Por serem cultivadas assepticamente, elimina interferências causadas pelos microrganismos. Além disso, cultura de células fornece sistemas experimentais mais simples e mais convenientes do que plantas intactas, especialmente as culturas em meio líquido oferecem uma via muito eficiente de incorporação de precursores, o que é difícil ocorrer em plantas intactas.

Apesar desses aspectos interessantes, é inegável que existam vários problemas que limitam a exploração comercial da síntese de compostos secundários "in vitro", principalmente porque muitas culturas não produzem quantidades significativas dos compostos característicos da planta da qual as células em cultura são derivadas, e a instabilidade de linhagens celulares altamente produtivas (FOWLER, 1986).

De acordo com FUJITA & TABATA (1987) e WHITAKER & EVANS (1987), os caminhos básicos para se aumentar a produtividade são: aquisição de variedades altamente produtoras (seleção), o estabelecimento de metodologia de cultivo que acarrete máxima produtividade, o desenvolvimento de tecnologia para cultura e produção em larga escala.

Uma vez que a síntese do composto secundário está relacionado com a resposta da planta ao ambiente, BAJAJ (1988), afirma que a produção "in vitro" depende de fatores genéticos e epigenéticos. Alguns compostos encontrados em cultura de tecido pode ser resultado da indução provocada por estresse metabólico.

Por outro lado, observa-se que em alguns casos os metabólitos secundários são produzidos por células com certo grau de diferenciação. A razão porque diferenciação é importante para biossíntese do produto secundário é no momento objeto de especulação.

A síntese do metabólito secundário "in vitro" provavelmente seja consequência de propriedades fisiológicas e morfológicas especiais dos tecidos cultivados. Com excessão dos casos de cultura de órgãos, as culturas são formadas por tecidos desorganizados, possuindo limitada variedade de tipos celulares. Além do mais, técnicas e procedimentos de cultura de tecido visando manter as células em estado de divisão constante com adição de hormônios exógenos, o qual tende a limitar a diferenciação e desenvolvimento de sistemas de tecidos organizados. Entretanto, parece provável que fatores tais como arranjo espacial de enzimas e presença de organelas específicas, compartimentalização das enzimas e substratos em locais disponíveis para deposição, determinam se um dado composto é

produzido ou não (BUTCHER, 1977).

Compartimentalização pode ser importante para separar as enzimas degradativas dos metabólitos acumulados, uma vez que é bem conhecido que tecidos intactos frequentemente possuem enzimas capazes de degradar metabólitos que elas acumulam. Se não houver separação desses substratos e enzimas em condições de cultivo, pode não ocorrer acúmulo de metabólito secundário. De modo similar, locais disponíveis para deposição por exemplo, vacúolos, ductos de resina e ducto de latex, podem ser essenciais para armazenamento do produto, principalmente quando esses compostos forem tóxicos ao citoplasma (BUTCHER, 1977).

Em se tratando de metabólitos, plantas são geralmente mais eficientes em acumular essas substâncias que as culturas derivadas delas (FOWLER, 1986; YEOMAN, 1987).

No entanto, nas últimas três décadas uma grande variedade de plantas tem sido cultivada em meios quimicamente definidos e muitos produtos secundários de interesse sendo detectados em cultura (MORRIS et alii, 1985; SEABRA, 1986);

Recentemente, entretanto, linhagens celulares contendo quantidades maiores de metabólitos secundários que aqueles encontrados em plantas intactas tem sido isolados por seleção clonal. O sucesso da seleção de células

produzindo altas quantidades de metabólitos secundários tem sido possível devido a heterogeneidade genética das células das plantas cultivadas. Isso tem tornado possível selecionar células e desenvolver linhagens de células com características desejáveis (altamente produtivas) (YAMADA & FUJITA, 1983).

2.3.5.2. Fatores fisiológicos

Um dos problemas chaves da cultura de células de plantas como fonte de química fina é que as culturas, uma vez estabelecida, normalmente apresentam produtividade bem abaixo do necessário inabilizando a exploração comercial. Nos últimos anos, uma variedade de fatores químicos e físicos, afetando o metabolismo de células em suspensão, tem sido testados extensivamente em muitos tipos de células. Estes fatores, incluem componentes do meio de cultura, hormônios, valor ph, luz, temperatura, aeração, agitação, etc...(MORRIS et alii, 1985; MISSAWA, 1985).

Segundo FOWLER (1986), com poucas exceções, cultura de células vegetais apresenta o mesmo modelo de síntese de produtos secundários como os sistemas microbianos, ou seja a síntese do produto é normalmente dissociado do crescimento e divisão celular, sugerindo cultivo em 2 estágios: O primeiro estágio onde as condições

de cultivo estão direcionadas para o rápido crescimento e acúmulo de biomassa pelas células e o segundo estágio com o cultivo em condições visando a síntese do produto.

Existem inúmeros trabalhos e patentes com relação a estes aspectos, o que torna impossível discutí-los com detalhes nesta revisão, assim apenas alguns exemplos típicos serão apresentados.

a. Regime nutritivo.

Células de plantas são normalmente cultivadas "in vitro" heterotroficamente, utilizando uma única fonte de carbono e um suprimento de compostos inorgânicos.

Em geral, sacarose parece ser melhor que glicose ou frutose para formação de produtos secundários (DOUGALL, 1980). O nível de açúcar no meio pode também influenciar o metabolismo secundário. Alta concentração de sacarose (10% p/v) estimula síntese de antraquinonas em várias espécies do gênero *Galium* mas inibe em outros por exemplo *G. rubioides*. Similarmente, alto nível de sacarose (6 a 8%) pode ser usado para estimular síntese de alcalóide em alguns sistemas, enquanto em outros o nível ótimo é menor, aproximadamente 2% (PAYNE & CHULER, 1988). A composição mineral dos meios de cultura pode ser complexo, comumente consistindo de 15 diferentes sais, mas diferentes

fontes e concentrações de N e de P tem recebido maior atenção com relação a seus efeitos na síntese do produto secundário. Nitrogênio pode ser fornecido na forma de nitrato ou sais de amônio, ou como componente orgânico como uréia, amino ácido ou caseína hidrolisada. Limitação de nitrogênio ou fosfato em células em cultura tende a suprimir o crescimento e em alguns sistemas, aumentar a síntese do produto (MORRIS, 1985).

b. Fitorreguladores.

Com excessão dos casos de tecidos transformados por *Agrobacterium*, os quais sintetizam níveis elevados de auxina, o estabelecimento de culturas de células em suspensão geralmente requer adição de altos níveis de 2,4-D ou outra auxina potente (PARR, 1988).

2,4-D é uma auxina sintética muito utilizada em meio de cultura, podendo estimular tanto a divisão quanto a expansão celular. Por outro lado, pode causar supressão da síntese do composto secundário por ser uma substância deletéria. Um dos principais fatores que contribuíram para baixa produtividade em culturas de células até 1970 parece ter sido o uso geral de 2,4-D no meio de cultura (MORRIS et alii, 1985).

Tem se observado uma correlação inversa entre

a taxa de crescimento e níveis de síntese do produto secundário. Uma vez que se necessita de auxina para manutenção da cultura e supressão da rediferenciação, não se pode remover totalmente a auxina do meio de cultura.

No geral, 2,4-D apresenta piores resultados do que IAA para síntese do composto e NAA tem um efeito intermediário (PARR, 1988).

Níveis e tipos de citocininas presentes no meio de cultura também pode influenciar a formação de compostos secundários (RHODES, 1987).

Para otimização da produção, é necessário testar uma série de composições e balanços hormonais para encontrar o melhor meio de cultura. Em casos onde meio para crescimento e meio para produção sejam diferentes, pode-se usar cultivo em 2 estágios: primeiramente as células são cultivadas em um meio para ganho de biomassa, e depois é transferida para meio de síntese do composto.

Há necessidade de se conhecer melhor os efeitos dos hormônios na síntese dos produtos secundários, nota-se que há casos de favorecimento de produção e casos de supressão.

c. Valor pH.

O efeito do valor pH na produção de

metabólitos secundários é uma área pouco estudada. O pH do meio não é geralmente controlado durante o crescimento. As células frequentemente modificam o pH do meio por sua própria atividade metabólica (PARR, 1988).

A capacidade de tamponamento do meio de cultura é muito baixo, e um pH inicial de 5-6 pode abaixar várias unidades durante o cultivo a menos que se adicione tampão biológico como ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etanosulfônico (HEPES) ou ácido 2-(N-morfolino) etanosulfônico (MES) por exemplo, a 100mM. Componentes não definidos como caseína hidrolizada e água de coco podem funcionar como tampão. As propriedades biossintéticas e acúmulo de produtos secundários de células cultivadas parecem ser afetadas por mudanças do pH do meio e os benefícios em se adicionar um agente tampão no meio de produção parece ser imprescindível (MORRIS, 1985).

d. Luz.

Embora a maioria das culturas de células não sejam fotossinteticamente competentes e estarem raramente expostas a intensidades de luz fotossinteticamente significativas, o comportamento das células pode ser influenciado por fotoperiodicidade, qualidade e intensidade de luz (PARR, 1988). A importância da luz para expressão

ótima de algumas vias metabólicas em células cultivadas tem sido demonstrada por exemplo para síntese de flavonóides, cardenolídeos e para betacianinas (BERLIN, 1988) O mecanismo aparentemente envolve a indução de síntese de RNA específicos mediado pelos fitocromos, o qual resulta em um aumento do nível de várias enzimas biossintéticas de flavonóides tal como fenilalanina amonialiase e chalcona sintase (PARR, 1988).

Por outro lado, existem sistemas em que luz apresenta-se como efeito inibitório à síntese, por exemplo, em *Lithospermum erythrorhizon*. A formação de derivados de shikonim é inibida por luz azul ou branca; ausência de luz favorece o acúmulo de alcalóide em *Scopolia parviflora*, *Nicotiana tabacum* e *Cinchona ledgeriana*. Especula-se que este efeito seja devido a fotodegradação dos produtos sintetizados, mas é pouco provável (PARR, 1988).

e. Temperatura.

Esta é uma área pouco explorada. Entre os poucos sistemas que tem sido estudados encontra-se a produção ótima de alcalóide por grama de tecido de *Nicotiana* e *Paganum* à 25 °C. O significado exato da temperatura ótima é incerta, mas a importância da temperatura no controle do acúmulo de produto secundário em algumas linhagens celulares

é clara (PARR, 1988).

2.3.5.3. Aspectos visando a otimização da produtividade

a. Imobilização.

O acúmulo de compostos secundários por cultura de células de plantas parece estar correlacionada com a diferenciação de células. Culturas compactas, organizadas e de lento crescimento sintetizam mais metabólitos secundários do que as culturas friáveis que apresentam alta taxa de crescimento (HALDIMANN & BRODELIUS, 1987). Esta diferença parece decorrer da ocorrência das células de plantas não serem como organismos unicelulares, mas organizadas em agregados formando tecidos. Este estreito contato celular desempenha papel indutivo fundamental no metabolismo celular.

