

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

MAYLA BESSA SCOTÁ

**EFEITO DO TIPO DE EXPLANTE E REGULADORES DE
CRESCIMENTO VEGETAL NA INDUÇÃO DE CALOS EM TRÊS
CULTIVARES DE *Psidium guajava* VISANDO A PRODUÇÃO DE
METABÓLITOS SECUNDÁRIOS**

VITÓRIA - ES

2023

MAYLA BESSA SCOTÁ

**EFEITO DO TIPO DE EXPLANTE E REGULADORES DE
CRESCIMENTO VEGETAL NA INDUÇÃO DE CALOS EM TRÊS
CULTIVARES DE *Psidium guajava* VISANDO A PRODUÇÃO DE
METABÓLITOS SECUNDÁRIOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

Área de concentração: Fisiologia Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Elias Terra Werner

VITÓRIA - ES

2023



Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO CURSO DE MESTRADO EM BIOLOGIA VEGETAL DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL DO CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO - ATA Nº 164 - 17/02/2023.

Em sessão pública ocorrida no dia dezessete de fevereiro de dois mil e vinte e três, por webconferência, conforme Portaria Normativa nº 08, da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação/UFES de 01 de julho de 2021, procedeu-se a avaliação da dissertação da aluna **Mayla Bessa Scotá**. Às 8h, o Prof. Dr. Elias Terra Werner - UFES (Orientador e Presidente da Comissão Examinadora de Defesa de Dissertação), deu início aos trabalhos, convidando a compor à mesa o Prof. Dr. Paulo Cezar Cavatte - UFES (Examinador interno) e a Profa. Dra. Milene Miranda Praça Fontes - UFES/ALEGRE (Examinadora Externa). A seguir, o presidente solicitou à mestranda que fizesse uma explanação de seu trabalho intitulado "EFEITO DO TIPO DE EXPLANTE E REGULADORES DE CRESCIMENTO NA INDUÇÃO DE CALOS EM TRÊS CULTIVARES DE *PSIDIUM GUAJAVA* VISANDO A PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS". Terminada a apresentação, o presidente passou a palavra aos examinadores, que procederam à arguição da candidata. Ao final, a Comissão, em sessão reservada, deliberou pela **APROVAÇÃO** da referida dissertação nos termos do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal. Encerrada a sessão, eu, Prof. Dr. Elias Terra Werner, presidente da Comissão Examinadora, lavrei a presente ata que vai com as devidas assinaturas (De acordo com a Portaria Normativa nº 08 da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação/UFES de 01 de julho de 2021, membros de banca externos à UFES que não atuam como docentes permanentes ou colaboradores nos Programas de Pós-Graduação da UFES estão dispensados da obrigatoriedade de assinatura digital da ata. Caso o membro externo não assine a ata e, sendo o Coordenador o responsável final pela realização da banca, a assinatura do Coordenador via Lepisma assegura a legitimidade necessária do documento).

Prof. Dr. Elias Terra Werner (UFES)
Orientador e Presidente da Banca

Prof. Dr. Paulo Cezar Cavatte (UFES)
Examinador Interno

Profa. Dra. Milene Miranda Praça Fontes (UFES/ALEGRE)
Examinadora Externa

Secretaria Integrada de Programas de Pós-Graduação – SIP
Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo; situada à Av. Fernando Ferrari, 514,
Goiabeiras - 29075-910 – Vitória/ES. Tel.: (27) 4009-2524 – sip.ufes2@gmail.com – www.secretaria.cohn.ufes.br

**EFEITO DO TIPO DE EXPLANTE E REGULADORES DE
CRESCIMENTO VEGETAL NA INDUÇÃO DE CALOS EM TRÊS
CULTIVARES DE *Psidium guajava* VISANDO A PRODUÇÃO DE
METABÓLITOS SECUNDÁRIOS**

MAYLA BESSA SCOTÁ

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal na área de concentração Fisiologia Vegetal.

Aprovada em de de 2023.

Comissão Examinadora:

Dr. Elias Terra Werner - UFES
Orientador e Presidente da Comissão

Dr. Paulo Cezar Cavatte - UFES
Examinador Interno

Dr^a. Milene Miranda Praça Fontes - UFES
Examinador Externo

*Ao meu esposo, Kelvin de Jesus Leite,
por embarcar nos meus sonhos,
pela linda amizade,
amor e carinho*

À toda minha família

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida, por me guiar e me abençoar em todos os passos dessa conquista;

Ao meu esposo, meu maior incentivador, kelvin, biólogo, mestre em Biologia Vegetal, por todo apoio, amparo emocional e incentivo nessa linda jornada;

À Universidade Federal do Espírito Santo e, em especial, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal pela oportunidade concedida;

À agência de fomento Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES), pelo apoio financeiro e bolsa de estudo;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Elias Terra Werner, pela oportunidade, pela confiança no meu trabalho, por me apoiar nas minhas decisões, pela compreensão e pelos diversos ensinamentos e conselhos que vão além da vida acadêmica;

A Prof^a. Dr^a. Milene Miranda Praça Fontes por me receber de braços abertos no Laboratório de Citogenética e Cultura de tecidos Vegetais (LABCITO), pelos diversos conselhos e ensinamentos;

Ao Prof. Dr. Luciano Menini, e, o doutorando Aldino, que colaboraram na execução de parte do projeto no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo – Alegre;

Aos amigos do LABCITO, Aline, Geisiele, Kaoany, Gustavo, Loren e Sônia, pela colaboração na execução do projeto de pesquisa, pelos inúmeros momentos de descontração e as lindas risadas que juntos compartilhamos. Vocês deixaram a minha estadia na cidade de Alegre - ES de forma leve, feliz e agradável;

Aos meus pais, Tereza e Evódio, que me apoiaram e incentivaram ao longo de toda jornada. Sem o amor de vocês nada disso teria sentido;

As minhas irmãs, Franciely e Merielly, aos meus cunhados, Adriano e Thiago, por todo apoio, incentivo, carinho, e, pelos lindos sobrinhos. Tia Mayla ama vocês incondicionalmente, Isabella, Lavínia, Eduarda e Ricardo;

A minha segunda família, meu sogro e sogra, José e Cremilda, minhas cunhadas, Kevilin e Ketlyn, e, ao meu cunhado Vinícius, por me receberem de braços abertos na família, por todo apoio e carinho;

Finalmente, agradeço a todos que de alguma forma torceram e contribuíram direta ou indiretamente para a realização dessa conquista.

Muito obrigada!

RESUMO

Psidium guajava (goiabeira) é conhecida pela comercialização de frutos com fins ornamentais e medicinais, com a utilização de infusões de folhas e raízes, onde observa-se a presença dos metabólitos secundários (MeS) que são benéficos a saúde. Infusão de folhas, raízes ou até mesmo as cascas da espécie *P. guajava* é amplamente utilizada para tratar doenças gastrointestinais como, dor no estômago, desinteria e constipação. Abordagens biotecnológicas como as técnicas de cultura de tecidos vegetais (CTV), como produção de biomassa através da calogênese, são utilizadas para fornecer material vegetal em larga escala de forma padronizada podendo ser utilizado para suprir e mitigar a superexploração de plantas medicinais retiradas de fontes nativas ou áreas cultivadas. O objetivo geral do trabalho foi induzir a calogênese *in vitro* utilizando diferentes combinações de reguladores de crescimento vegetal (RCVs) (2,4-D, ANA, KIN e BAP) e explantes de folhas, hipocótilos e raízes, extraídos de plântulas de *P. guajava* germinadas *in vitro* das cultivares Paluma e Cortibel (C1 e C6). Para isso foram avaliados os parâmetros de IVG e % de germinação; indução de calos em explantes de folha, hipocótilo e raízes; avaliação anatômica dos calos *in vitro* de explantes foliar da cultivar Paluma no tempo 0 a 49 dias de incubação; prospecção fitoquímica em extrato aquoso e alcoólico da biomassa de calos provenientes de explantes foliares das cultivares Paluma e Cortibel (C1 e C6) cultivados sob a influência da combinação dos RCVs 2,0 mg L⁻¹ 2,4-D + 1,0 mg L⁻¹ ANA + 1,0 mg L⁻¹ KIN (T1), onde apresentou as melhores médias de indução de calos nas três cultivares testadas visando identificar a presença de MeS sintetizados à partir da biomassa do tecido caloso. A combinação dos RCVs 2,0 mg L⁻¹ 2,4-D + 1,0 mg L⁻¹ ANA + 1,0 mg L⁻¹ KIN (T1), aos 60 dias, promoveram 100% de indução de calos em explantes foliar das cultivares testadas, e, superior a 85% nas demais combinações de RCVs testados em Paluma e Cortibel (C1 e C6). Grupos importantes dos MeS foram detectados, como, taninos, flavonas, saponinas, chalconas e auronas pela prospecção fitoquímica nas cultivares Paluma e Cortibel (C1 e C6), e, o grupo das catequinas apenas em Cortibel (C1 e C6). Explantes foliar mostraram-se mais suscetíveis a calogênese *in vitro* em menor tempo do que explantes de hipocótilos e raízes nas cultivares testadas, Paluma e Cortibel (C1 e C6), e, capacidade de sintetizar MeS,

sendo, portanto, recomendado para obtenção de maior quantidade de biomassa vegetal.

Palavras-chave: Calogênese • goiaba • germinação • *in vitro* • myrtaceae

ABSTRACT

Psidium guajava (guava) is known for the commercialization of fruits for ornamental and medicinal purposes, using infusions of leaves and roots, where the presence of secondary metabolites (MeS) that are beneficial to health is observed. Infusion of leaves, roots or even the bark of the species *P. guajava* is widely used to treat gastrointestinal diseases such as stomach pain, dysentery and constipation. Biotechnological approaches such as plant tissue culture (CTV) techniques, such as biomass production through callogenesis, are used to provide plant material on a large scale in a standardized way and can be used to supply and mitigate the overexploitation of medicinal plants taken from native sources or cultivated areas. The general objective of this work was to induce callogenesis *in vitro* using different combinations of plant growth regulators (PGRs) (2,4-D, ANA, KIN and BAP) and explants of leaves, hypocotyls and roots, extracted from *P. guajava* germinated *in vitro* from the cultivars Paluma and Cortibel (C1 and C6). For this, the parameters of IVG and % of germination were evaluated; callus induction on leaf, hypocotyl and root explants; anatomical evaluation of *in vitro* calluses from leaf explants of the Paluma cultivar from 0 to 49 days of incubation; phytochemical prospection in aqueous and alcoholic extract of callus biomass from leaf explants of Paluma and Cortibel cultivars (C1 and C6) cultivated under the influence of the combination of PGRs 2.0 mg L⁻¹ 2,4-D + 1.0 mg L⁻¹ ANA + 1.0 mg L⁻¹ KIN (T1), which showed the best callus induction averages in the three cultivars tested in order to identify the presence of MeS synthesized from the callus tissue biomass. The combination of PGRs 2.0 mg L⁻¹ 2,4-D + 1.0 mg L⁻¹ ANA + 1.0 mg L⁻¹ KIN (T1), at 60 days, promoted 100% callus induction in leaf explants of the tested cultivars, and greater than 85% in the other combinations of PGRs tested in Paluma and Cortibel (C1 and C6). Important MeS groups were detected, such as tannins, flavones, saponins, chalcones and auronas by phytochemical prospecting in Paluma and Cortibel cultivars (C1 and C6), and the catechins group only in Cortibel (C1 and C6). Leaf explants were more susceptible to callogenesis *in vitro* in a shorter time than hypocotyl and root explants in the tested cultivars, Paluma and Cortibel (C1 and

C6), and, ability to synthesize MeS, being, therefore, recommended for obtaining greater amount of plant biomass.