A imobilização ou o aprisionamento de células de plantas utilizando matriz de gel (alginato, poliacrilamida, agar, etc) fornece às células condições que simulam aquelas dos agregados celulares ou tecidos e, na maioria das vezes, resulta em aumento da biossíntese de metabólitos de interesse (BRODELIUS & NILSSON, 1990; LINDSEY & YEOMAN, 1983; HALDIMANN & BRODELIUS, 1987).

Atualmente quando se cogita a produção comercial de plantas utilizando-se biorreatores torna-se imperativo a existência de técnicas funcionais de imobilização de células.

Um dos requisitos fundamentais para o sucesso de um sistema de imobilização de células é que as células liberem o metabólito de interesse no meio de cultura para que ele possa ser posteriormente extraído do meio. Na verdade, este requisito quase sempre não é preenchido por células de plantas. As razões tem sido atribuídas a presença de parede celular, membrana celular com permeabilidade seletiva mais sofisticada e ao armazenamento dos metabólitos secundários em compartimento especializado, quase sempre o vacúolo, com a finalidade de preservar o citoplasma das células do efeito tóxico que muitos metabólitos secundários podem causar.

Tentativas tem sido feitas para se desenvolver tecnologia que modifique a permeabilidade celular tornando possível o acúmulo de metabólitos secundários no meio de cultura sem no entanto afetar a viabilidade e metabolismo celular (BRODELIUS & NILSSON, 1983; BRODELIUS, 1988).

Várias substâncias químicas tem sido empregadas para modificar a permeabilidade de células de plantas. Dimetilsulfóxido (DMSO) tem sido o tratamento mais

promissor após os resultados obtidos com células imobilizadas de *Catharanthus roseus* (BRODELIUS & NILSSON, 1983; BRODELIUS, 1988).

b. Biotransformação.

Biotransformação refere-se à capacidade que as células cultivadas de planta apresentam em converter enzimaticamente um precursor disponível ou mais barato em um produto final mais valioso. Biotransformação torna-se interessante quando acoplada ao processo de imobilização de células (WHITAKER & EVANS, 1987)

Uma vez que células de planta metabolizam uma série de compostos aplicados exogenamente, o uso de cultura de células pode não ser apenas de grande valia em estudos de vias biossintéticas mas também para aplicação industrial.

O uso de culturas de células de planta para biotransformação requer a seleção de tipos celulares que expressem a atividade enzimática desejada. Tem sido demonstrado que dentro de uma população de células existe um alto grau de heterogeneidade em relação a capacidade de biotransformar. É necessário selecionar linhagens celulares que demonstrem melhor capacidade de transformação do precursor ao produto. Além disso, tem sido demonstrado que células de planta efetuam mais que uma biotransformação para

determinado precursor. Portanto, torna-se necessário detectar também linhagens celulares que catalizem especificamente a reação desejada, com pouca ou nenhuma contaminação por outros produtos da reação.

Não é grande a literatura sobre o uso de culturas vegetais na transformação de precursores. No entanto os poucos trabalhos mostram que esta linha de investigação promete ser de grande interesse. O estudo mais eloquente é a total transformação de digitoxina em digoxina (SEABRA, 1986).

2.4. Zedoária.

2.4.1. Aspectos gerais.

Curcuma zedoaria Roscoe, também conhecida por "Gaji-tsu" ou simplesmente zedoária, é uma planta herbácea, pertencente à família Zingiberaceae. Sua origem é a Ásia tropical, ocorrendo naturalmente em países como Índia, Ceilão, Indochina e Vietnã (MIYAKE, 1986).

O rizoma, rico em óleo essencial, é a parte vegetal que apresenta as propriedades terapêuticas e que é explorada comercialmente.

Esta espécie vegetal vem sendo utilizada há muito tempo na medicina tradicional para tratamento dos mais

diversos problemas físicos. Atualmente tem despertado interesse dos ocidentais, devido às diversas propriedades terapêuticas, inclusive algumas com comprovação científica.

Recentemente foi introduzida no Brasil, mais especificamente no Estado de São Paulo, onde vem sendo cultivada, processada e comercializada na forma de cápsulas com sucesso por um laboratório farmacêutico (Laboratório Keimeí do Brasil).

Popularmente, a zedoária é usada como: expectorante (provoca ou facilita a expectoração), demulcente (emoliente, amolece ou abranda uma inflamação), diurético (facilita secreção da urina), rubefaciente (provoca vermelidão na pele) e no tratamento da gastrite. (MIYAKE, 1986).

Os indianos costumam mastigar estes rizomas em casos de irritação das vias respiratórias, também relatam-se atividade anticoagulante e auxiliar no tratamento do mau hálito, usado na forma de dentifrício (MIYAKE, 1986).

É utilizada largamente como medicamento para o sistema digestivo, funcionando como estimulador do estômago no processo da digestão e colagogo (estimula secreção da bile). (YASUDA et alii, 1988). Estas propriedades foram comprovadas por MAEDA et alii (1984), que relata experimentos com administração oral do pó deste vegetal em camundongos, e observou-se efeitos de inibição

significativa do trânsito intestinal, elevação da secreção biliar e também inibição da secreção estomacal em ratos o que pode explicar o seu sucesso no tratamento da gastrite há muito tempo na medicina popular.

KIM et alii (1988), testaram "in vitro" a atividade antitumor de 10 tipos de plantas medicinais coreanas contra células leucêmicas e células cancerosas do cólon humano. Neste teste foram utilizadas as seguintes espécies de *Scirpus maritimus*, *Curcuma zedoaria*, *Prunus persica*, *Rheum Coreanum*, *Foeniculum vulgare*, *Euphorbia kansui*, *Croton tiglium*, *Raphanus sativus*, *Galarhoeus pekinensis* e *Daphne pseudogenkwa*.

Foram utilizados 5 tipos de solventes para extração: água, álcool, acetona, clorofórmio e éter de petróleo. A atividade citotóxica destes extratos foi determinada observando-se a inibição de crescimento dessas células tumorosas.

Extrato em acetona de *Scirpus*, *Rheum*, *Foeniculum*, *Daphne* mostraram atividade citotóxica mais forte e extrato em clorofórmio de *Curcuma*, extrato alcoólico de *Euphorbia* e *Galarhoeus* apresentaram forte atividade citotóxica. A atividade citotóxica de cada extrato foi aumentada ao redor de 4.7 a 5.7 vezes após purificação parcial. Os resultados acima mostram que os extratos das sete espécies de plantas das 10 testadas apresentaram

atividade citotóxica "in vitro".

A planta *Curcuma zedoaria* cresce em várias partes da Índia, suas raízes tem sido tradicionalmente usadas como remédio contra infecções intestinais inclusive amebíase. ANSARI & AHMAD (1991), comprovaram "in vitro" essa atividade anti-ameba do extrato de raízes contra *Entamoeba histolytica*.

2.4.2. Compostos encontrados em zedoária.

Tendo em vista a comprovação da eficiência da utilização de seu rizoma no tratamento de algumas doenças e distúrbios fisiológicos, vários trabalhos tem sido desenvolvidos, no sentido de identificar os constituintes químicos bem como relacioná-los à sua ação terapêutica. Os compostos já isolados de zedoária são apresentados a seguir.

CINEOL

(GUENTHER, 1952)

CÂNFORA

(GUENTHER, 1952)

d-PINENO

(GUENTHER, 1952)

CURCUMOL

(HIKINO et alii)
(1966a)

CURDIONE

(HIKINO et alii)
(1966b)

ZEDERONA

(HIKINO, et alii)
(1971)

PROCURCUMENOL

(HIKINO, et alii)
(1968d)

CURZERENO

(HIKINO, et alii)
(1968c)

CURCUMENOL

(HIKINO, et alii)
(1968b)

CURCULONA

(HIKINO et alii)
(1967)

FURANODIENO

(HIKINO et alii)
(1968a)

CURZERENONA

(HIKINO et alii)
(1975)

EPICURZERENONA

(HIKINO et alii)

(1975)

ISOCURCUMENOL

(HIKINO et alii)

(1972)

GERMACRONA

(HIKINO et alii)

(1972)

CANFENO

(GUENTHER)

(1952)

DEHIDROCURDIONA

(HIKINO et alii)

(1972)

p-METOXICINAMATO DE ETILA

(GUPTA et alii)

(1976)

FURANOGERMENONA

(SHIBUYA et alii)

(1982)

**(4S,5S)-(+)-GERMACRONE
4,5 EPÓXIDO**

(YOSHIHARA et alii)

(1984)

ZEDOARONDIOL

(KOUNO & KAWANO)

(1985)

GUENTHER (1952), relatou que os rizomas de zedoária, continham de 1 a 1,5% de óleo essencial, sendo seus principais constituintes : cineol, cânfora, pireno e canfeno.

O cineol, conhecido também como eucaliptol, é um óleo essencial presente também em outras plantas como folhas de eucalipto, folhas de louro, etc...MAUGH (1982), baseado no uso popular, relata propriedade repelente de folhas de louro contra insetos (baratas). Este efeito comprovou ser devido ao composto cineol.

GUPTA et alii (1976), testaram a atividade do p-metóxi-cinamato de etila (EPMC) proveniente de rizomas de *C. zedoaria* extraído com etanol. O EPMC inibiu o crescimento dos fungos: *Trichophyton rubrum*, *Aspergillus niger*, *Saccharomices cerevisiae* e *Epidermophyton floccosum* em concentrações menores que 10 µg/ml. *A. fumigatus*, *Penicillium purpurogenum*, *Trignopsis variabilis*, *Microsporum gypseum*, *Sclerotium rolfsu*, *Geotricular candidae*, *Fusarium oxisporum* e *Helmenthosporium oryzae* em concentrações menores que 15 µg/ml. *Candida krusei* e *T. mentagrophites* em concentrações menores que 50 µg/ml. Os esporos de *T. rubrum* perderam a viabilidade ou capacidade de germinar quando expostos ao extrato etanólico (30 µg/ml) por 2 horas.

YAMAHARA et alii (1982), testaram o efeito do composto furanogermenona sobre danos causados

experimentalmente por tetracloreto de carbono (CCL_4) em fígado de ratos. Furanogermenona apresentou efeito antihepatotóxico.

Como se observa, são muitas as propriedades terapêuticas atribuídas à zedoária, algumas com comprovação científica (antitumor, fungicida, repelente, antiameba e hepatotóxica), diversos compostos foram isolados e identificados e pouquíssimos compostos definidos como princípio ativo para determinado problema. Isso se deve ao fato de muitas vezes haver a atuação de vários compostos na ocorrência de um certo efeito. Este fenômeno conhecido como sinergismo, é muito comum ocorrer na utilização de fitoterápicos (extrato de planta) no tratamento de doenças.

2.4.3. Cultura de tecido de zedoária

A propagação de zedoária é atualmente feita pela divisão dos rizomas o que dificulta sobremaneira a indução de variabilidade genética e melhoria de produtividade.

Devido ao fato de ser planta proveniente de regiões tropicais, torna-se difícil ao rizoma sobreviver a estação de inverno em países subtropicais, além de ser espécie de propagação lenta (YASUDA et alii, 1988).

Por isso torna-se interessante o

desenvolvimento de linhas de pesquisa que criem alternativas para a rápida multiplicação desta planta.

Não se têm muitos relatos sobre o uso de técnica de cultura de tecido para a obtenção de um método adequado de propagação rápida e aumento de produtividade dos princípios ativos em espécies do gênero *Curcuma*. Nadgauda¹ et alii e Mukhri & Yamaguchi² citados por YASUDA, 1988), realizaram trabalhos experimentais com *C. doméstica*, obtendo propagação clonal e produção de calos. Cultura de tecido de *C. zedoaria* e *C. aromatica* não tem sido conduzida com sucesso.

YASUDA et alii (1988), relatou trabalho com cultura de tecido, utilizando 3 espécies de *Curcuma*, *Curcuma zedoaria* Roscoe, *C. doméstica* Valenton e *C. aromática* Salisbury. Conseguiu-se calos das 3 espécies usando meio de Murashige-Skoog (MS) suplementado com 1 ppm de NAA e de 0.1

¹NADGAUDA, R. S.; MASCARENHAS, A. F.; HENDRE, R. R.; JAGANNATHAN, V. *Indian J. Exp. Biol.* 16:120-22, 1978.

²MUKHI, Z. & YAMAGUCHI, H. *Plant Tissue Lett.* 3:28-30, 1986.

ppm de Cinetina. Com *Curcuma zedoaria* obteve-se formação de "plantletes", a partir de ápice caulinar, em meio contendo 0-1 ppm de NAA ou BA 0-3 ppm a 26 °C sob condição de 12 h de fotoperíodo. Foi examinado também a produção do óleo essencial (cineol) por cromatografia gasosa em plantas provenientes de cultura de tecido e comparado com a da planta mãe. Obteve-se síntese de Cineol em planta micropropagada mas em baixa quantidade, e nos calos não foi detectada a presença de cineol.

3. MATERIAL E MÉTODOS.

Os experimentos foram conduzidos no Centro de Biotecnologia Agrícola (CEBTEC), Departamento de Química, na Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), Campus da Universidade de São Paulo (USP), em Piracicaba.

O trabalho experimental com *Curcuma zedoaria* consistiu em cinco partes (Fig 4): micropropagação (produção de clones e aclimação em casa de vegetação; produção de calos; cultivo de células em suspensão (meio líquido); organogênese indireta (via calos) e análise química de alguns compostos secundários.

3.1 Obtenção os explantes.

O material vegetal utilizado como fonte de explantes foram rizomas frescos (recém colhidos) de *Curcuma zedoaria* fornecidos pela senhora Keiko Iama, uma produtora de Santo Amaro, São Paulo.

Destes rizomas foram retirados dois tipos de explantes para experimentação: discos de rizomas frescos e

ápice caulinar de gemas. As gemas foram provenientes de rizomas cultivados da seguinte maneira: os rizomas foram previamente lavados com água corrente sob alta pressão para remoção das partículas de solo; a seguir lavou-se novamente com escova de cerdas macias para remover os detritos aderidos mais profundamente, em seguida foram colocados em bandejas, cobertos com vermiculita autoclavada e deixados para germinar sob cobertura plástica (semi estufa) em casa de vegetação.

3.1.1. Assepsia dos explantes.

3.1.1.1. Discos do tecido do rizoma.

Foram selecionados os rizomas que se apresentavam mais retilíneos e com diâmetro ao redor de 1.5 cm.

Os rizomas foram lavados primeiramente com água corrente e escova para remover os detritos da superfície.

Descartada as extremidades dos rizomas, retirou-se a epiderme e regiões danificadas com auxílio de bisturi e em seguida foram lavados novamente com água corrente e com água destilada.

Em câmara asséptica, os rizomas limpos foram imediatamente transferidos para erlenmeyers contendo solução de hipoclorito de sódio (Qboa) 20% (v/v) e deixados sob

agitação constante por 20 minutos. Ainda em câmara asséptica foram lavados com água destilada esterilizada por três vezes.

Em placa de Petri e com auxílio de pinça e bisturi, a região do córtex danificada pelo processo de desinfestação foi removida e descartada.

O cilindro contendo a região do córtex e do câmbio íntegro foi cortado em fatias de aproximadamente 1 mm de espessura, que foram inoculadas em meios de cultura. Os frascos foram colocados em sala de crescimento sob condições controladas (item 3.2).

3.1.1.2 Ápices caulinares.

Os brotos laterais foram destacados do rizoma e mergulhados em solução de hipoclorito de sódio comercial (Qboa) a 20% (v/v).

Após limpeza superficial para remoção de detritos de superfície e folhas mais externas, os brotos foram mergulhados em solução desinfetante nova. Seguiu-se uma segunda limpeza para remoção das folhas mais internas para exposição da região do ápice; cortou-se então a extremidade superior do broto, permanecendo apenas a parte basal contendo o meristema apical.

Em câmara asséptica os brotos foram imediatamente transferidos para erlenmeyers contendo solução desinfetante, e deixados sob agitação constante por 20

minutos. Após, foram lavados três vezes com água destilada esterilizada.

Com auxílio de lupa, pinça, bisturi e estilete, o ápice foi então isolado e inoculado em meio de cultura.

3.2. Meio de cultura básico e condições de cultivo.

Para seleção do melhor meio de cultura para o estabelecimento de protocolo de cultura de tecido (micropropagação, produção de calos, cultura de células em suspensão e organogênese indireta) para *Curcuma zedoaria* Roscoe, os explantes foram inoculados em meio de cultura básico de MURASHIGE & SKOOG (1962) (MS) suplementado com algumas vitaminas como mostra a tabela 1. Empregou-se agar na concentração de 8 g/l como agente gelificante e o pH do meio foi ajustado para o valor 5,7.

De acordo com o objetivo de cada experimento, se obtenções de calos ou micropropagação, foram adicionados diferentes combinações de fitorreguladores ao meio para indução específica. Esta suplementação será abordada com maiores detalhes na descrição dos experimentos realizados.

As condições de cultivo na sala de crescimento foram: temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, luminosidade ± 2000 LUX com fotoperíodo de 16/8 horas (claro/escuro). Em alguns experimentos para obtenção de calos foi testado também condições de cultivo no escuro.

Sais	Concentração (mg/l)
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ . 2H ₂ O	440
MgSO ₄ . 7H ₂ O	370
K ₂ HPO ₄	170
Na ₂ EDTA	37,3
FeSO ₄ . 7H ₂ O	27,8
HBO ₃	6,2
MnSO ₄ . 4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ . 4H ₂ O	8,6
KI	0,83
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,025
CoSO ₄ . 6H ₂ O	0.025
Suplementos:	
Acido nicotínico	0,5
Tiamina	0,5
Piridoxina	0,5
Glicina	2,0
I-inositol	100,0
sacarose	30,0

Tabela 1. Sais componentes e suplementação para constituição do meio básico MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962).

3.3. Micropropagação.

3.3.1. Teste de fitorreguladores (BAP e NAA).

Apices caulinares foram inoculados em meio básico MS suplementado com BAP nas concentrações de: 0; 0,5;

1,0; 1,5; 2,0 e 3,0 mg/l. Realizou-se também estudo experimental do efeito da interação de BAP e NAA no processo de micropropagação sendo o NAA utilizado nas concentrações de: 0; 0,2; 0,5; e 1,0 mg/l.

Os frascos foram deixados em sala de crescimento sob condições controladas (item 3.2).

Todos os tratamentos foram conduzidos com 20 repetições.

A avaliação foi feita observando-se o desenvolvimento dos explantes, classificando-se e quantificando-se também os tipos morfogênicos formados e quantificando-se também o número de brotos produzidos bem como a frequência de micropropagação.

3.3.2. Teste da idade fenológica do explante.

Utilizou-se como explante ápices caulinares provenientes de material vegetal em quatro diferentes estágios de desenvolvimento os quais foram denominados: gema, broto jovem, broto desenvolvido e planta adulta. (Fig. 5).

O meio de cultura consistiu em meio básico (MS) (Tabela 1.) suplementado com BAP na concentração de 2 mg/l, cultivado em sala de crescimento sob condições controladas (item 3.2).

Após intervalos de tempo de 0, 10, 30, 60 e 90 dias os explantes foram analisados quantificando-se os

seguintes parâmetros: massa de matéria seca (em estufa a 60 °C, por 48 horas), massa de matéria fresca e número de brotos produzidos em amostragem consistida de 10 explantes escolhidos ao acaso.

O material restante foi transferido para meio novo para continuidade do desenvolvimento.

Figura 5. Brotos em diferentes fases do desenvolvimento testados como fonte de explante (ápice caulinar) para micropropagação (a. gema; b. broto jovem; c. broto desenvolvido; d. planta adulta).

3.3.3. Aclimação.

Plântulas obtidas por micropropagação a partir de ápice caulinar, em meio contendo BAP (2 mg/l) por $\pm$ 60 dias, foram transferidos para casa de vegetação para plantio e cultivo.

Primeiramente as plântulas foram retiradas do frasco, lavadas em água corrente, individualizadas e classificadas em 3 tipos de acordo com suas características físicas (Tabela 2).

Utilizou-se como substrato vermiculita e sílica na proporção 3:1 (v/v) regando-se com solução nutritiva de HOAGLAND & ARNON (1950).

O substrato foi colocado em copilhos de plástico (volume de 180 ml) que possuíam orifícios em sua base para entrada de água e nutrientes.

Tabela 2. Classificação das plântulas obtidas "in vitro" e utilizadas para teste de aclimação.

classificação da plântula	parte aérea		sistema radicular		
	altura (cm)	folhas (nº)	raízes (nº)	diâmetro (mm)	comprimento (cm)
Tipo I	3-4	1-2	<5	0,50	3
Tipo II	5-8	3,4	7	0,75	4
Tipo III	>8	>5	>9	1,00	5

Após o plantio, os copinhos foram colocados em bandejas de plástico, regando-se periodicamente com solução de Hoagland diluída 5 vezes, mantendo-se o nível de líquido nas bandejas ao redor de 1 cm. Para manter a umidade relativa do ar em valores altos, as bandejas foram cobertas com plástico os quais foram removidos em intervalos de 5 dias (0, 5, 10, 15, 20 dias).

Testou-se também o efeito da micorriza no processo de aclimação e desenvolvimento das plântulas. Foi utilizando o fungo endomicorrízico vesículo-arbuscular *Glomus etunicatum* (10 ml/copo) que apresentou cerca de 3973 esporos / 50 ml de solo.

Foram feitas 10 repetições para cada tratamento.