.

Keywords: Callogenesis • guava • germination • *in vitro* • myrtaceae

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Região neotropical. Disponível em: <https://stringfixer.com/pt/Neotropical_realm>. Acessado em: 26 set. 2022..... 23

Figura 2: Planta adulta de *Psidium guajava*. Disponível em: <http://cnip.org.br/banco_img/Goiabeira/psidiumguajavalinn6.html>. Acessado em: 26 set. 2022.....**Erro!**

Indicador não definido.5

Figura 3: Plântula germinada *in vitro* com 100 dias de *Psidium guajava* Paluma com sistema radicular pivotante. Arquivo pessoal.....25

Figura 4: Flores brancas de *P. guajava* com elevada quantidade de estames. Disponível em: <https://i.pinimg.com/originals/d3/76/8b/d3768bbe6607dbdc106ce5f3235e75f5.jpg>. Acessado em: 26 set. 2022.....25

Figura 5: Frutos maduros de *P. guajava* Paluma e Cortibel, respectivamente, coletados na zona rural Palmeiras, município de Mimoso do Sul - ES. Arquivo pessoal.....26

Figura 6: Vias para a micropropagação *in vitro* de plantas (NODARI, 2016).....31

Figura (1) artigo: **A** Plântula de *P. guajava* Paluma germinada *in vitro* com 120 dias em meio MS suplementado com ágar (7,5 g L⁻¹), sacarose (30,0 g L⁻¹) e ácido ascórbico (0,1 g L⁻¹), utilizada para a obtenção dos explantes de folha (**f**), hipocótilo (**h**) e raiz (**r**). **B** Explantes de folha. **C** Explante de hipocótilo. **D** Explante de raiz. Desenvolvimento dos calos em explante de folha aos 30 (**E**) e 60 dias (**F**), hipocótilo aos 30 (**G**) e 60 (**H**) e de raiz aos 30 (**I**) e 60 (**J**) dias de incubação em meio MS, nas mesmas proporções anteriores, suplementado com os RCVs 2,0 mg L⁻¹ 2,4-D + 1,0 mg L⁻¹ ANA + 1,0 mg L⁻¹ KIN (T1). A seta em **A** indica os cotilédones, não utilizados no experimento. Barra = 1 cm em **A**, **B**, **C** e **D**, e, 4 mm em **E**, **F**, **G**, **H**, **I** e **J**.....61

Figura (2) artigo: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) ao longo da indução de calos em explantes foliares de *P. guajava* Paluma submetidos à combinação dos RCVs 2,0 mg L⁻¹ 2,4-D + 1,0 mg L⁻¹ ANA + 1,0 mg L⁻¹ KIN (T1). Epiderme abaxial no tempo 0 (**A**), 14 (**C**) e 28 (**E**) dias de incubação. Mesofilo foliar no tempo 0 (**B**), 14 (**D**) e 28 (**F**) dias de incubação. Aspecto do tecido calogênico no tempo 42 (**G**) e 49 (**H**) dias de incubação. **et** Estômato (**A**, **D**); **ep1** Epiderme adaxial (**B**); **ep2** Epiderme abaxial (**A** e **B**); **ce** Cera epicuticular (**B**); **fx** Feixe vascular (**B**); **pp** Parênquima paliádico (**B**); **pl** Parênquima lacunoso (**B**); **ra** Rachaduras na epiderme e região com tecido entumecido (**C**); **et*** secreção de substâncias pela abertura estomática (**C** e **E**); **ep** Epiderme (**D**); **cp** Células parenquimáticas (**E** e **F**) surgindo na epiderme indicando a ontogenia dos calos; **ci** Células isodiamétricas; **ca** Células alongadas.....66

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Combinações e concentrações dos RCVs para a indução de calogênese *in vitro* em explantes foliar, hipocotiledonar e radicular obtidos de plântulas germinadas *in vitro* da espécie *P. guajava* cultivares Paluma e Cortibel (C1 e C6).....56
- Tabela 2: Resultados de *P-valor* da análise de variância em esquema fatorial triplo, referente ao Índice de Velocidade de Germinação (IVG) e porcentagem de germinação (%G) de sementes de *P. guajava* cultivares Paluma e Cortibel (C1 e C6), submetidas, ou não, a quebra de dormência (QD) por imersão em água estéril aquecida a 80°C (1 minuto), incubadas em meio MS½ suplementado com diferentes concentrações de sacarose (g L⁻¹) após 30 dias de incubação.....55
- Tabela 3: Médias de índice de velocidade de germinação (IVG) das sementes de *P. guajava* cultivar Cortibel C6 submetida, ou não, a quebra de dormência (QD) por imersão em água estéril aquecida a 80°C (1 minuto), e incubadas em meio MS½ suplementado com diferentes concentrações de sacarose (g L⁻¹)58
- Tabela 4: Médias de porcentagem de germinação (%G) das sementes de *P. guajava* cultivares Paluma (PL) e Cortibel (C1 e C6) submetidas, ou não, a quebra de dormência (QD) por imersão em água estéril aquecida a 80°C (1 minuto), e incubadas em meio MS½ suplementado com diferentes concentrações de sacarose (g L⁻¹).....59
- Tabela 5: Resultados de *P-valor* da análise de variância em esquema fatorial duplo, referente a porcentagem de indução de calos aos 30 e 60 dias de incubação sob diferentes combinações de RCVs e explantes (Exp) obtidos de plântulas germinadas *in vitro* da espécie *P. guajava* cultivares Paluma e Cortibel (C1 e C6)62
- Tabela 6: Porcentagem de indução de calos *in vitro* nos diferentes explantes de folha, hipocótilo e raiz, obtidos de plântulas com 120 dias germinadas *in vitro* de *P. guajava* cultivar Cortibel (C1) aos 30 dias de incubação submetidos a diferentes combinações dos RCVs (Tabela 1)62

Tabela 7: Porcentagem de indução de calos <i>in vitro</i> nos diferentes explantes, folha, hipocótilo e raiz, obtidos de plântulas com 120 dias germinadas <i>in vitro</i> de <i>P. guajava</i> cultivar Cortibel (C1), aos 60 dias, Paluma (PL) e Cortibel (C6) aos 30 e 60 dias de incubação submetidos a diferentes combinações dos RCVs (Tabela 1)	64
Tabela 8: Prospecção fitoquímica das classes dos MeS identificados nos diferentes extratos obtidos dos calos induzidos <i>in vitro</i> submetidos a combinação dos RCVs 2,0 mg L ⁻¹ 2,4-D + 1,0 mg L ⁻¹ ANA + 1,0 mg L ⁻¹ KIN (T1) de explantes foliar de <i>P. guajava</i> cultivares Paluma (PL) e Cortibel (C1 e C6).....	67

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	177
2. OBJETIVO GERAL	22
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
4.1 Família Myrtaceae e o gênero <i>Psidium</i>	24
4.1.1 <i>Psidium guajava</i>	25
4.1.2 Consumo, interesses medicinais, e, agroindustriais	27
4.1.3 Propagação da espécie <i>Psidium guajava</i>	29
4.1.3.1 Germinação e desenvolvimento <i>in vitro</i> de <i>Psidium guajava</i>	30
4.1.3.2 Micropropagação <i>in vitro</i> de <i>Psidium guajava</i>	30
4.2 Metabolismo primário e secundário das plantas.....	33
4.2.1 Óleos essenciais em espécies de <i>Psidium guajava</i>	33
4.2.2 Calogênese <i>in vitro</i> como ferramenta para produção de biomassa vegetal e biossíntese de MeS.....	35
5. REFERÊNCIAS	36
ARTIGO	51
Resumo.....	52
Introdução	52
Materiais e métodos.....	55
<i>Germinação in vitro</i>	55
<i>Indução de calos</i>	55
<i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	56
<i>Prospecção fitoquímica dos MeS em extratos aquosos e alcóolicos</i>	57
<i>Análise estatística</i>	57
Resultados	57
<i>Germinação in vitro</i>	57
<i>Indução de calos</i>	60
<i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	64
<i>Prospecção fitoquímica dos MeS em extratos aquosos e alcóolicos</i>	67
Discussão.....	68
Conclusão	73
Referências.....	73

1. INTRODUÇÃO GERAL

O uso de plantas medicinais está ligado de forma intrínseca a história do homem. O uso de medicamentos naturais a base de plantas ocorre em todas as camadas sociais e em quase toda a humanidade (TEIXEIRA *et al.*, 2014). Em virtude do apelo midiático para o consumo de produtos à base de fontes naturais, o avanço populacional e o uso indiscriminado de plantas medicinais, estima-se um aumento de 27% do uso ao longo da pandemia causada pelo vírus SARS-COV 2 (BRAGA *et al.*, 2021). Infusão de folhas, raízes, e até mesmo de cascas de plantas medicinais, são utilizadas para tratar doenças gastrointestinais como desenteria, dor no estômago e indigestão (MORAES *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2021), para além, possui atividade biológica como bactericida (AGUIAR *et al.*, 2018), e, atividades antioxidantes (MENEZES *et al.*, 2016). A presença dos metabólitos secundários (MeS) nos diferentes órgãos das plantas medicinais é o que as tornam eficientes para tratar determinados tipos de doenças, agregando valor econômico na sua comercialização e para a produção de fármacos (ALI *et al.*, 2019). Os MeS são constituintes voláteis e de extrema complexibilidade (LANGENHEIM, 1994; PICHERSKY; GERSHENZON, 2002) sintetizados em diferentes órgãos das plantas, principalmente nas folhas, em virtude de estratégias adaptativas aos estresses bióticos e abióticos (NARAYANI *et al.*, 2017).

Fatores ambientais, genéticos e/ou fisiológicos afetam diretamente a produção de plantas medicinais para utilização terapêutica, como, a qualidade e quantidade da matéria prima vegetal (RESCAROLLI *et al.*, 2009; DE SOUZA *et al.*, 2018). Além disso, plantas medicinais são obtidas de forma predatória e indiscriminada no ambiente natural, podendo levar a perda significativa da biodiversidade no ambiente natural. Neste sentido abordagens biotecnológicas como a cultura de tecidos vegetais (CTV) tornou-se uma aliada nas últimas décadas para propagação e conservação dessas espécies, e, sobretudo, mitigar a exploração descontrolada de plantas vindas do campo ou áreas cultivadas (RESCAROLLI *et al.*, 2009). Dentre as técnicas de CTV, a calogênese *in vitro* é considerada como uma etapa inicial da regeneração de plantas. De modo geral, o tecido caloso é uma massa de células parenquimáticas indiferenciadas formado a partir da interação entre explantes vegetal, meio nutritivo contendo micro e

macronutrientes e reguladores de crescimento vegetal (RCVs) capazes de promover a divisão e crescimento celular em condições controladas *in vitro* (SOBRINHO et al., 2021). A partir do mesmo, e estímulos específicos, as células indiferenciadas poderá originar brotos, via organogênica, ou então formar embriões somáticos, via embriogênica, elevando o nível de propagação da espécie (NODARI, 2016). O desenvolvimento do tecido caloso pode ser obtido de diferentes órgãos vegetais, como, folhas e hipocótilos, todavia, explantes foliares vem se destacando pela utilização mais frequente, como em espécies de *Psidium guajava* (goiabeira) (SING et al., 2005; BUTT et al., 2013), *Litchi chinensis* (lichia) (MA et al., 2009) e *Eugenia involucrata* (eucalipto) (GOLLE et al., 2020). Além das vantagens mencionadas, a biomassa de tecido caloso pode ser utilizada para produção e biossíntese de substâncias bioativas, como os MeS, com maiores rendimentos, e, elevado padrão de qualidade (WITHERUP et al., 1990; MASSOT et al., 2000; BOURGAUD et al., 2001; RAZAVI et al., 2016).

O gênero *Psidium* (família Myrtaceae) é amplamente conhecido pela comercialização de frutos, fins ornamentais e por suas espécies produtoras de MeS. Entre as espécies, *Psidium guajava*, conhecida como goiabeira, é uma espécie amplamente cultivada em regiões tropicais e subtropicais do mundo (SILVA et al., 2021), de fácil adaptação aos climas, e, portanto, é amplamente encontrada por todo território brasileiro (SOBRAL et al., 2012; HAMINIUK et al., 2006). A goiabeira é uma árvore de pequeno porte, podendo atingir entre 3 e 6 metros de altura. O período de floração da espécie *P. guajava* ocorre em geral entre os meses de setembro a novembro (DANNER et al., 2010). A espécie *P. guajava* é conhecida pela alta variabilidade genética, e, portanto, no Brasil possuem várias cultivares. A cultivar Paluma é a mais aceita e compreende cerca de 70% dos pomares (COSER et al., 2014), seu fruto possui coloração vermelha. A cultivar Cortibel foi desenvolvida na cidade de Santa Tereza (ES), e, em virtude da variabilidade genética, os frutos variam entre o branco (Cortibel C1) e rosa escuro (Cortibel C6) (COSER et al., 2014).

Desde 1986, *P. guajava* está incluída na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do Sistema Único de Saúde (RENISUS), o que corrobora o potencial do uso no âmbito medicinal (RENISUS, 2009) em virtude dos compostos metabólicos produzidos pela planta. A Farmacopeia Brasileira em sua 6ª edição

(2019), incluiu o uso das folhas desidratadas de *P. guajava* na base para formulação de medicamentos naturais, devido a presença de taninos e flavonoides, constituintes importantes dos MeS (BRASIL, 2019). A infusão de folhas, raízes, cascas dos frutos, ou extratos concentrados, possuem atividades biológicas e fins terapêuticos, comumente utilizados como, bactericidas (AGUIAR *et al.*, 2018), fungicida (BRAGA, 2016), antioxidantes (MENEZES *et al.*, 2016), anti-hipertensivo (BRAGA, 2019), além de tratar doenças gastrointestinais, como, constipação, dor de estômago, e desinteria (GUTIÉRREZ, *et al.*, 2008; PENIDO *et al.*, 2016; COSTA *et al.*, 2016; MORAES *et al.*, 2019). Além disso, plantas produtoras de MeS com elevado potencial de atividade biológica, como as espécies de *Psidium*, são alvo de pesquisas que visam o desenvolvimento de herbicidas ecológicos como alternativa para minimizar os danos causados pelos herbicidas sintéticos (VASCONCELOS, *et al.*, 2021).

A composição química e rendimento dos OEs, constituinte volátil dos MeS, de *P. guajava* foi descrita. Os OEs obtidos pela hidrodestilação de folhas de *P. guajava* cultivadas em ambientes distintos do Espírito Santo (ES), publicados por De Souza *et al.*, (2018), indicam a prevalência de 87,55 a 99,0% de sesquiterpenos, onde os compostos majoritários são cariofileno, α -humuleno, nerolidol, β -bisaboleno, β -bisabolol e hinesol, corroborando com dados publicados por Savoldi *et al.*, (2020) e Silva *et al.*, (2021). Todavia, como dito anteriormente, fatores ambientais, genéticos e/ou fisiológicos podem afetar diretamente a qualidade e produção dos MeS além da quantidade da matéria prima vegetal disponível para extração e consumo (RESCAROLLI *et al.*, 2009; DE SOUZA *et al.*, 2018). Nesse sentido abordagens biotecnológicas como a calogênese *in vitro* pode ser adotada a fim de minimizar os problemas de obtenção de biomassa vegetal de forma padronizada e em maiores quantidades.

As técnicas de embriogênese somática (KAMLE *et al.*, 2017), indução de brotos (ARRUDA *et al.*, 2019), regeneração por protoplastos (REZAZADEH; NIEDZ, 2015) e indução de calos (BUTT *et al.*, 2013) para a espécie de *P. guajava* estão descritas. As técnicas para a indução da calogênese varia, e, diferentes porcentagens de indução podem ser observadas. Singh *et al.*, (2005) notou o aparecimento de calos em meio MS contendo ANA (1 mg L^{-1}), 2,4-D (2 mg L^{-1}) e

cinetina (1 mg L^{-1}), médias de 23,56,43% (folha), 28,58 % (epicótilo) e 34,57 % (hipocótilo) a partir de explantes excisados de plantas cultivadas *in vitro* de *P. guajava*, e, 19,06 % (folha), 25,04 % (epicótilo) e 31,03 % (hipocótilo) de plantas *ex vitro*. Butt *et al.*, (2013) utilizou explantes foliares e obteve 88,67% de calos em meio B5 suplementado com $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D, e 89,33% suplementado com $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA. Rezazadeh *et al.*, (2015) obteve médias de 18,33% de microcalos induzidos a partir do cultivo de protoplastos em meio contendo $0,75 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA e $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP.

Os estudos com o potencial de produção de MeS *in vitro* com a espécie de *P. guajava* são escassos, e, até o momento, não há relatos na literatura do potencial de produção de MeS em biomassa de calos. Capote *et al.*, (2009) relatou pela primeira vez o perfil metabólico de brotos de *P. guajava* cultivados *in vitro*, onde, apesar do rendimento ter sido menor, 23 compostos foram detectados a mais quando comparado a plantas *ex vitro*. Salla *et al.*, (2014) obteve maiores rendimentos de compostos fenólicos em raízes, aproximadamente $6,5 \text{ mg g}^{-1}$, e parte aérea com aproximadamente 10 mg g^{-1} , de plantas cultivadas *in vitro* de Eucalipto (família myrtaceae) submetidas por 15 dias a estresse com o uso da bactéria *Streptomyces rhizobacteria*, quando comparado ao rendimento de plantas controle onde o obteve-se rendimento de aproximadamente 5 mg g^{-1} em cortes de raízes, e, na parte aérea 7 mg g^{-1} de fenóis. Estudo com outras espécies de plantas podem ser encontrados na literatura. Segundo Mathew *et al.*, (2014), o rendimento de alcaloides foi maior na cultura de calos ($0,23 \text{ mg/peso de massa seca}$) quando comparado ao rendimento de folhas ($0,193 \text{ mg/peso de massa seca}$) e células em suspensão ($0,18 \text{ mg/peso de massa seca}$) em espécie de *Ocimum sanctum* (manjeriço santo), e, o rendimento dos terpeóides foi maior na cultura de células em suspensão ($0,337 \text{ mg/peso de massa seca}$) e calos ($0,303 \text{ mg/peso de massa seca}$) quando comparado ao rendimento da folhas ($0,227 \text{ mg/peso de massa seca}$). Yang *et al.*, (2009) manteve em suspensão por 21 dias 5g de calo fresco da espécie *Glycyrrhiza inflata* (família Fabaceae) em 80mL de meio MS suplementado com $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D, $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA e $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP, ao final, obteve $16,4 \text{ g/L}$ de biomassa vegetal e $95,7 \text{ mg/L}$ do composto flavonoide.

Nesse sentido, o estudo visa atestar que a combinação e concentrações de diferentes RCVs induzem de forma eficiente a calogênese *in vitro* de *P. guajava*

das cultivares Paluma e Cortibel (C1 e C6), além de disponibilizar biomassa vegetal capaz de sintetizar grupos importantes dos MeS. Para isso, foram avaliados as melhores condições para obtenção de plântulas doadoras de explantes (foliar, hipocotiledonares e raízes) através da germinação *in vitro* de sementes de *P. guajava* das cultivares Paluma e Cortibel (C1 e C6), e, a interação entre diferentes explantes (foliares, hipocotiledonares e raízes) e concentrações de RCVs para a indução da calogênese *in vitro* das cultivares Paluma e Cortibel (C1 e C6) para obtenção de biomassa vegetal e posterior análise de prospecção fitoquímica em extrato aquoso e alcoólico para identificar a presença de MeS em calos cultivados *in vitro*.