A avaliação foi feita observando-se o desenvolvimento das plântulas ao longo do cultivo e por avaliação do tamanho (parte aérea e radicular) e massa de matéria seca 50 dias após o plantio.

3.4. Produção de calos.

3.4.1. Cultivo de discos de tecido do rizoma.

Os explantes (discos do rizoma) foram obtidos como descrito anteriormente no item 3.1.1.1.

Estes discos foram inoculados em meio de cultura sólido, constituído do meio básico MS (Tabela 1)

suplementado com diferentes concentrações dos fitorreguladores 2,4 D, Cin, NAA e BAP. As concentrações foram de: 0; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 e 2,0 mg/l para BAP e KIN, e de 0; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0 e 20 mg/l para 2,4 D e NAA. Foram testados também as interações entre os fitorreguladores acima.

Foram feitas 20 repetições de cada tratamento, sendo os frascos mantidos em sala de crescimento em presença de luz.

3.4.2. Testes de tipos de explantes, fitorreguladores e influência da luz.

Em câmara asséptica, plantinhas completas obtidas "in vitro" por micropropagação com raízes bem desenvolvidas (espessas) e folhas expandidas, foram retiradas do frasco e colocadas em placa de Petri para isolamento das seguintes partes: ápice caulinar, base foliar, bainha da folha, limbo foliar, extremidade radicular e seguimento mediano da raiz os quais foram testados como fonte de explante (Fig. 6).

Estes diferentes tipos de explantes foram inoculados com 20 repetições em meios de cultura consistidos do meio básico MS (Tabela 1), suplementado com NAA e 2,4 D nas concentrações de 0; 1,0; 5,0; 10,0 e 20,0 mg/l. Os frascos foram mantidos em sala de crescimento sob condições controladas. Testou-se também cultivo à luz e no escuro.

Figura 6. Diferentes partes da planta de zedoária obtida "in vitro, que foram testadas como explante para produção de calos.

Assim foram testados 9 diferentes meios de cultura (combinações dos fitoreguladores acima), 2 condições de cultivo (luz e escuro) e 6 tipos de explantes perfazendo um total de 108 tratamentos. Considerando-se o fato de que foram feitas 20 repetições para cada tratamento, foram então inoculadas um total de 2160 explantes.

A avaliação foi feita após 50 dias de cultivo, quando então foram feitas observações quanto ao desenvolvimento (formação de parte aérea, raízes, oxidação fenólica), sendo atribuídas notas quanto a formação de calos. Representantes dos explantes após 50 dias de cultivo foram distribuídos em quadros representativos do delineamento dos respectivos tratamentos e então fotografados.

3.5. Cultura de suspensões celulares.

Para estabelecimento de cultura de células em suspensão os calos provenientes do cultivo em meio básico MS sólido, suplementado com 1 mg/l de NAA foram transferidos para frascos cônicos de 250 ml contendo 75 ml de meio líquido de mesma composição e mantidos no escuro sob agitação de aproximadamente 100 rpm e temperatura de 25 ± 2 °C. Os aglomerados celulares de aspecto amarelo claro resultantes do crescimento da cultura foram transferidos para meio novo.

3.5.1. Curva de crescimento.

As células de 5 frascos contendo cultura em suspensão de aspecto friável e claro foram filtrados através de peneira metálica de malha com tamanho de poro de 1 mm e transferidas para frascos cónicos de 1000 ml contendo 300 ml de meio de cultura. As células de todos os frascos foram cultivadas por 5 dias para estabilização da cultura.

As células foram novamente filtradas em peneira metálica de mesma dimensão e separadas em três amostras de aproximadamente 1 g. Estas amostras foram colocadas sobre papel absorvente esterilizado e posteriormente introduzidos em frascos esterilizados e previamente tarados para determinação da massa de matéria fresca do inóculo.

Estas amostras foram transferidas para erlenmeyers de 250 ml contendo 75 ml de meio de cultura de mesma composição e cultivadas no escuro sob agitação constante e temperatura de 25 ± 2 °C.

O ganho de massa de matéria fresca foi determinado a intervalos de 0, 4, 7, 11, 14, 18, 21, 25, 29 e 32 dias de cultivo. Para tanto, as culturas foram filtradas em peneira metálica com malha com tamanho de poro de 0.250 mm. Os aglomerados celulares foram colocados sobre papel absorvente esterilizado e pesados em frascos esterilizados previamente tarados. A massa de matéria fresca foi determinada por diferença. As células foram

desenvolvidas novamente para os respectivos meios de cultura para continuidade do experimento.

A média das leituras da massa de matéria fresca das três culturas foi utilizada para construção da curva de crescimento.

3.5.2. Aplicabilidade do teste de tetrazólio na avaliação do crescimento de células em suspensão.

O teste utilizado foi o recomendado por DIXON (1985) que consistiu em adicionar 8 ml de solução 0,5%, pH 7,5 de cloreto de 2,3,5 trifenil-tetrazólio em tubos de ensaio contendo amostras de massas variáveis de células (0,5; 10,0; 15,0; 20,0; 30,0; 40,0; 60,0; 80,0; 100,0 e 120,0 mg) em duplicata. As amostras foram em seguida incubadas por 24 horas à temperatura de 20 °C no escuro. A seguir todas as amostras foram centrifugadas a 5000 g por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. O precipitado celular foi ressuspenso em 3 ml de etanol (95 %) e deixado em banho maria em agitação a 60 °C por 15 minutos. Após resfriadas, as amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 5 minutos e o precipitado foi descartado. A absorbância da cor avermelhada da solução etanólica (sobrenadante) foi lida em espectrofotômetro a 485 nm contra etanol a 95 % como controle.

3.6. Organogênese indireta.

Com o objetivo de se obter a regeneração de plantas a partir de calos de zedoária, células e aglomerados celulares provenientes do cultivo em meio líquido foram transferidos para meio sólido de mesma composição (meio básico MS suplementado com 1,0 mg/l de NAA) e cultivado no escuro para crescimento de calos.

Posteriormente, calos de aspecto friável e de coloração branca amarelada foram transferidos para meio sólido suplementado com 2 mg/l de BAP (meio considerado melhor para formação de parte aérea e micropropagação, em experimentos anteriores) e cultivado em presença de luz para indução de parte aérea.

3.7. Análise química.

3.7.1. Reagentes e padrões.

Os solventes utilizados foram de graus P.A. para obtenção dos extratos e de grau Lichrosolv para os eluentes cromatográficos. Cânfora comercial foi a utilizada como padrão.

3.7.2. Instrumentação.

Foram utilizados: (a) cromatógrafo líquido

HP-1050, Perkin Elmer 3B equipado com coluna (300 x 25 nm) preenchido com sílica ou fase reversa C-18 com partículas de 5 µm e detectores UV-Vis. (b) cromatógrafo à gás acoplado à espectrômetro de massa HP-5890 de baixa resolução operando com analisador quadrupolar. (c) cromatógrafos à gás acoplado a espectrômetros de massa FINNIGAN MAT com detector "ion trap" de baixa resolução. (d) espectrômetros de ressonância magnética nuclear Bruker AC-80 a AC-200 operando para próton e para carbono treze.

3.7.3. Obtenção dos extratos.

Os rizomas provenientes de plantas originais e plantas micropropagadas foram secos em estufa à 60 °C até peso constante e moídos finamente. Três gramas destes materiais foram extraídos com 30 ml de diclorometano, mantidos em repouso por 24 horas e submetidos a ultrasom por 5 min. A solução foi filtrada sob vácuo, através de funil de vidro sinterizado, seco e concentrado em evaporador rotativo à 30 °C.

Uma porção do calos foi submetida a tratamento com gelo seco e acetona e posteriormente extraído por metanol : água (1:1). A solução resultante foi extraída com diclorometano por partição, que foi seco e concentrado em evaporador rotativo a 30 °C. A massa celular das culturas de células em suspensão foi separada do meio de cultura por filtração e 7,6 g foram extraídas de modo análogo. O meio de

cultura foi analisado quanto a presença de metabólitos secundários excretados, através da análise do extrato diclorometano obtido deste por partição.

3.7.4. Análise dos extratos por cromatografia planar.

Foram aplicados com microcapilar cerca de 10 μ l de soluções contendo cerca de 10 mg/l (mg/volume de solvente) de cada extrato numa placa cromatográfica de sílica de alta resolução. As placas foram eluídas com benzeno/acetato de etila 10 % (v/v) avaliados sob luz UV₂₅₄ UV₃₆₆ nm e posteriormente revelados com a detecção de terpenóides.

3.7.5. Análise por cromatografia líquida de alta eficiência.

Os diversos extratos diclorometânicos obtidos foram carificados em filtros Sep-pak previamente às injeções no cromatógrafo líquido. A condição utilizada foi: coluna de 30 cm x 2,5 cm preenchida com sílica C-18. Fluxo de 1,2 ml/min de água/metanol 55% à 65%, em 7 min, mantido por 15 min, seguido de um aumento para 90%, mantido por mais 25 min. A cânfora foi co-injetada como padrão visando a sua identificação nos cromatogramas.

3.7.6. Análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa.

Os extratos diclorometânicos foram injetados num cromatógrafo à gás visando a otimização da separação dos constituintes. Foi utilizada uma coluna do tipo Megabore (0,25 mm de diâmetro interno) de sílica fundida com 5 m de comprimento com metil-silicone (5%) como fase. Temperatura do injetor: 270 °C, temperatura final: 250 °C (12/min) mantido por 20 min.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.

4.1 Micropropagação.

4.1.1 Efeito de fitorreguladores (BAP e NAA).

BAP e NAA são fitoreguladores extensivamente utilizados em cultura de tecido de plantas. BAP é utilizado como indutor de formação de parte aérea e brotamento e NAA como indutor de rizogênese e formação de calos. Para obtenção da melhor composição de reguladores vegetais para micropropagação de zedoária, testou-se o efeito da interação de BAP (0 - 0.5 - 1.0 - 1.5 - 2.0 - 3.0 mg/l) e NAA (0 - 0,2 - 0.5 - 1.0 mg/l). A avaliação final foi realizada aproximadamente 60 dias após a inoculação, quando identificou-se e quantificou-se nove tipos morfogénéticos distintos (Fig 7). A frequência de ocorrência do tipo G (características de micropropagação) e porcentagem de micropropagação são apresentadas nas Figs 8 e 9 e o número de brotos produzidos na Fig. 10.

Figura 7.. Esquema dos tipos morfogenéticos obtidos nos tratamentos com interação de BAP e NAA.

Os tipos morfogenéticos identificados apresentavam as seguintes características:

Tipo A - Desenvolvimento normal da plântula com formação de raízes e parte aérea, apresentando no mínimo 3 folhas expandidas.

Tipo B - Desenvolvimento normal da plântula

com formação de raízes e parte aérea, apresentando 2 folhas expandidas.

Tipo C - Desenvolvimento normal da plântula com formação de raízes e parte aérea, apresentando 1 folha expandida.

Tipo D - Houve crescimento do explante que se apresentou clorofilado sem no entanto apresentar folhas ou raízes.