2. OBJETIVO GERAL

Estabelecer plântulas *in vitro* de *P. guajava* cultivar Paluma e Cortibel (C1 e C6) para obtenção de explantes viáveis, a fim de analisar os efeitos da interação entre explantes e RCVs para maximizar a produção de calos *in vitro*, e, prospecção fitoquímica de extratos aquosos e alcoólicos obtidos dos calos para detecção dos principais grupos dos metabólitos secundários sintetizados ao longo da indução da calogênese.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I) Selecionar indivíduos de *P. guajava* cultivar Paluma e Cortibel (C1 e C6) no campo a serem utilizados como doadores de frutos para obtenção de sementes;
- II) Estabelecer as plântulas *in vitro* das cultivares de *Psidium* a partir da germinação *in vitro* testando diferentes concentrações de sacarose associados, ou não, a quebra de dormência em água aquecida (80°);
- III) Induzir a calogênese *in vitro* através de explantes obtidos das plântulas germinadas *in vitro* (folha, hipocótilo e raiz) das cultivares de *Psidium*, testando diferentes tipos e concentrações de RCVs;
- IV) Avaliar os aspectos morfológicos e anatômicos na ontogenia dos calos de explantes com a maior porcentagem de indução;
- V) Avaliar através da prospecção fitoquímica os grupos dos metabólitos secundários presentes em extratos aquosos e alcoólicos obtidos pela maceração dos calos cultivados *in vitro* das cultivares de *Psidium*.

alagados (POSSA, 2016), o que contribui para a sua ampla distribuição geográfica (TULER *et al.*, 2019). Seus frutos são em geral carnosos e aromáticos, o que atrai diferentes animais que os utilizam como fonte de alimento, uma vez consumindo, estes promovem a dispersão das sementes e conservação das espécies (GRESSLER *et al.*, 2006), caracterizando-as com alta relevância ecológica (SILVA *et al.*, 2021). Para mais, possuem relevância econômica com a exploração comercial de seus frutos, utilização da madeira e plantas para fins ornamentais, além de proporcionarem diferentes atividades biológicas através da utilização dos OEs (BEZERRA *et al.*, 2016). Na farmacologia os OEs são utilizados como antioxidantes, antifúngico, antibactericida e para a agroindústrias como agentes fitotóxicos e larvicida (SCUR *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2021; VASCONCELOS *et al.*, 2021).

4.1.1 *Psidium guajava*

A goiabeira (*P. guajava*) tem aproximadamente de 3 a 6 metros de altura e, portanto, é classificada como uma árvore de pequeno porte (Figura 2). Possuem folhas opostas cruzada, elíptica ou oblonga, margem inteira, e sistema radicular pivotante (Figura 3).



Figura 2: Planta adulta de *Psidium guajava*. Disponível em: <http://cnip.org.br/banco_img/Goiabeira/psidiumguajavalinn6.html>. Acessado em: 26 set. 2022.



Figura 3: Plântula germinada *in vitro* com 100 dias de *Psidium guajava* Paluma com sistema radicular pivotante. Arquivo pessoal.

O período de floração das espécies de *P. guajava* ocorrem em geral entre os meses de setembro a novembro (DANNER *et al.*, 2010) e são marcadas por suas flores brancas classificadas como pentâmeras e hermafroditas (Figura 4). Seus frutos são classificados como bagas (Figura 5) cujo tamanho e coloração da polpa variam em função da cultivar (BANDERA *et al.*, 2015; NGBOLUA *et al.*, 2018; RIBEIRO, 2021). A colheita dos frutos ocorre entre os meses de dezembro a março.



Figura 4: Flores brancas de *P. guajava* com elevada quantidade de estames. Disponível em: <https://i.pinimg.com/originals/d3/76/8b/d3768bbe6607dbdc106ce5f3235e75f5.jpg>. Acessado em: 26 set. 2022.

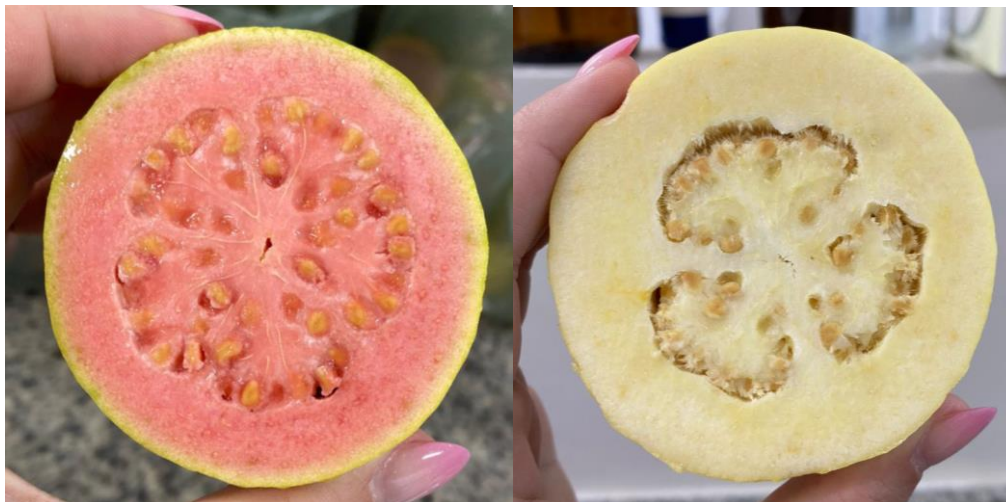


Figura 5: Frutos maduros de *P. guajava* Paluma e Cortibel, respectivamente, coletados na zona rural Palmeiras, município de Mimoso do Sul - ES. Arquivo pessoal.

4.1.2 Consumo, interesses medicinais, e, agroindustriais

O consumo da fruta no Brasil se dá de diferentes formas, destacando-se entre eles o consumo *in natura*. Devido ao alto valor nutricional, indústrias alimentícias investem nos diferentes tipos de processamento da fruta afim de ofertar produtos das mais diversas formas possíveis, como geleias, sucos, doces e compotas para seus consumidores. A goiaba apresenta características importantes para a saúde humana devido seu alto conteúdo de vitamina C (ácido ascórbico), com atividade antioxidante, além de vitaminas A e do complexo B, justificando os elevados investimentos das indústrias na sua comercialização (NIMISHA *et al.*, 2013; BANDERA *et al.*, 2015).

O interesse da espécie na medicina popular e farmacologia cresce a cada dia, pois, além dos complexos vitamínicos, possuem elevada concentração de MeS. Desde 1986 a espécie *P. guajava* está incluída na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do Sistema Único de Saúde (RENISUS), o que corrobora o potencial do uso no âmbito medicinal (RENISUS, 2009). A Farmacopeia Brasileira em sua 6ª edição (2019), incluiu o uso das folhas desidratadas de *P. guajava* na base para formulação de medicamentos naturais, devido a presença de taninos e flavonoides (BRASIL, 2019).

Em sua revisão bibliográfica, Morais-Braga *et al.*, (2016) traz dados onde apontam a eficácia do uso da goiaba contra diferentes tipos de patógenos, sendo eles, bactérias (AGUIAR *et al.*, 2018) e fungos (BRAGA, 2016), além de atividades antioxidante (MENEZES *et al.*, 2016) e anti-hipertensivo (BRAGA, 2019) como também na prevenção de células cancerígenas, como aponta estudos feitos em modelos animais (CORREA, 2016; SILVA *et al.*, 2018; JIANG *et al.*, 2020). Diferentes estudos apontam o uso do chá obtido pela infusão de folhas e flores de *P. guajava* como eficientes no tratamento de infecções gastrointestinais (GUTIÉRREZ, *et al.*, 2008; PRADHAN, *et al.*, 2008). Além das folhas, infusão das raízes também são utilizadas no tratamento de algumas doenças e incômodos intestinais, como, indigestão e constipação, dor de estômago, e desinteria (PENIDO *et al.*, 2016; COSTA *et al.*, 2016; MORAES *et al.*, 2019). Outros relatos apontam o uso de chás feito a partir das cascas para tratar feridas de úlcera, doenças de pele, febre, desidratação e distúrbios respiratórios, assim como desinterias (SHRUTHI *et al.*, 2011).

Adicionalmente, plantas produtoras de MeS como as espécies de *Psidium*, são uma fonte pouco explorada para a elaboração de herbicidas naturais, tendo em vista as atividades fitotóxicas já comprovadas em estudos de citotoxicidade e fitotoxicidade utilizando extratos aquosos, etanólicos, ou até mesmo os óleos essenciais (VASCONCELOS *et al.*, 2019). Vasconcelos *et al.*, (2019) identificou interferência na dinâmica normal do ciclo celular, índice mitótico e alterações cromossômicas da planta modelo *Lactuca sativa* expostas a diferentes concentrações (3000, 1500, 750, 375 e 187,5 µg/mL) de OEs obtidos de folhas de *P. guajava*, evidenciando a ação aneugênica e clastogênica. Da mesma forma, Chapla *et al.*, (2010) evidenciou efeito alelopático na germinação e desenvolvimento inicial de *L. sativa* utilizando extrato aquoso foliar de *P. guajava* nas concentrações de 5, 10 e 20%. Portanto, estudos que buscam atestar a eficiência de herbicidas naturais, visando o controle de pragas agrícolas como plantas daninhas, aliado a baixa toxicidade a saúde humana e ao meio ambiente vem ganhando destaque em pesquisas voltadas a aplicabilidade de plantas produtoras de MeS (ALVES *et al.*, 2022).

4.1.3 Propagação da espécie *Psidium guajava*

A produção de mudas frutíferas com elevado padrão de qualidade genético tem exigido mudanças nos sistemas de propagação de muitas espécies (FRANCO *et al.*, 2008; ALTOÉ *et al.*, 2012), incluindo as goiabeiras. A propagação da goiabeira pode ser realizada pela via assexuada, utilizando a enxertia e estaquia, ou então pela via sexuada, mediante o uso das sementes.

A técnica de enxertia consiste em se juntar partes de duas ou mais plantas, podendo ser de diferentes espécies, a fim de que os tecidos se regenerem e juntos desenvolvam uma nova planta. Todavia, o porta-enxerto irá exercer influências sobre o enxerto, e, reciprocamente (LATTUADA *et al.*, 2010; DE SOUZA, 2014). A propagação por estaquia consiste em obter uma nova planta a partir de pedaços (estacas) extraídos de diferentes locais da planta, como ramos herbáceos, raízes ou até mesmo de folhas (COSTA *et al.*, 2010). Este por sua vez garante qualidade genética e material padronizado para comercialização, justificando os investimentos biotecnológicos em micropropagação *in vitro* e *ex vitro* de inúmeras espécies economicamente importantes. Segundo publicado por De Souza (2014), a técnica de enxertia em espécie de goiabeira serrana obteve eficácia de 92%. Costa *et al.*, (2010) utilizou estacas obtidas de ramos jovens de *P. guajava* cultivar Paluma e Século XXI, tratados com ácido indolbutírico (AIB) para enraizamento, além de diferentes substratos, e após 180 dias de cultivo, obteve crescimento aéreo e radicular em ambas as cultivares testadas, Paluma no entanto, com as maiores média.

A propagação de forma sexuada se dá pela germinação das sementes. Todavia, espécies de *Psidium* possuem a germinação marcada pela desuniformidade, que estão atrelados a fatores bióticos e abióticos, como, temperatura e luminosidade (ANDRADE *et al.*, 2000; ARRUDA *et al.*, 2019), hormonais (TAIZ & ZEIGER, 2013; SINGH *et al.*, 2019), e, até mesmo, disponibilidade de carboidratos no endosperma da semente (TAIZ & ZEIGER, 2013). Por estas razões, e o fato das espécies de *Psidium* possuírem fecundação cruzada, plantações atuais de goiabeiras apresentam elevado índice de variabilidade genética e heterozigosidade (SEBBENN, 2005; ALVES *et al.*, 2007). As diferenças genéticas poderão causar modificações em genes estruturais ou

alterações em genes regulatórios, o que pode comprometer os processos fisiológicos da espécie, como a produção dos frutos ou até mesmo a produção dos MeS (DUDAREVA *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2017).

Em virtude das limitações e vantagens de cada técnica, recomenda-se que a propagação da espécie de *Psidium* para a formação de pomares seja feita pela propagação vegetativa por enxerto ou estaquia, o que garantirá o padrão genético das espécies (ALVES *et al.*, 2007). No entanto, a germinação *in vitro* é amplamente utilizada em programas de melhoramento genético, pois, possibilita a obtenção de plantas em larga escala, com padrão de germinação, podendo ser trabalhada a questão de seleção de indivíduos mais vigorosos, com elevado padrão genético e fitossanitário, além de uniformidade de produção de mudas em qualquer época do ano tendo em vista o controle de temperatura, nutrientes, entre outros, disponibilizados pelas técnicas *in vitro*. (ALVES *et al.*, 2015; ALBINO *et al.*, 2019).

4.1.3.1 Germinação e desenvolvimento *in vitro* de *Psidium guajava*

Os resultados de germinação estão vinculados as condições ambientais maternas expressas ao longo da formação das sementes que influenciam nas propriedades fenotípicas e fisiológicas, e, portanto, diferentes cultivares de *Psidium* inseridas no mesmo ambiente, podem apresentar similaridades nas respostas de germinação (MARTINS *et al.*, 2015; FERNANDES 2020), da mesma forma que, uma mesma cultivar inserida em ambientes distintos podem apresentar diferenças na resposta germinativa das sementes. Além disso, a germinação é influenciada por outros fatores tais como os endógenos e exógenos ao local onde encontram-se as sementes, temperatura, potencial osmótico do substrato, níveis hormonais e permeabilidade do tegumento (TAIZ *et al.*, 2013; FERNANDES 2020).

De Menezes *et al.*, (2010) e Arruda *et al.*, (2019) consideram que o sucesso da germinação *in vitro* com altas % de germinação e maiores índices de IVG em espécies de *P. guajava* está atrelado ao uso de meio MS $\frac{1}{2}$ ou JADES associados a baixas concentrações de sacarose, variando entre 0, 15 e 30 g L $^{-1}$, e, exposição das sementes por 1 minuto a água estéril aquecida (80°C). Segundo Oliveira *et al.* (2003), a vantagem na utilização de água quente se dá pela eficiência, praticidade e o baixo custo na promoção da germinação *in vitro* de forma uniforme. O uso do

meio MS $\frac{1}{2}$ com baixas concentrações de sacarose, ou até mesmo a ausência, proporciona menor pressão osmótica entre meio/semente, favorecendo a absorção de água pela semente (MONFORT *et al.*, 2015). Outro fator limitante para a germinação adequada das sementes é a temperatura em que estas estão inseridas, e, segundo Brancalion *et al.* (2010) temperaturas entre 20 e 30°C são recomendadas para a germinação de espécies tropicais e subtropicais.

Dados publicados por De Menezes *et al.*, (2010) demonstram que sementes de *P. guajava* conseguem germinar sem a adição de sacarose, no entanto, quando associada a sacarose ao ácido giberélico (GA₃) o índice de velocidade de germinação foi maior. Em seu trabalho com araçazeiro (*Psidium cathleianum*), Arruda *et al.*, (2019) descreve uma porcentagem de 66% de germinação das sementes utilizando meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), acrescidos de 30 gL⁻¹ de Sacarose e imersão das sementes por 1 minuto em água quente (80°C). Resultado similar pode ser observado nos dados publicados por Ribeiro *et al.*, (2010) onde relata taxa de germinação de 97% da cultivar *P.guajava* Paluma em meio MS acrescido de 10 gL⁻¹ de Sacarose.

Diante do exposto, e dos diferentes resultados encontrados na literatura referente as diferenças no processo de germinação de sementes de *P. guajava*, protocolos de germinação e desenvolvimento de plântulas *in vitro* permite a multiplicação da espécie em ambiente controlado, sem interferências de fatores bióticos e abióticos que poderiam acometer mudanças na qualidade de desenvolvimento da espécie em campo (DUDAREVA *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2017). A cultura *in vitro* proporcionará plântulas saudáveis, sem alterações genéticas que poderão ser utilizadas para micropropagação em larga escala, independente da época do ano.

4.1.3.2 Micropropagação *in vitro* de *Psidium guajava*

A micropropagação *in vitro* consiste em multiplicar de forma rápida, independente da época do ano, elevado número de plantas com padrão genético uniforme (BORTHAKUR *et al.*, 1998) sob condições assépticas e controladas. Ou seja, explantes excisados de plantas, com diferentes graus de determinação, como tecidos foliar e radicular, ou seguimentos nodais e gemas apicais, podem vir a

adquirir novas competências através da utilização de RCVs sob condições assépticas e controladas *in vitro* até a formação de um novo indivíduo (NODARI, 2016).

Dentre as rotas morfogênicas já descritas e mais comuns na literatura podemos citar a multiplicação *in vitro* que é feita a partir de gemas apicais ou seguimento nodal, onde possuem tecido meristemático já predeterminado para a formação de um novo indivíduo, ou então rotas como a organogênese ou embriogênese somática (Figura 6).

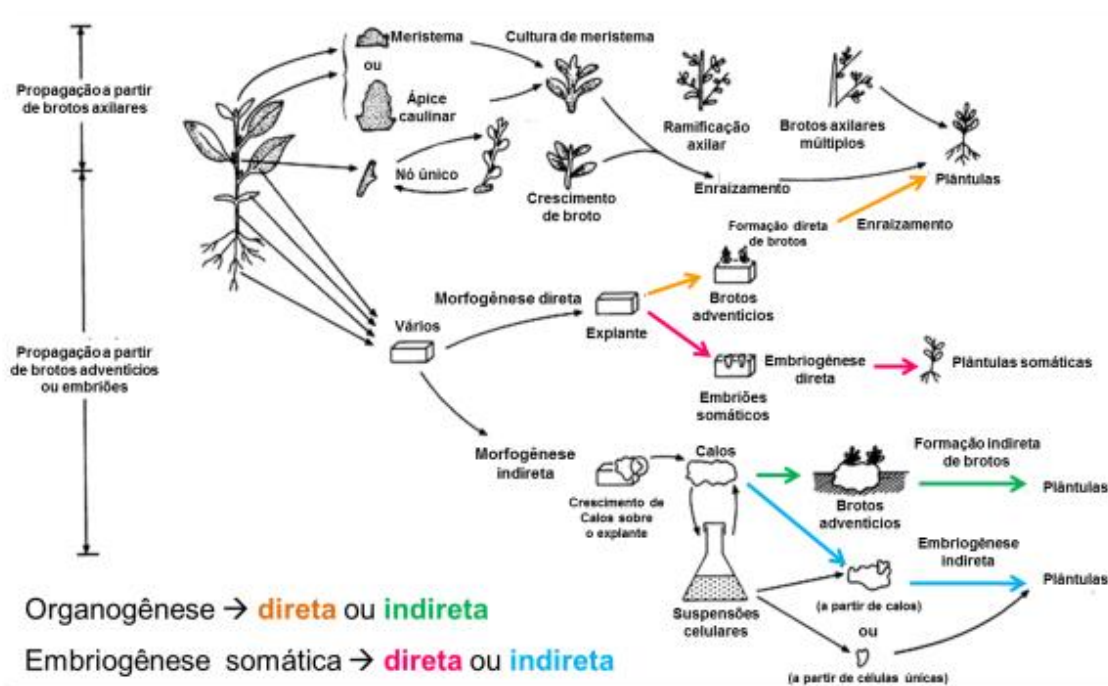


Figura 6: Vias para a micropropagação *in vitro* de plantas (NODARI, 2016).

De modo geral, a organogênese *in vitro* consiste em diferentes aspectos, como, percepção de fitormônios, desdiferenciação de determinadas células diferenciadas para que possam adquirir competência organogênica, reentrada de células quiescentes no ciclo celular e organização da divisão celular para assim formar um novo indivíduo (SUGIYAMA, 1999). O processo de organogênese é subdividido em direta e indireta, onde, na fase direta ocorre a formação de novos indivíduos a partir de diferentes tipos de explantes, sem que ocorra o processo de desdiferenciação celular (SOARES *et al.*, 2007). Todavia a organogênese indireta requer que as células diferenciadas se desdiferenciem em tecido caloso, e, a partir dele, ocorre a formação de brotos, originando um novo indivíduo (NODARI, 2016).

O processo de embriogênese somática é marcado pela formação de embriões a partir de células somáticas embriologicamente competentes (MASCARENHAS *et al.*, 1992), da mesma forma, pode ser dividido em embriogênese direta ou indireta, conforme demonstrado na Figura 6.