Tipo E - Explante não apresentou crescimento significativo, mas apresentou-se clorofilado.

Tipo F - Explante apresentou-se com coloração marrom escuro (possivelmente oxidado e supostamente morto).

Tipo G - Emissão de brotações (parte aérea e raízes).

Tipo H - Formação intensa de raízes, sem formação de parte aérea.

Tipo I - Crescimento amorfo, sem definição de folha ou raízes. Coloração verde amarelado ou marrom (suscetível de oxidação).

A relação entre o tipo morfogênético que expressa micropropagação (Tipo G) e os demais tipos (Tipos A,B,C,D,E,F,H,I) são apresentados na Figura 8. A avaliação feita após 60 dias de cultivo, permite afirmar que todos os tratamentos em presença de BAP e ausência de NAA foram os que apresentaram os melhores resultados de micropropagação independente da concentração, sendo escolhida a concentração

de 2.0 mg/l por apresentar significativamente o melhor resultado. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por YASUDA (1988), que relata a formação de primórdios de brotos utilizando-se BAP em concentrações de 0.05 a 3 mg/l. Inclusive relatou também que concentrações acima de 3 mg/l acarretaram formação de calos. Um resultado estranho, uma vez que formação de calos está associada a presença de 2,4 D e não de Citocininas como é o caso de Cin e BAP. Este efeito não foi testado no presente trabalho, mas se observou que na concentração de 3 mg/l de BAP, a porcentagem de micropropagação diminuiu (Fig 9) em relação a concentração de 2.0 mg/l. É de se esperar que acima deste valor, a micropropagação diminua dando lugar a formação de calos como relatado por YASUDA.

Figura 8. Relação entre explantes que micropropagaram e explantes que não micropropagaram nos tratamentos de interação BAP e NAA.

Figura 9. Porcentagem de ocorrência do tipo morfogênético G (micropropagação) nos tratamentos de interação BAP e NAA.

Figura 10. Taxas de micropropagação (número de brotos /explante) provenientes dos tratamentos de interação BAP e NAA

Os resultados da interação entre os fitoreguladores testados evidenciou que aparentemente existiu interação positiva a concentrações de 1.5 mg/l de BAP e concentrações de NAA a 0.5 mg/l.

A Figura 10, onde são apresentadas as taxas de micropropagação (número de brotos / explante) mostrou que tratamentos utilizando-se BAP além de se obter porcentagem de micropropagação maiores, conseguiu-se também maior número de brotos por explante.

4.1.2. Seleção da melhor idade fenológica para ápices caulinares.

Com o objetivo de se otimizar o processo de micropropagação de zedoária, isto é, a produção de maior número de brotos em menor intervalo de tempo, neste experimento foram testados explantes em quatro fases diferentes do desenvolvimento, pois é sabido que a idade fenológica do explante influi no seu potencial de resposta morfológica.

A avaliação das respostas feita em seis fases do desenvolvimento do explante (10, 20, 30, 60 e 90 dias após a inoculação) é apresentada nas Tabelas 3 e 4 e Figs. 11 a 15.

Analisando-se as curvas provenientes do ganho de matéria seca em função do tempo (Fig 11), observa-se que gema como fonte de explante apresentou um comportamento

Tabela 3. Porcentagem de micropropagação (%M) e massa de matéria seca (ms) dos explantes obtidos durante o cultivo de 90 dias.

IDADE FENOLÓGICA DO EXPLANTE	Tempo (dias)									
	0		10		30		60		90	
	%M	MS	%M	MS	%M	MS	%M	MS	%M	MS
GEMA	0	0,2	-	3,1	72,3	13,2	93,1	75,0	90,0	453,5
BROTO JOVEM	0	0,2	-	1,9	10,3	2,8	60,7	47,5	100,	156,8
BROTO DESENVOLVIDO	0	0,2	-	0,9	25,3	8,3	47,9	47,3	95,8	176,1
PLANTA ADULTA	0	0,2	-	1,2	1,6	5,9	42,0	42,0	86,5	244,4

%M = porcentagem de micropropagação.
ms= massa de matéria seca do explante.

Tabela 4. Taxa de micropropagação e massa de matéria seca dos brotos obtidos após 60 e 90 dias de cultivo.

Idade Fenológica	Taxa de micropropagação (número de brotos produzidos por explante)		Massa de matéria seca produzida por broto (mg)	
	tempo de cultivo (dias)		tempo de cultivo (dias)	
	60	90	60	90
GEMA	6,0	5,9	12,5	76,9
BROTO JOVEM	5,3	5,0	9,0	31,4
BROTO DESENVOLVIDO	4,3	5,0	11,0	33,5
PLANTA ADULTA	3,6	5,25	11,7	55,1

Figura 11. Massa de matéria seca produzida por explante (ápice caulinar) provenientes de brotos em diferentes idades fenológicas em função do tempo de cultivo.

Figura 12. Porcentagem de micropropagação em função do tempo de ápices provenientes de diferentes idades fenológicas.

bastante superior. Foi observado que aos 10 dias de cultivo o ápice de gema já apresentava matéria seca 1.6 vezes maior que o ápice de broto jovem e 2.6 vezes mais que ápice de planta adulta e 3.4 vezes maior que broto desenvolvido (Tabela 3).

Com relação ao aspecto micropropagação, observando-se os valores da taxa de multiplicação (número de brotos produzidos por explante) aos 60 dias de cultivo (Tabela 4), nota-se que estes valores decrescem em função do aumento da idade fenológica do explante, ou seja, a taxa de multiplicação do ápice de gema é maior que broto jovem, que é maior que de broto desenvolvido que por sua vez é maior que de planta adulta, sendo respectivamente 6.0 - 5.3 - 4.3 e 3.6 brotos por explante.

A associação entre massa de matéria seca de cada broto e o número de brotos por explante também apresentou maior quantidade de matéria seca por explante.

Observando-se a Tabela 3 e Figura 12 onde é apresentada a porcentagem de multiplicação em função do tempo, verifica-se que a 30 dias de cultivo registrou-se a máxima diferença entre os explantes utilizados. Gema apresentou-se 72.3 %, broto desenvolvido 25.3 %, broto jovem 10.3 % e planta adulta 1.6% entretanto esta diferença tendeu a se reduzir com longo tempo de cultivo atingindo valores similares aos 90 dias quando os valores observados foram ao redor de 90 % de micropropagação.

Do ponto de vista potencial de

micropropagação, o ápice de gema apresenta uma eficiência interessante pois responde rapidamente, ou seja, produz muitos brotos em curto espaço de tempo se comparado aos outros explantes testados.

Convém ressaltar que comparando-se as taxas de multiplicação deste experimento com os obtidos no experimento do efeito de fitoreguladores NAA e BAP, (item 4.1.1) e considerando o meio básico (MS) suplementado com 2 mg/l de BAP como sendo o melhor onde a taxa de micropropagação para ápices foi de aproximadamente 2,5 brotos por explante (Fig 10) e com porcentagem de micropropagação de 67 % (fig 9) no presente experimento obteve-se taxa de micropropagação (6 brotos por explante, Tab 4) e porcentagem de micropropagação de 90 % (Tab 3) mais elevadas. Isso deveu-se possivelmente a homogeneização dos ápices caulinares utilizados como fonte de explante.

Aparentemente, quanto mais jovem for o material vegetal utilizado como explante, maior é o seu potencial de resposta morfogénetica. Este aspecto é nitidamente observado na Fig. 12, onde a planta adulta apresenta resposta de brotamento bastante lento.

Nas Figuras 13 à 15 são apresentadas fotos dos estágios da fase "in vitro" do processo de micropropagação.

O inconveniente da utilização de gema de rizoma como fonte de explante é a dificuldade de se obter a desinfecção do mesmo, pois se trata de material que esteve

Figura 13. Estágios da fase "in vitro" do processo de micropropagação (a. início do brotamento; b. desenvolvimento dos brotos; c. enraizamento).

Figura 14. Detalhe da formação de brotos na região basal da plântula.

exposto ao solo diretamente. No caso de brotos já desenvolvidos ou até de plantas com folhas já expandidas, o ápice caulinar fica protegido e o processo de limpeza e assepsia é facilitado.

Figura 15. Estágio final da fase "in vitro" do processo de micropropagação: Plantinhas completas com sistema radicular desenvolvido, prontas para aclimação.

4.1.3. ACLIMATAÇÃO

Um dos problemas encontrados no processo de transferência das plântulas obtidas "in vitro" para a condição "ex vitro" reside no fato de que elas são provenientes de uma condição de cultivo (dentro de frascos fechados) onde a umidade relativa do ar é aproximadamente 100%, e em condição de campo ou mesmo em casa de vegetação o valor da umidade ambiente é bem inferior. Além disso, em condição de cultivo "in vitro", especialmente com a utilização de agar (que no caso contém os nutrientes) como substrato de sustentação, faz com que a plântula desenvolva um sistema radicular bastante frágil.

Considerando esses aspectos, o processo de aclimação das plântulas exige um estudo minucioso de parâmetros como: melhor tamanho de parte aérea e sistema radicular, melhor substrato, melhor procedimento que minimize o choque causado pela diminuição brusca da umidade relativa, etc...

Este trabalho experimental consistiu na aclimação de plântulas de três diferentes idades, utilizando-se vermiculita como substrato e solução de HOAGLAND & ARNON (1950) como fonte de nutrientes minerais. As plantas foram cobertas com plástico no momento da transferência o qual foi removido em diferentes intervalos de tempo de cultivo. Como a micorriza tem sido utilizada para ampliar a superfície de absorção do sistema

radicular, neste experimento testou-se o seu efeito na aclimação e crescimento das plantas durante o processo de aclimação.

A avaliação dos resultados é apresentado nas Figuras 16 à 20 e Tabela 5.

Observa-se que o aumento do tamanho da plântula favoreceu o "pegamento". Isto se deve provavelmente ao fato do sistema radicular ser também proporcionalmente mais desenvolvido, apresentando raízes em maior número e maior espessura (Tabela 2). Com estas características a plântula possui mais condições de se adaptar rapidamente ao novo substrato (vermiculita) e aproveitar melhor os nutrientes fornecidos.

Os resultados indicaram que plástico serve bem ao processo de aclimação de plântulas em pequena escala sendo observado que melhor resultado se obtém com a remoção da cobertura plástica após 10 dias da transferência para condições "ex vitro" (Tabela 16).

O tamanho da plântula transferida parece ser um parâmetro relevante a considerar durante o processo de aclimação, pois plantas do tipo III (Tabela 2) mesmo com cobertura com menos de 10 dias aclimataram-se (Fig. 16).

O tratamento com micorriza apresentou resultados significantes tanto no processo de aclimação como no crescimento das plantas (Figs. 16 e 17). A presença de micorriza permitiu maior porcentagem de aclimação das plantas (Fig. 20) sendo inclusive observada a aclimação

mesmo em ausência de cobertura plástica (Fig. 17).