Os principais fatores que influenciam o sucesso da calogênese *in vitro* é, genótipo, concentração e combinação de RCVs, e, o tipo de explante utilizado (GEORGE *et al.*, 2008; WERNER *et al.*, 2009; TAIZ *et al.*, 2013). De acordo com a literatura, a combinação dos RCVs auxina e citocininas no meio de cultura é necessária na maioria dos protocolos de calogênese *in vitro* (GRATTAPAGLIA e MACHADO 1990; IKEUCHI *et al.*, 2013). Reguladores como o 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D); Ácido 1-naftalenoacético (ANA), 6-Benzilaminopurina (BAP) e Cinetina (KIN), são amplamente descritos nas literaturas (MOURA *et al.*, 2009; BEAS *et al.*, 2010; REZAZADEH *et al.*, 2015; AKHTAR, 2018). O hormônio auxina está atrelado a metilação do DNA e desdiferenciação celular, as citocininas promove alteração das taxas metabólicas, formação de órgãos, atividade enzimática e no processo de divisão celular, portanto, o uso desses hormônios é essencial no processo de desdiferenciação e divisão celular em culturas *in vitro* (GEORGE *et al.*, 2008; SOARES *et al.*, 2011). Portanto, análogos de auxinas sintéticas como 2,4-D e ANA, e citocininas como BAP, são consideradas estáveis e recomendadas para o uso *in vitro*

Em sua grande maioria, estudos na área de CTV *in vitro* em espécies de *Psidium* estão relacionados a regeneração e propagação *in vitro* através de embriões somáticos (BAJPAI *et al.*, 2016; KAMLE *et al.*, 2014; KAMLE *et al.*, 2017), brotos (ELNAGEEB, 2016; ARRUDA *et al.*, 2019) e protoplastos (REZAZADEH *et al.*, 2015). Outros estudos estão relacionados a indução de calos (RAMIREZ *et al.*, 1998; SINGH *et al.*, 2007; BEAS *et al.*, 2010). A porcentagem de desenvolvimento de tecido caloso descrita para *P. guajava* varia entre os protocolos adotados, origem, idade e tipo de explantes utilizados. Sing *et al.*, (2005) obteve médias de 35,29% de calos induzidos *in vitro* em explantes de folha, contendo o meio MS + 1 mg L⁻¹ de ANA + 2 mg L⁻¹ de 2,4-D + 1 mg L⁻¹ de KIN, excisados de plântulas germinadas *in vitro*. Em contrapartida, Butt *et al.* (2013) utilizou explantes foliares provenientes de plântulas germinadas *in vitro* e obteve 88,67% de calos, no

entanto, o meio utilizado foi o B5 suplementado com $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D e 89,33% de calos contendo a suplementação de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA. Segundo publicado por Elnageeb (2016), concentrações mais baixas de BAP ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$) adicionados em meio MS, contendo 15 g L^{-1} de sacarose, induzem maior porcentagem de brotos, assim como seu comprimento e quantidade de folhas. Bajpai *et al.*, (2016) relata alta taxa de indução de embriões somáticos (58,5%) em meio basal MS, acrescidos de 2,4-D ($2,0 \text{ mg L}^{-1}$), glutamina (400 mg L^{-1}), sacarose (30 g L^{-1}) e extrato de malte (500 mg L^{-1}). A maturação dos embriões foi feita em meio MS acrescidos de BAP ($2,0 \text{ mg L}^{-1}$) e 20 g L^{-1} de sacarose (BAJPAI *et al.*, 2016) e apresentaram bons resultados de maturação.

4.2 *Metabolismo primário e secundário das plantas*

Todas as espécies de plantas possuem metabolismo primário, sendo este encarregado da síntese de celulose, lipídeos, açúcares, proteínas e diversas outras substâncias primordiais as necessidades básicas para a sobrevivência das plantas. Assim como o primário, o metabolismo secundário também se encontra presente nas plantas, no entanto, sua função é de proteção a estresses bióticos e abióticos. Fatores como as condições climáticas, composição do solo, órgão da planta, idade, sazonalidade, ciclo circadiano, patógenos e estresses ambientais podem afetar diretamente a composição dos MeS, afetando de forma qualitativa e quantitativa a produção do mesmo (ALVES *et al.*, 2013; BOTREL *et al.*, 2010; DE SOUZA *et al.*, 2018), o que pode vir a causar interferências nas atividades biológicas de interesse (BAKKALI *et al.*, 2008). Na literatura alguns compostos secundários estão descritos e estudados, como os taninos, glicosídeos, alcaloides e terpenos (REYES-SILVA *et al.*, 2020; VERDECIA *et al.*, 2021).

4.2.1 *Óleos essenciais em espécies de Psidium guajava*

A prospecção fitoquímica é um estudo preliminar onde detectam a presença dos principais compostos dos MeS de uma planta e podem ser realizados por diferentes métodos, como as reações químicas ou então por métodos cromatográficos. Após identificação preliminar, comumente se faz a caracterização química dos compostos obtidos, a fim de detalhar os principais ativos presentes e em que proporções eles aparecem. Para espécies de *Psidium*, literaturas recentes

apontam como principais compostos dos OEs os monoterpenos e sesquiterpenos acíclicos (C₁₀ e C₁₅), *p*-mentano, pinano, bisabolano, germacreno, cariofileno, cadinano e aromadendreno (DA SILVA *et al.*, 2003; SOLÓRZANO *et al.*, 2011; KHADHRI *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2021). Contudo, em decorrência da variabilidade genética da espécie, a composição química e o rendimento de extração do OEs podem apresentar expressiva variabilidade quimiotípica (KIM *et al.*, 2006; LIMA *et al.*, 2009; JOSEPH *et al.*, 2010; SOLÓRZANO *et al.*, 2011; KHADHRI *et al.*, 2014; DE SOUZA *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2021). De Souza *et al.* (2018) avaliou 22 genótipos diferentes de *P. guajava*, coletados em dois ambientes distintos, dentre eles os genótipos Cortibel (C6, C7 e C11) assim como a Paluma obtiveram os maiores rendimentos de extração do OEs (aproximadamente 0,5%), corroborando com dados publicados por Khadhri *et al.* (2014) e por Wang *et al.* (2017). No entanto, outros genótipos de Cortibel (C10 e C13) proporcionaram valores inferiores de rendimento de OEs do que os demais genótipos testados (DE SOUZA *et al.*, 2018), o que demonstra a variabilidade de rendimento dentro de uma mesma espécie de *Psidium*.

Técnicas de prospecção fitoquímica também foram utilizadas para caracterizar os principais grupos dos MeS em espécies de *P. guajava*. Flavonoides e taninos foram detectados em extratos etanólicos oriundos de folhas de *P. guajava* (BACELAR, 2020). Diversas atividades biológicas são testadas utilizando os compostos químicos do grupo tanino. Estes estão associados a remédios anti-diarréico e anti-séptico em decorrência de sua atividade adstringente. Outra característica marcante dos taninos é sua alta capacidade de associação às proteínas, e, portanto, são comumente utilizados para impermeabilizar tecidos expostos como pele e mucosas (HASLAM, 1996; COSTA *et al.*, 2008). Outros estudos comprovam a ação antibactericida dos taninos em bactérias Gram + e Gram – (KABUKI *et al.*, 2000).

Dentre as diversas aplicações dos flavonoides, destacam-se as ações sobre o sistema biológico, como, antiviral, anti-inflamatório, antioxidante, entre outros. Sabe-se que as atividades antioxidantes decorrem das propriedades de oxido-redução, onde desempenham ação de absorção e neutralização de radicais livres (DEGÁSPARI *et al.*, 2004), o que os tornam importantes em estudos voltados ao

combate de moléculas oxidantes envolvidas em danos na estrutura do DNA e promoção de tumores (LE MARCHAND, 2002). Quercetina e apigenina são constituintes químicos presente no grupo dos flavonóides, e, possuem ação anti-inflamatória (MOTOH *et al.*, 2000; RASO *et al.*, 2001). Segundo Friesenecker *et al.* (1995), determinados compostos do flavonóides, como a quercetina e a luteolina, reduzem a ativação do sistema complemento, diminuindo a adesão de células inflamatórias ao endotélio, reduzindo a resposta inflamatória.

4.2.2 Calogênese *in vitro* como ferramenta para produção de biomassa vegetal e biossíntese de MeS

A calogênese *in vitro* é considerada como uma etapa inicial da regeneração de plantas. O tecido caloso é uma massa de células parenquimáticas indiferenciadas formado a partir da interação entre explantes vegetal, meio nutritivo contendo micro e macronutrientes e RCVs capazes de promover a divisão e crescimento celular em condições controladas *in vitro* (SOBRINHO *et al.*, 2021). Além disso, a partir dos calos, e estímulos específicos, as células indiferenciadas poderá originar brotos, via organogênica, ou então formar embriões somáticos, via embriogênica, elevando o nível de propagação da espécie (NODARI, 2016). O desenvolvimento do tecido caloso pode ser obtido de diferentes órgãos vegetais, como, folhas e hipocótilos, todavia, explantes foliares vem se destacando pela utilização mais frequente, como em espécies de *Psidium guajava* (goiabeira) (SING *et al.*, 2005; BUTT *et al.*, 2013), *Litchi chinensis* (lichia) (MA *et al.*, 2009) e *Eugenia involucrata* (eucalipto) (GOLLE *et al.*, 2020). Além das vantagens mencionadas, a biomassa de tecido caloso pode ser utilizada para produção e biossíntese de substâncias bioativas, como os MeS, com maiores rendimentos, e, elevado padrão de qualidade (WITHERUP *et al.*, 1990; MASSOT *et al.*, 2000; BOURGAUD *et al.*, 2001; RAZAVI *et al.*, 2016).

Sabe-se que a produção dos MeS em uma planta está ligada com o papel de defesa, sendo assim, estímulos físicos ou químicos podem ser empregados na cultura *in vitro* para maximizar a sua produção. São exemplos de estímulos a introdução de micélios de fungos, extratos de proteínas, mudança abrupta na temperatura, luz e pH do meio de cultivo, assim como os RCVs, por exemplo, ácido jasmônico, o que trará desconforto e estresse para a cultura *in vitro* podendo

desencadear uma maior síntese dos MeS (SILVESTRINI *et al.*, 2002; FUMAGALI *et al.*, 2008). No entanto suplementações inadequadas dos RCVs introduzida *in vitro* pode prejudicar o rendimento e padrão de qualidade dos OEs, e, até mesmo, levar a cultura do vegetal a morte.

Os estudos com o potencial de produção de MeS *in vitro* com a espécie de *P. guajava* são escassos, e, até o momento, não há relatos na literatura do potencial de produção de MeS em biomassa de calos. Capote *et al.*, (2009) relatou pela primeira vez o perfil metabólico de brotos de *P. guajava* cultivados *in vitro*, onde, apesar do rendimento ter sido baixo, 23 compostos foram detectados a mais quando comparado a plantas *ex vitro*. Salla *et al.*, (2014) obteve maiores rendimentos de compostos fenólicos em raízes, aproximadamente 6,5 mg g⁻¹, e parte aérea com aproximadamente 10 mg g⁻¹, de plantas cultivadas *in vitro* de Eucalipto (família myrtaceae) submetidas por 15 dias a estresse com o uso da bactéria *Streptomyces rhizobacteria*, quando comparado ao rendimento de plantas controle onde o obteve-se rendimento de aproximadamente 5 mg g⁻¹ em cortes de raízes, e, na parte aérea 7 mg g⁻¹ de fenóis. Estudo com outras espécies de plantas podem ser encontrados na literatura. Em seu estudo, Yang *et al.*, (2009) manteve em suspensão por 21 dias 5g de calo fresco da espécie *Glycyrrhia inflata* (família Fabaceae) em 80mL de meio MS suplementado com 0,5 mg L⁻¹ de 2,4-D, 0,5 mg L⁻¹ de ANA e 0,5 mg L⁻¹ de BAP, ao final, obteve 16,4 g/L de biomassa vegetal e 95,7mg/L do composto flavonoide. Segundo Mathew *et al.*, (2014), o rendimento de alcaloides foi maior na cultura de calos (0,23 mg/peso de massa seca) quando comparado ao rendimento de folhas (0,193 mg/peso de massa seca) e células em suspensão (0,18 mg/peso de massa seca) em espécie de *Ocimum sanctum* (manjeriço santo), e, o rendimento dos terpeoides foi maior na cultura de células em suspensão (0,337 mg/peso de massa seca) e calos (0,303 mg/peso de massa seca) quando comparado ao rendimento da folhas (0,227 mg/peso de massa seca).

Determinados os problemas e vantagens da utilização das técnicas de CTV *in vitro*, como a calogênese, estas tornam-se promissoras para maximizar a produção de biomassa vegetal e síntese de MeS *in vitro*, e, sobretudo, minimizar a prática predatória de recursos naturais. Todavia, existe a necessidade de mais estudos afim de elucidar problemas relacionados ao baixo rendimento de biomassa,

alterações morfogênicas que afetam a síntese dos MeS, declínio de vigor, entre outros.

5. REFERÊNCIAS

AGUIAR, Ana Luiza Ribeiro et al. Atividade antimicrobiana do extrato de *Psidium guajava* L.(goiabeira) e sinergismo com antimicrobianos convencionais. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 24, n. 1, 2018.

ALBINO, B. É. S. et al. Propagação in vitro de jequitibá-branco (*Cariniana estrellensis*): uma alternativa para programas de reflorestamento. **Revista Brasileira de Engenharia de Biosistemas**, v. 13, n. 2, p. 88-99, 2019.

ALI, M.; MUJIB, A.; GULZAR, B; ZAFAR, N. Essential oil yield estimation by Gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) after Methyl jasmonate (MeJA) elicitation in in vitro cultivated tissues of *Coriandrum sativum* L. **3 Biotech**, v. 9, n. 414, 2019.

ALTOÉ, Jalille Amim; MARINHO, Cláudia Sales. Miniestaquia seriada na propagação da goiabeira'Paluma'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, p. 576-580, 2012.

ALVES, CHARLINE ZARATIN; SILVA, JOSUÉ BISPO DA; CÂNDIDO, ANA CARINA DA SILVA. Metodologia para a condução do teste de germinação em sementes de goiaba. **Revista Ciência Agronômica**, v. 46, p. 615-621, 2015.

ALVES, J. E.; FREITAS, B. M. Requerimentos de polinização da goiabeira. **Ciência Rural**, v. 37, n. 5, p. 1281-1286, 2007.

ALVES, S.F.; BORGES, L.L.; PAULA, J.A.M.; VIEIRA, R.F.; FERRI, P.H.; COUTO, R.O.; PAULA, J.R.; BARA, M.T.F. Chemical variability of the essential oils from fruits of *Pterodon emarginatus* in the Brazilian Cerrado. **Brazilian Journal. Pharmacognosy.**, v. 23, n. 2, p. 225, 2013.

ALVES, T. A. et al. Fitotoxicidade e mecanismo de ação citogenético de extratos foliares de *Psidium cattleianum* Sabine em bioensaios vegetais. **Brazilian Journal of Biology**, v. 84, 2022.

ANDRADE, A. C. S. *et al*/Germinação de sementes de jenipapo: temperatura, substrato e morfologia do desenvolvimento pós-seminal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 15, n. 3, p. 609-615, 2000.

ARRUDA, Ana Luiza et al. Estabelecimento in vitro de sementes de *Psidium cattleianum* Sabine. **Acta Biológica Catarinense**, v. 6, n. 4, p. 105-113, 2019.

AKHTAR, Nasim. Somatic Embryogenesis in Guava (*Psidium guajava* L.). In: Step Wise Protocols for Somatic Embryogenesis of Important Woody Plants. **Springer**, Cham, 2018. p. 1-24.

BACELAR, Thais Siqueira. Identificação de flavonoides e taninos em plantas medicinais pertencente a lista estadual de plantas medicinais comercializadas em um mercado público em Fortaleza-CE. 2020. **Tese de Doutorado em Farmácia**. Centro Universitário Fametro (UNIFAMETRO), Manaus 2020.

BANDERA FERNÁNDEZ, Evelyn; PÉREZ PELEA, Leneidy. Mejoramiento genético de guayabo (*Psidium guajava* L.). **Cultivos Tropicales**, v. 36, p. 96-110, 2015.

BAJPAI, Anju et al. Recurrent somatic embryogenesis and plantlet regeneration in *Psidium guajava* L. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 59, 2016.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; WAOMAR, M. Biological effects of essential oils - A review. **Food Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.

BEAS, R.C.; BATISTA-GALVEZ, A. Induction and callus characterization from leaf, hypocotyls and embryos of *Psidium guajava* L. **Acta Hortic.**, v. 849, p. 231-234, 2010

BEZERRA, J. E. F.; LEDERMAN, I. E.; SILVA-JUNIOR, J. F.; DA FRANZON, R. C.; SOUSA-SILVA, J. C.; CAMPOS, L. Z. O.; PROENÇA, C. E. B. *Psidium* spp.: Araçá. In: VIEIRA, R. F.; CAMILLO, J.; CORADIN, L. (Eds.). Espécies Nativas da Flora Brasileira de Valor Econômico Atual ou Potencial: Plantas Para o Futuro-Região Centro-Oeste. **Ministério do Meio Ambiente, Secretaria de Biodiversidade**: Bloco DF, Brazil, 2016.

BORTHAKUR, M.; HAZARIKA, J.; SINGH, R. S. A protocol for micropropagation of *Alpinia galanga*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 55, n. 3, p. 231-233, 1998.

BRAGA, D. C. A. Efeitos do tratamento com suspensão de extrato de folhas de *Psidium guajava* L. (goiabeira) sob a pressão arterial e balanço hidroeletrólítico de ratos Wistar sob dieta com sobrecarga de sódio. 2019. 97 f. **Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas**. Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2019. Disponível em: <https://repositorio.ufop.br/bitstream/123456789/12459/1/DISSERTA%c3%87%c3%83O_EfeitosTratamentoSuspens%c3%a3o.pdf>. Acesso em: 26 set. 2022.

BRAGA, Joelma Correia Beraldo; DA SILVA, Luan Ramos. Consumo de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil: perfil de consumidores e sua relação com a pandemia de COVID-19. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 4, n. 1, 2021.

BRAGA, M. F. B. M. Composição química e avaliação da atividade antifúngica de extratos de *Psidium guajava* L. (Goiabeira) e *Psidium brownianum* mart. ex dc. (Araçá de veado) sobre espécies de *Candida*. 2016. **Tese de Doutorado em Etnobiologia e Conservação da Natureza**. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Crato, 2016. Disponível em: <http://www.pgetno.ufrpe.br/sites/ww2.pgetno.ufrpe.br/files/documentos/tese_moraisbraga_0.pdf>. Acesso em: 26 set. 2022.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Farmacopeia brasileira**. 6. ed. Brasília: ANVISA, 2019. v. 2. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33832/259143/Plantas+medicinais+Pronto.pdf/1b7220eb-a371-4ad4-932c-365732a9c1b8>>. Acesso em: 26 set. 2022.

BOTREL, P.P.; PINTO, J.E.B.P.; ARAÚJO, A.C.C.; BERTOLUCCI, S.K.V.; FIGUEIREDO, F.C.; FERRI, P.H., COSTA, D.P. Variações no teor e na composição de *Hyptis marrubioides* EPL. Cultivado no campo e em casa de vegetação. **Química Nova**, v. 33, p. 33-37, 2010.

BOURGAUD, F.; GRAVOT, A.; MILESI, S.; GONTIER, E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Sci.**, v. 161, p. 839–851, 2001.

BRANCALION, Pedro Henrique Santin; NOVENBRE, Ana Dionísia Da Luz Coelho; RODRIGUES, Ricardo Ribeiro. Temperatura ótima de germinação de sementes de

espécies arbóreas brasileiras. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, p. 15-21, 2010.

BUTT, MADIHA; USMAN, MUHAMMAD; FATIMA, BILQUEES. Enhanced Seed Germination and Callogenesis under long days using Leaf Disc as Explant in Guava cultivars. **Biologia (Pakistan)**, v. 59, n. 2, p. 293-298, 2013.

CAPOTE, A.; PÉREZ-ALONSO, N.; PÉREZ, A.; BARBÓN, R.; SALAS, E.; WILKEN, D.; GERTH, A.; MÜLLER-KUHRT, L.; JIMÉNEZ, E. Perfil metabólico de extractos obtenidos de cultivos *in vitro* y plantas de campo de *Morinda royoc* L., *Psidium guajava* L. y *Morus alba* L. **Biotecnología Vegetal**, v. 8, n. 1, p. 119-121, 2008.

CHAPLA, Tatiani Elisa; CAMPOS, João Batista. Allelopathic evidence in exotic guava (*Psidium guajava* L.). **Brazilian archives of Biology and Technology**, v. 53, p. 1359-1362, 2010.

CORREA, M. G. Efeito de extratos de cultivares de goiaba em linhagens celulares humanas de câncer de mama. **Dissertação de Mestrado em Alimentos e Nutrição**. Universidade Federal do Estado Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2016. Disponível em: <http://www.unirio.br/ccbs/nutricao/ppgan_en/dissertation-and-thesis/efeito-dosextratos-de-cultivares-de-goiaba-em-linhagens-celulares-humanas-de-cancer-demama>. Acesso em: 26 set. 2022.