Figura 16. Efeito da idade da plântula, do tempo de cobertura plástica e do tratamento do substrato com micorriza (sem micorriza), após 50 dias da transferência.

Figura 17. Efeito da idade da plântula, do tempo de cobertura plástica e do tratamento do substrato com micorriza (com micorriza), após 50 dias da transferência.

Figura 18. Efeito do tratamento com micorriza no desenvolvimento das plântulas cobertas com plástico a 0, 10 e 20 dias, após 50 dias da transferência.

S/M

C/M

O dia

S/M

C/M

10 dias

COBERTURA

S/M = SEM MICORRIZA

C/M = COM MICORRIZA

Figura 19. Efeito do tratamento com micorriza no tamanho do sistema radicular e da parte aérea das plântulas do tipo III cobertas com plástico por durante 0 e 10 dias após 50 dias da transferência.

Figura 20. Efeito do tratamento do substrato com micorriza e do tempo de cobertura no "pegamento" das plantas no processo de aclimação.

No que diz respeito ao desenvolvimento das plantas durante a aclimação foi observado um considerável efeito da micorrização tanto no tamanho quanto na massa de matéria seca das plantas infectadas comparadas com as não infectadas (Figs.18,19 e 20, e Tabela 5).

A avaliação da massa de matéria seca de parte aérea e sistema radicular das plantas aclimatadas após 50 dias de cultivo estão apresentadas na Tabela 5. Os resultados revelaram acentuado efeito do tratamento com micorriza tanto na parte aérea como no sistema radicular das plantas tratadas comparadas com as plantas não tratadas; que foi diretamente proporcional ao tipo de planta utilizada e ao tempo de cobertura.

O efeito de tempo de cobertura com plástico dentro de um mesmo tipo específico de plântula para massa de matéria seca de parte aérea e raízes, tanto para tratamento com e sem micorriza não foi conclusivo..

Tabela 5. Massa de matéria seca (mg) produzida pelas plantas aclimatadas provenientes dos diversos tratamentos.

Tempo de cobertura (dias)			0	5	10	15	20
Tipo I	S/M	Folhas	0,101	----	0,167	0,029	0,114
		Raizes	0,023	----	0,042	0,001	0,006
	C/M	Folhas	----	0,330	0,379	0,258	0,143
		Raizes	----	0,101	0,088	0,068	0,023
Tipo II	S/M	Folhas	0,142	0,192	0,268	0,163	0,104
		Raizes	0,031	0,081	0,091	0,051	0,050
	C/M	Folhas	0,203	0,450	0,472	0,363	0,292
		Raizes	0,069	0,125	0,138	0,145	0,066
Tipo III	S/M	Folhas	0,238	0,087	0,125	0,214	0,271
		Raizes	0,094	0,026	0,044	0,082	0,113
	C/M	Folhas	0,366	0,533	0,433	0,372	0,451
		Raizes	0,111	0,164	0,142	0,121	0,117

S/M = sem micorriza.

C/M = com micorriza.

4.2. Produção de calos.

4.2.1. Cultivo de discos de rizoma.

Embora Yasuda (1988), tenha relatado resultados positivos para formação de calos em experimento com seis meses de cultivo em meio suplementado com NAA (1 mg/l) e KIN (0,1 mg/l), a avaliação feita nos experimentos deste trabalho após oito meses de cultivo revelou nenhum resultado positivo de formação de calos.

Com o passar dos dias, os explantes apresentaram-se oxidados em algumas regiões ou na maioria dos casos por completo. Supõe-se que seja devido a oxidação do componente que dá a coloração azul ao rizoma, pois alguns discos permaneceram claros mesmo depois de meses.

4.2.2. Teste de tipos de explantes, fitorreguladores (2,4-D e NAA) e influência da luz.

Este experimento foi realizado visando selecionar o melhor explante, a melhor composição em fitorreguladores do meio de cultura e a melhor condição de cultivo para se obter indução de calos a partir de tecido de zedoária.

Os resultados das avaliações após 50 dias de cultivo estão apresentados nas Tabela 6 e ilustrados nas Figuras 21 à 25. Em média foram avaliados 18 explantes

devido a perda de alguns por contaminação.

Tratamento com 2,4-D:

A análise dos dados revela que 2,4-D, largamente utilizado como indutor de calos não apresentou efeito algum para zedoária. Tratamento com 2,4-D, tanto no claro como no escuro, independente do tipo de explante e concentração testada (1 à 20 mg/l), não apresentou nenhum sinal de crescimento do explante e muito menos formação de calos. Além disso os explantes morreram em poucos dias de cultivo. Apenas no tratamento com 1 mg/l em segmento de raiz (extremidade), houve um indício de indução de calos na região apical, mas o explante apresentou-se muito oxidado.

Tratamento com NAA:

Neste experimento foram testados explantes provenientes de várias regiões da plântula (obtidas "in vitro" pelo processo de micropropagação). Estes foram inoculados em meios de cultura contendo diferentes concentrações de NAA (0, 1, 5, 10 e 20 mg/l) e de maneira a verificar o efeito da luz na produção de calos estes explantes foram cultivados em presença e na ausência de luz. Os resultados obtidos estão descritos abaixo:

Apice caulinar: Luz parece ter um efeito significativo na produção de calos por NAA em ápices de

zedoária. Os resultados ilustrando este efeito são apresentados na Fig.21. No tratamento controle (ausência de

Figura 21. Ápices caulinares cultivados em meios de cultura contendo diferentes concentrações de NAA e 2,4 D, em condições de luz e no escuro.

NAA) observou-se o desenvolvimento normal de plantinhas com formação de folhas e inclusive raízes tanto no claro como no escuro. Entretanto os resultados dos tratamentos contendo diferentes concentrações de NAA mantidos no claro mostraram uma inibição gradativa da formação de parte aérea que foi positivamente relacionada com a concentração de NAA. Em concentrações baixas de NAA (1 e 5 mg/l) houve aparecimento de raízes, formação de brotos laterais sem no entanto haver produção de calos. O aumento da concentração de NAA (10 e 20

mg/l) inibiu o crescimento do explante bem como a formação de parte aérea. Entretanto os explantes apresentaram-se escurecidos devido possivelmente a oxidação fenólica. Com excessão da concentração de 10 mg/l onde houve indícios de formação de calos. Por outro lado os resultados dos tratamentos com diferentes concentrações de NAA mantidos no escuro revelaram um efeito do NAA na indução de calos que foi diretamente proporcional a concentração de NAA. No tratamento contendo 1 mg/l de NAA ainda houve formação de raízes e pouca formação de calos, já nos tratamentos contendo 5 e 10 mg/l de NAA, a frequência de explantes formando calos aumentou significativamente e com 20 mg/l houve diminuição de NAA na indução de calos.

Base foliar: Os resultados da avaliação do efeito utilizando base foliar com explante são apresentados na Tabela 6. Obteve-se resultado de formação de calos no tratamento com 1 mg/l de NAA cultivado no escuro. Com o aumento da concentração de NAA, houve diminuição proporcional de formação de calos e aumento do grau de oxidação do explante. Neste experimento mais uma vez a luz agiu inibindo a formação de calos.

Bainha e limbo foliar: A avaliação dos dados apresentados na Tabela 6. Os resultados permite-se afirmar que bainha e limbo foliar não foram efetivos para produção de calos, além disso os explantes apresentaram oxidação fenólica severa. Apenas bainha apresentou indício de formação de calos na região próxima a estrutura de adesão da

folha à planta (a lígula) em todas as concentrações testadas e quando cultivada no escuro.

Segmentos de raízes: A exemplo do ocorrido com ápice, luz também apresentou um efeito significativo na indução de calos por NAA quando segmentos de raízes de zedoária foram utilizados como explante. Neste experimento, para que se pudesse distinguir a contribuição do meristema radicular em promover ou não a indução de calos, as raízes foram separadas em duas partes: segmentos de raízes com meristema apical e segmentos de raízes sem meristema apical.

Figura 22 Ápices radiculares cultivados em meios de cultura contendo diferentes concentrações de 2,4 D e NAA em condições de luz e no escuro, após 50 dias de cultivo.

Os resultados das avaliações realizadas 50 dias após a inoculação são apresentadas na Tabela 6 e ilustradas pelas Figs.22 e 23. Estes resultados revelaram um efeito positivo do NAA na indução de calos que foi inversamente proporcional a concentração dentro dos limites testados e inversamente relacionado com a presença de luz, pois condições de escuro para o cultivo foi o que apresentou melhor desenvolvimento de calos. Na ausência de NAA (contrôle) ocorre nenhuma manifestação de crescimento para ambos os segmentos de raiz, tanto no claro como no escuro. Concentrações de NAA ao redor de 1 mg/l no escuro foi o que mostrou os melhores resultados onde houve a produção satisfatória de calos friáveis e sem oxidação quando comparadas com as outras concentrações testadas. O cultivo de ambos os explantes em presença de luz revelou que a indução de calos por NAA é diretamente dependente da concentração de NAA. Concentrações de NAA maiores que 1 mg/l, no escuro, tendem a reduzir a formação de calos e causar o escurecimento do explante.

Figura 23. Segmentos da região mediana da raiz em meios de cultura contendo diferentes concentrações de NAA e 2,4 D, em condições de luz e no escuro, após 50 dias de cultivo.

Figura 24. Calos obtidos do cultivo da porção mediana da raiz e meio de cultura contendo 1ppm de NAA e condições de escuro.

Figura 25. Produção de calos a partir de ápice caulinar em meio básico MS suplementado com 10 mg/l de NAA.

Tabela 6. Produção de calos utilizando-se diferentes partes da plântula como explante e meios de cultura contendo diferentes concentrações de NAA, cultivados na presença de luz e no escuro.

Explante	NAA (mg/l)									
	0		1		5		10		20	
	L	E	L	E	L	E	L	E	L	E
ápice caulinar	-	-	-	+	-	++	+	++	-	+
base foliar	-	-	+	+++	+	++	+	++	-	+
bainha foliar	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
limbo foliar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ápice radicular	-	-	+	++	++	+++	+	+	+	+
região mediana da raiz	-	-	+++	++	+	+	+	+	-	+

* L= Luz

** E= Escuro

- não produção de calos

+ indução de formação de calos

++ pouca produção de calos

+++ média produção de calos

++++ boa produção de calos

4.3. Cultura de suspensões celulares.

Os calos provenientes do cultivo em meio sólido quando transferidos para meio líquido no início não apresentaram sinal de crescimento aparente, possivelmente devido a fase de adaptação ao meio e as novas condições de cultivo, sendo que alguns calos apresentaram oxidação. Após aproximadamente 4 semanas observou-se indução de crescimento das culturas com presença de aglomerados de aspecto branco opaco. Nas transferências subsequentes a cultura apresentou crescimento normal.

4.3.1 Curva de crescimento.

A análise da curva de crescimento (Fig. 26) mostrou que a fase "lag" foi de aproximadamente 4 dias seguindo-se uma fase exponencial de crescimento de 10 dias e em seguida uma fase linear que também durou aproximadamente 10 dias terminando assim a curva de crescimento.

Observou-se que o perfil da curva de crescimento obtido para zedoária foi semelhante às curvas de crescimento encontradas na literatura para outras culturas.

Figura 26. Curva de crescimento de células de zedoária em suspensão - massa de matéria fresca (g) em função de tempo de cultivo (dias).

4.3.2 Aplicabilidade do teste de tetrazólio na avaliação de crescimento de células em suspensão.

O estabelecimento e cultivo de células em suspensão necessitam de emprego de técnicas adequadas que permitam o monitoramento da viabilidade ou seja do estado metabólico celular. Existem várias técnicas aplicáveis utilizando-se corantes vitais. Esses podem ser do tipo que não penetram nas células vivas (intactas), devido a permeabilidade seletiva celular, como o Azul de Evans. Existem os que são metabolizados pelas células vivas com formação de produtos fluorescentes como é o caso do diacetato de fluoresceína (atividade da enzima esterase) ou coloridos como os sais de tetrazolium (eficiência respiratória) (DIXON, 1985).

Neste experimento verificou-se que a técnica utilizando cloreto de 2,3,5 trifenil tetrazólio mostrou ser eficiente para o monitoramento de crescimento de células de zedoária.

A curva mostrando a direta associação entre a absorbância da cor vermelha do trifenilformazan (produto formado durante o teste) e a concentração de células de zedoária é mostrada na Figura 27. Os resultados sugerem a possibilidade da aplicabilidade do método para monitoramento do crescimento das células em suspensão celular de zedoária.

Como uma variação da técnica, pode-se,

utilizando diluições adequadas, antes de se fazer a digestão com etanol para solubilização do precipitado vermelho (trifenilformazan), fazer a contagem das células coradas (células vivas) diretamente em microscópio, obtendo-se assim a porcentagem de células vivas da cultura durante o crescimento.

Figura 27. Curva da leitura de absorbância do teste de tetrazólio (leitura à 485 nm) em função da concentração celular (mg).

4.4. Organogênese indireta.

A propagação da zedoária é atualmente feita vegetativamente, ou seja, pela partição dos rizomas e posterior plantio. A utilização deste método causa baixa viabilidade genética na população de plantas propagadas. A multiplicação de plantas via organogênese indireta proporciona a possibilidade de se criar variabilidade genética (variação somaclonal) pelo aumento da frequência natural de mutação ou de se induzir variabilidade através do tratamento dos calos com agentes mutagênicos.

Neste trabalho, a transferência das células que foram crescidas em suspensão para meio de cultura sólido contendo 2 mg/l de BAP foi observado induzir organogênese (regeneração de plântulas a partir de células que é ilustrado nas Figuras 28 à 32. .

Embora tenhamos denominado de organogênese a regeneração acima não fica descartada a possibilidade de estar ocorrendo embriogênese. Tal definição só será possível após estudos histológicos do material.

Figura 28. Fase inicial da organogênese com formação de regiões clorofiladas e de primórdios foliares.

Figura 29. Detalhe da organogênese indireta apresentando regiões de calos com aspecto friável, regiões clorofiladas (em início de diferenciação celular e primórdios foliares).

Figura 30. Desenvolvimento de parte aérea com definição de folhas.

Figura 31. Formação de parte aérea com presença de folhas expandidas.

Figura 32. Plântulas completas (parte aérea com folhas expandidas e sistema radicular) individualizadas, com crescimento normal.

3.7. Análise química.

Os cromatogramas mostrando os compostos químicos presentes em diferentes tecidos de zedoária são apresentados nas Figs. 33 a 40.

A análise por cromatografia planar dos extratos diclorometânicos revelou que os rizomas da planta original e da planta micropropagada apresentam o mesmo perfil qualitativo. Observou-se que os extratos das folhas e

das raízes da planta micropropagada apresentaram um perfil análogo entre si, mas diferente do observado para os rizomas. Os extratos das células e do meio não apresentaram nenhum componente detectável por cromatografia planar.

Similarmente ao perfil cromatográfico entre os extratos dos rizomas originais e micropropagado foi observado através da cromatografia líquida (Figs.33 à 35) e da cromatografia gasosa (Figs. 36 à 40), porém foram observados diferenças quantitativas entre vários componentes.

A cânfora foi a única substância identificada no extrato dos rizomas (Figs. 37 e 38) e folhas (Fig.40) através da cromatografia gasosa (tempo de retenção 4,9 min).

O cromatograma à gás obtido para o extrato do calos (Fig.39) não apresentou cânfora, mas sim uma série de outras substâncias que não foram detectadas nos extratos dos rizomas ou das folhas.

O espectro de RMN-H do extrato diclorometânico dos rizomas indica a presença de substâncias terpenóides, possivelmente sesquiterpenos.

Figura 33. Cânfora padrão separada por cromatografia líquida.

Figura 34. Substâncias químicas do extrato diclorometânico de rizoma da planta original separadas por cromatografia líquida.

Figura 35. Substâncias químicas do extrato diclorometânico de rizoma de rizoma de planta micropropagada separadas por cromatografia líquida.

Figura 36. Cânfora padrão separada por cromatografia gasosa.

Figura 37. Substâncias químicas do extrato diclorometânico de rizoma da planta original separadas por cromatografia gasosa.

Figura 38. Substâncias químicas do extrato diclorometânico de rizoma de planta micropropagada separadas por cromatografia gasosa.

Figura 39. Substâncias químicas do extrato diclorometânico de calos separadas por cromatografia gasosa.

5. CONCLUSÕES.

Os resultados obtidos na manipulação "in vitro" de células e tecidos de zedoária (*Curcuma zedoaria* Roscoe), nas condições deste trabalho, permitiram as seguintes conclusões:

. A micropropagação de *Curcuma zedoaria* foi controlada utilizando-se meio de cultura MS suplementado com 2 mg/l de BAP e ápices de gema como explante.

. Plantas de *Curcuma zedoaria* obtidas "in vitro" transferidas para vermiculita e irrigadas com solução de Hoagland apresentaram aclimação satisfatória utilizando-se cobertura de plástico durante 10 dias. O tamanho da plantinha afetou significativamente a capacidade de aclimação das plantas.

. O tratamento das plantinhas com endomicorriza na transfêrencia para vermiculita mostrou efeito positivo tanto para aclimação como no posterior desenvolvimento das plantas aclimatadas.

. Meio MS suplementado com 1 mg/l de NAA inoculado com segmentos de raízes e cultivados no escuro foi o tratamento com fitoreguladores que apresentou a melhor indução de calos.

. Células de calos obtidas em meio MS contendo 1 mg/l de NAA foram satisfatoriamente estabilizadas em meio líquido de mesma composição e apresentaram curvas de crescimento com perfil típico de células em suspensão.

. Organogênese com regeneração de plantas foi conseguida transferindo-se calos obtidos em meio MS contendo 1 mg/l de NAA para meio MS contendo 2 mg/l de BAP.

. A análise química do material vegetal mostrou que a planta micropropagada produz os mesmos metabólitos secundários que a planta original, e os calos produzem substâncias diferentes daquelas produzidas pela planta original.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- ANDERSON, R. C. & LIBERTA, A. E. Variation in vesicular-arbuscular micorrhizal relationships of two sand prairie species. *American Midland Naturalist*, Notre Dame, **118**: 56-63, 1987.
- ANSARI, M. H. & AHMAD, S. *Curcuma zedoaria* root extract "in vitro" demonstration of antiamebic activity. *Biomedical Research*, Aligarh, **2**(2): 192-6, 1991.
- BAJAJ, Y. P. S.; FURMANOWA, M.; OLSZOWSKA, O. Biotechnology of the micropropagation of medicinal and aromatic plants. In: BAJAJ, Y. P. S., ed. *Biotechnology in agriculture and forestry*. Berlin, Springer Verlag, 1988. v.4, p.60-103.
- BALANDRIN, M. F. & KLOCKE, J. A. Medicinal, aromatic and industrial materials from plants. In: BAJAJ, Y. P. S., ed. *Biotechnology in agriculture and forestry*. Berlin, Springer Verlag, 1988. v.4, p.3-36.

- BELL, E. A. The physiological role(s) of secondary (natural) products. In: STUMPF, P. K. & CONN, E. E., ed. **The biochemistry of plants**. New York, Academic Press, 1981. v.7, p.1-19.
- BLAL, B. & GIANINAZZI-PEARSON, V. Interest of endomycorrhizae for the production of micropropagated oil palm clones. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, (in press). 1990.
- BRANZANTI, B.; RAVOLANIRINA, F.; GIANINAZZI, S. Endomycorrhizazione di fruttiferi micropropagati. **Proceedings Agro. Bio. Frut.** (in press) 1990.
- BRODELIUS, P. Permeabilization of plant cells for release of intracellularly stored products; viability studies. **Applied and Microbiology Biotechnology**, Berlin, 27: 561-6, 1988.
- BRODELIUS, P. & NILSSON, K. Permeabilization of immobilized plant cells, resulting in release of intracellularly stored products with preserved cell viability. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, 17: 275-80, 1983.
- BRODELIUS, P & NILSSON, K. Entrapment of plant cells in different matrices; a comparative study. **FEBS LETTERS**, Amsterdam, 122: 312-6, 1990.

- BRUNDRETT, M. C. & KENDRICK, B. The mycorrhizal status, root anatomy, and phenology of plants in a sugar maple forest. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, 66: 1153-73, 1988.
- BUTCHER, D. N. Secondary products in tissue cultures. In: REINERT, J. & BAJAJ, Y. P. S., ed. *Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture*. Berlin, Springer Verlag, 1977. cap.2, p.668-93.
- CROCOMO, O. J. & MELO, M. Practical aspects of the production of secondary metabolites by plant cell cultures. In: CROCOMO, O. J.; SHARP, W. R.; MELO, M., ed *Biotecnologia para produção vegetal*. Piracicaba, CEBTEC/FEALQ, 1991. P.373-89.
- DIXON, R. R. Isolation and maintenance of callus and cell suspension cultures. In: DIXON, R. A., ed. *Plant cell culture; a practical approach*. Oxford, IRL Press, 1985. p.1-20.
- ELISABETSKY, E. New directions in ethnopharmacology. *Journal of Ethnobiology*, Dekalb, 6(1): 121-8, 1986.
- ELISABETSKY, E. Pesquisas em plantas medicinais. *Ciência e Cultura*, São Paulo, 39(8): 697-702, 1987.

- FLICK, C. E. Isolation of mutants from cell culture. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y., ed. **Handbook of plant cell culture**. New York, Mac Millan , 1983. v.1, p.393-441.
- FOWLER, M. W. Plant-cell Cultures; fact and fantasy. **Biochemical Society Transactions, Aberdeen, 11: 23-8, 1982.**
- FOWLER, M. W. Process strategies for plant cell cultures. **Trends Biotechnology, Amsterdam, 4: 214-9, 1986.**
- FUJITA, Y. & TABATA, M. Secondary metabolites from plant cells-pharmaceutical appliciations and progress in commercial production. In: GREEN, C. E.; SOMERS, D. A.; HACKETT, W. P.; BIESBOER, D. D., ed. **Plant tissue and cell culture**. New York, Alan R. Liss, 1987. p. 169-85.
- GOLDSWORTH, A. Growth control in plant tissue cultures. In: MIZRAHI, A., ed. **Biotechnology in agriculture**. New York, Alan R. Liss, 1988. v.9, p.36-51..
- GOTTLIEB, O. R. & MORS, W. B. Potential utilization of Brazilian wood extractives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry, Washington, 28: 196-215, 1980.**

- GRAHAM, J. H. & SYVERTSEN, J. P. Host determinants of mycorrhizal dependency of citrus rootstock seedlings. *New Phytologist*, London, **101**: 667-76, 1985.
- GUENTHER, E. *The essential oils*. Toronto, D. Van Nostrand, 1952. 125p.
- GUPTA, S. K.; BANERJEE, A. B.; ACHARI, B. Isolation of ethyl p-methoxycinnamate, the major antifungal principle of *Curcuma zedoaria*. *Lloydia*, Pittsburg, **39**(4): 218-22, 1976.
- HALDIMANN, D. & BRODELIUS, P. Redirecting cellular metabolism by immobilization of cultured plant cells; a model study with *Coffea arabica*. *Phytochemistry*, Oxford, **26**(5): 1431-4, 1987.
- HARDIE, K. & LEYTON, L. The influence of vesicular arbuscular mycorrhiza on growth and water relations of red clover. I. On phosphate deficient soil. *New Phytologist*, London, **89**: 599-608, 1981.
- HENDRICK, B. A. D.; KITT, D. G.; WILSON, G. T. Mycorrhizal dependence and growth habit of warm-season and cool-season tallgrass prairie plants. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, **66**: 1376-80, 1988.

HIKINO, H.; AGATSUMA, K.; TAKEMOTO, T. Furanodiene, a precursor of furan-containing sesquiterpenoids. *Tetrahedron Letters*, Elmsford, **8**: 931-3, 1968a.

HIKINO, H.; AGATSUMA, K.; TAKEMOTO, T. Structure of curzerenone, epicurzerenone and isofuranogermacrene (curzerene). *Tetrahedron Letters*, Elmsford, **24**: 2855-8. 1968c.

HIKINO, H.; KONNO, C.; TAKEMOTO, T. Structure of dehydrocurdione, a sesquiterpenoid of *Curcuma zedoaria*. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, Tokyo, **20**(5): 987-9, 1972.

HIKINO, H.; SAKURAY, Y.; TAKEMOTO, T. Structure of curculone. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, Tokyo, **15**(7): 1065-6, 1967.

HIKINO, H.; SAKURAY, Y.; NUMABE, S. Structure of curcumenol. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, Tokyo, **16**(1): 39-42, 1968b.

HIKINO, H.; SAKURAY, Y.; TAKEMOTO, T. Structure of procurcumenol. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, Tokyo, **16**(8): 1605-7, 1968d.

HIKINO, H.; KONNO, C.; AGATSUMA, K.; TAKEMOTO, T.

Sesquiterpenoids. Part XLVII. Structure, configuration, conformation and thermal rearrangement of furanodienone, isofuranodienone, curzerenone, epicurzerenone, and pyrocurzerenone, sesquiterpenoids of *Curcuma zedoaria*. *Journal of Chemical Society*, London, **1**: 478-84, 1975.

HIKINO, H.; MEGURO, K.; SAKURAI, Y.; TAKEMOTO, T.

Structure of curcumol. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, Tokyo, **14**(11): 1241-9, 1966a.

HIKINO, H.; SAKURAY, Y.; TAKAHASHI, H.; TAKEMOTO, T.;

Structure of curdione. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, Tokyo, **14**(11): 1310-1, 1966b.

HIKINO, H.; TORI, K.; HORIBE, I.; KURIYAMA, K.

Sesquiterpenoids, part XXXVII, absolute configuration and conformation of zederone, a sesquiterpenoid of *Curcuma zedoaria*. *Journal Chemical Society*, London, **c**: 688-91, 1971.

HOAGLAND, D. & ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. Berkeley, California Agriculture Experimental Station, 1950. (circular, 347).

- KIM, K. S.; PAIK, J. M.; HWANG, W. I. Determination of antitumor effects of extracts from korean medicinal plants on cancer cell. *Korea Univ. Med. J.*, Seoul 25(3): 759-70, 1988.
- KOIDE, R. T. Nutrient supply, nutrient demand and plant response to mycorrhizal infection. *New Phytologist*, Cambridge, 117: 365-86, 1991.
- KOUNO, I. & KAWANO, N. Structure of a guaiane from *Curcuma zedoaria*. *Phytochemistry*, Oxford, 24(8): 1845-7, 1985.
- LINDSEY, K. & YEOMAN, M. M. Novel experimental systems for studying the production of secondary metabolites by plant tissue cultures. In: MANTELL, S. H. & SMITH, H., ed. *Plant biotechnology*. Cambridge, Cambridge University Press, 1983. p.39-66.
- MAEDA, H. Pharmacological effects of the powder from *Curcuma zedoaria* Roscoe on the gastrointestinal tract of experimental animals. *Yakugaku Zasshi*, Shibuya-ku, 104(6): 640-3, 1984.
- MAUGH, T. H. To attract or repel, that is the question. *Science*, Lancaster, 218(15): 278, 1982.

- MILLER, R. M. The ecology of vesicular-arbuscular mycorrhizal in grass and shrublands. In: SAFIR, G. R., ed. *Ecophysiology of V A mycorrhizal plants*. Florida, CRC Press, 1987. p.135-70.
- MISAWA, M. Production of useful plant metabolites. In: FIECHTER, A., ed. *Advances in biochemical engineering biotechnology*. Berlin, Springer-Verlag, 1985. v.31, p.59-88.
- MIYAKE, E. T. Zedoaria. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. São Paulo, 1(2): 192-9, 1986.
- MORRIS, P., SCRAGG, A. H.; SMART, N. J. S.; STAFFORD, A. Secondary product formation by cell suspension cultures. In: DIXON, R. A., ed. *Plant cell culture; a practical approach*. Oxford, IRL Press, 1985. cap.7, p.127-67.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioessays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 15: 473-97, 1962.
- PARR, A. J. Secondary products from plant cell culture. In: MIZRAHI, A., ed. *Biotechnology in agriculture*. New York, Alan R. Liss, 1988. v.9, cap.1, p.1-34.

- PAYNE, G. F. & SHULER, M. L. Selective adsorption of plant products. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, 31: 922-8, 1988.
- POPE, P. E.; CHANEY, W. R.; RHODES, J. D.; WOODHEAD, S. H. The mycorrhizal dependency of four hardwood tree species *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, 61: 412-7, 1983.
- RAVOLANIRINA, F.; GIANINAZZI, G.; TROUVELOT, A.; CARRÉ, M. Production of endomycorrhizal explants of micropropagated grapevine rootstocks. *Agriculture Ecosystems and Environment*, Amsterdam, 1990.
- RHODES, M. J. C.; ROBINS, R. J.; HAMILL, J. D.; PARR, A. J. WALTON, N. J. Secondary product formation using *Agrobacterium rhizogenes* transformed "hairy root" cultures. *Newsletter*, New Haven, 53: 2-32, 1987.
- SAFIR, G. R. & NELSEN, C. E. V. A. Mycorrhizae; plant and fungal water relations. In: NORTH AMERICAN CONFERENCE ON MYCORRHIZAE, 6., Covallis, 1985. *Proceedings*
- SAFIR, G. R.; BOYER, J. S.; GERDEMANN, J. W. Micorrhizal enhancement of water transport in soybean. *Science*, Lancaster, 172: 581-3, 1971.

- SEABRA, A. P. A obtenção de produtos químicos por cultura de tecidos vegetais. *Química Nova*, São Paulo, 9(1): 63-7. 1986.
- SHIBUYA, H.; YAMAMOTO, Y.; MIURA, I.; KITAGAWA, I. Absolute stereostructure of furanogermenone, a biologically active sesquiterpene from zedoariae rhizoma. *Heterocycles*, Tokyo, 17: 215-8, 1982.
- SIMÕES, C. M. O.; MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P.; IRLANG, B. E.; STEHMANN, J. R. Plantas da medicina popular do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, UFRGS, 1986. 173p.
- ST. JOHN, T. V. Root size, root hairs and mycorrhizal infection; a re-examination of Baylis's hypothesis with tropical trees. *New Phytologist*, Cambridge, 84: 483-7, 1980.
- STREET, H. E. Applications of cell suspension cultures. In: REINERT, J. & BAJAJ, Y. P. S., ed. *Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture*. Berlin, Springer-Verlag, 1977. cap.1, p.649-67.

- TISSERAT, B. Embryogenesis, organogenesis and plant regeneration. In: DIXON, R. A.; ed. **Plant cell culture; a practical approach**. Oxford, IRL Press, 1985. p.79-104.
- TYLER, V. E. Medicinal plant research; 1953-1987. **Planta Medica**, Stuttgart, **54**(2): 95-100, 1988.
- WHITAKER, R. J. & EVANS, D. A. Plant biotechnology and the productuion of flavor compounds. **Food Technology**, Chicago, p.86-101. 1987.
- WHITAKER, R. J. & HASHIMOTO, T. Production of secondary metabolites. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V. ed. **Handbook of plant cell culture**. New York, Mac Millan , 1986. v.4, cap. 10, p.264-86.
- YAMADA, Y. & FUJITA, Y. Production of useful compounds in culture. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y., ed. **Handbook of plant cell culture**. New York, Mac Millan , 1983. v.1 cap.23, p.717-28.
- YAMAHARA, J.; MATSUDA, H.; SAWADA, T.; KUSHIDA, H.; SHIBUYA, H.; KITAGAWA, I. Effect of crude drugs on experimental liver damages; the active principle of zedoariae rhizoma. **Yakugaku Zasshi**, Shibuya-Ku, **102**(3): 306-9, 1982.

YASUDA, K.; TSUDA, T.; SHIMIZU, H.; SUGAYA, A.

Multiplication of *Curcuma* species by tissue culture.

Planta Medica, Stuttgart, **54**: 75-9, 1988.

YEOMAN, M. M. Bypassing the plant. **Annals of Botany**,

London, **60**: 157-174, 1987.

YOSHIHARA, M.; SHIBUYA, H.; KITANO, E.; YANAGI, K.;

KITAGAWA, I. The absolute stereostructure of

(4s,5s)-(+)-germacrone 4,5-epoxide from *zedoariae*

rhizome cultivated in Yakushima Island. **Chemical**

Pharmaceutical Bulletin, Tokyo, **32**(5): 2059-62, 1984.