COSER, Sara Morra et al. Diversidade genética de seleções de goiabeiras cortibel. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, p. 391-399, 2014.

COSTA, C. T. C. et al. Taninos e sua utilização em pequenos ruminantes. 2008. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/534095/1/APITaninosesuutilizacaoempequenosruminantes.pdf>>. Acesso em: 30 set. 2022.

COSTA, Edilson et al. Produção de mudas de goiabeira por estaquia em diferentes recipientes e substratos. **Agrarian**, v. 3, n. 8, p. 104-110, 2010.

COSTA, J. C.; MARINHO, M. G. V. Etnobotânica de plantas medicinais em duas comunidades do município de Picuí, Paraíba, Brasil. **Rev. Bras. Plantas Med.**, v. 18, p. 125-134, 2016.

DANNER, Moeses Andrigo et al. Fenologia da floração e frutificação de mirtáceas nativas da floresta com araucária. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, pág. 291-295, 2010.

DEGÁSPARI, Cláudia Helena; WASZCZYNSKYJ, Nina. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão acadêmica**, v. 5, n. 1, 2004.

DE MENEZES, Thatiane Padilha et al. Sacarose e GA3 na germinação de sementes e no desenvolvimento in vitro de plântulas de goiabeira 'Pedro Sato'. **Plant Cell Culture & Micropropagation-ISSN 1808-9909**, v. 6, n. 2, p. 70-76, 2010.

DA SILVA, J. D.; LUZ, A. I. R.; SILVA, M. H. L.; ANDRADE, E. H. A.; ZOGHBI, M. G. B.; MAIA, J. G. S. Essential oils of leaves and stems of four *Psidium* spp. **Flavour Fragr. J.**, v. 18, 2003.

DE SOUZA, Sadi Nazareno. Técnica de enxertia para a propagação da goiabeira serrana (*Acca sellowiana* (Berg) Burret). **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 12, n. 3, p. 314-316, 2014.

DE SOUZA, T. da S. FERREIRA, M. F. da S.; MENINI, L.; SOUZA, J. R. C. de L.; BERNARDES, C. de O.; FERREIRA, A. Chemotype diversity of *Psidium guajava* L. **Phytochemistry**, v. 153, p. 129–137, 2018.

DUDAREVA, N.; KLEMPIEN, A.; MUHLEMANN, J. K.; KAPLAN, I. Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. **New Phytologist**, v. 198, p. 16-32, 2013.

ELNAGEEB, Ahmed Mohmmed Elhassan Osman. Effects of Media Strength, some Growth Regulators and Sucrose Concentration on Micropropagation of Guava (*Psidium guajava* L.). 2016. **Dissertação de mestrado** - Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agricultural Sciences, July,2016. Disponível em:< <http://repo.uofg.edu.sd/handle/123456789/1163>>. Acesso em: 27 de set. 2022.

FERNANDES, A. C. Perda da tolerância à dessecação em sementes de espécies florestais. 2020. 103 p. **Tese de Doutorado em Engenharia Florestal** – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2020. Disponível em; <http://177.105.2.185/bitstream/1/45805/1/TESE_Perda%20da%20toler%c3%a2n

cia%20%c3%a0%20desseca%c3%a7%c3%a3o%20em%20sementes%20de%20esp%c3%a9cies%20florestais.pdf>. Acesso em: 11 de janeiro 2022.

FRANCO, Claudenir Facincani et al. Marcha de absorção dos micronutrientes para mudas de goiabeiras cultivares Paluma e Século XXI. **Bragantia**, v. 67, p. 83-90, 2008.

FRIESENECKER, B. et al. Cellular basis of inflammation, edema and the activity of Daflon 500 mg. **International Journal of Microcirculation**, v. 15, n. Suppl. 1, p. 17-21, 1995.

FUMAGALI, Elisângela et al. Production of plant secondary metabolites in plant cell and tissue culture: The example of *Tabernaemontana* and *Aspidosperma* genera. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 627-641, 2008.

GEORGE, Edwin F.; HALL, Michael A.; KLERK, Geert-Jan De. The components of plant tissue culture media II: organic additions, osmotic and pH effects, and support systems. In: **Plant propagation by tissue culture**. Springer, Dordrecht, 2008. p. 115-173.

GOLLE, Diego Pascoal et al. Fitorreguladores e luminosidade na indução à calogênese em explantes foliares de *Eugenia involucrata* DC. **Ciência Florestal**, v. 30, p. 898-906, 2020.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Eds.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas** Brasília: ABCTP/Embrapa-CNPH, 1990. p.99-169.

GRESSLER, Eliana; PIZO, Marco A.; MORELLATO, L. Patrícia C. Polinização e dispersão de sementes em Myrtaceae do Brasil. **Brazilian Journal of Botany**, v. 29, p. 509-530, 2006.

GUTIÉRREZ, R. M.; MITCHELL, S.; SOLIS, R. V. J. *Psidium guajava*: a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. **Journal Ethnopharmacology**, v. 117, p. 1–27, 2008.

HAMINIUK, C. W. I., SIERAKOWSKI, M. R., VIDAL, J. R. M. B., & MASSON, M. L. Influence of temperature on the rheological behavior of whole araca pulp (*Psidium*

cattleianum Sabine). **LWT – Food Science and Technology**, v. 39, n 4, 426–430, 2006.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. **Journal of Natural Products**, v.59, n.2, p.205-15, 1996.

IKEUCHI, Momoko; SUGIMOTO, Keiko; IWASE, Akira. Plant callus: mechanisms of induction and repression. **The plant cell**, v. 25, n. 9, p. 3159-3173, 2013.

JIANG, Lirong et al. Antitumor effect of guava leaves on lung cancer: A network pharmacology study. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 13, n. 11, p. 7773-7797, 2020.

JOSEPH, B.; PRIYA, M.R.; HELEN, M.P.A.; SUJATHA, S. Bio-active compounds in essential oil and its effects of antimicrobial, cytotoxic activity from the *Psidium guajava* L. leaf. **J. Adv. Biotech.**, v. 9, n. 10, p. 10–14, 2010.

KABUKI, T. et al. Characterization of novel antimicrobial compounds from mango (*Mangifera indica* L.) kernel seeds. **Food Chemistry**, v.71, n.1, p.61-6, 2000.

KAMLE, M.; BAEK, K. H. Embriogênese somática em goiaba (*Psidium guajava* L.): situação atual e perspectivas futuras. **3 Biotech**, v. 7, n. 203, 2017.

KAMLE, M.; KUMAR, P.; BAJPAI, A.; KALIM, S.; CHANDRA, R. Assessment of genetic fidelity of somatic embryogenesis regenerated guava (*Psidium guajava* L.) plants using DNA-based markers. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, v. 42, n. 1, p. 1-9, 2014.

KHADHRI, A.; MOKNI, R. E.; ALMEIDA, C.; NOGUEIRA, J. M. F.; ARAÚJO, M. E. M. Chemical composition of essential oil of *Psidium guajava* L. growing in Tunisia. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 29-31, 2014

KIM, Hyun-Jin et al. Effect of methyl jasmonate on secondary metabolites of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 6, p. 2327-2332, 2006.

LANGENHEIM, J. H. Higher plant terpenoids: a phytocentric overview of their ecological roles. **Journal of Chemical Ecology**, v. 20, p. 1223-1280, 1994.

LATTUADA, Daiane Silva; SOUZA, Paulo Vitor Dutra de; GONZATTO, Mateus Pereira. Enxertia herbácea em Myrtaceae nativas do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, p. 1285-1288, 2010.

LE MARCHAND, Loïc. Cancer preventive effects of flavonoids—a review. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 56, n. 6, p. 296-301, 2002.

LIMA, R.K.; CARDOSO, M.G.; SANTOS, C.D.; MORAES, J.C.; NÉRI, D.K.P.; NASCIMENTO, E.A. Essential oil chemical composition from leaves of guava (*Psidium guajava* L.) and its effects on the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797). (Lepidoptera: noctuidae) behavior. **Cienc. E Agrotecnol.**, v. 33, p. 1777–1781, 2009.

MA, Xin-Ye et al. Leaf callus induction and suspension culture establishment in lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) cv. Huaizhi. **Acta physiologiae plantarum**, v. 31, p. 401-405, 2009.

MONFORT, Lucila Elizabeth Fragoso et al. Micropropagação e germinação de sementes in vitro de atroveran. **Revista Ceres**, v. 62, p. 215-223, 2015.

MASCARENHAS, ANTHONY F.; KENDURKAR, SHUCHISHWETA V. 15. Micropropagation of teak. **Micropropagation of Woody Plants**, v. 41, p. 247, 1992.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de plantas cultivadas**. Piracicaba, v. 12, 2005, 495p.

MARTINS, J. R. et al. Seedling survival of *Handroanthus impetiginosus* (Mart ex DC) Mattos in a semi-arid environment through modified germination speed and post-germination desiccation tolerance. **Brazilian Journal of Biology**, v. 75, p. 812-820, 2015.

MASSOT, B.; MILESI, S.; GONTIER, E.; BOURGAUD, F.; GUCKERT, A. Optimized culture conditions for the production of furanocoumarins by micropropagated shoots of *Ruta graveolens*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 62, p. 11-19, 2000.

MATHEW, Rebecca; SANKAR, P. DEEPA. Comparison of major secondary metabolites quantified in elicited cell cultures, non-elicited cell cultures, callus cultures and field grown plants of *Ocimum*. **Int. J. Pharm. Pharm. Sci**, v. 6, n. 2, p. 102-106, 2014.

MEDINA, Aline Lisboa et al. Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit extracts with antioxidant and antimicrobial activities and antiproliferative effect on human cancer cells. **Food Chemistry**, v. 128, n. 4, p. 916-922, 2011.

MENEZES, Paula Ebling et al. Composição centesimal, compostos bioativos, atividade antioxidante e caracterização fenólica da polpa de goiaba. **Disciplinarum Scientia| Saúde**, v. 17, n. 2, p. 205-217, 2016.

MORAIS-BRAGA, Maria Flaviana B. et al. *Psidium guajava* L., from ethnobiology to scientific evaluation: Elucidating bioactivity against pathogenic microorganisms. **Journal of ethnopharmacology**, v. 194, p. 1140-1152, 2016.

MORAES, L. L. C.; FREITAS, J. L.; MATOS FILHO, J. R.; SILVA, R. B. L.; BORGES, C. H. A.; SANTOS, A. C. Ethno-knowledge of medicinal plants in a community in the eastern Amazon. **Rev. Ciências Agrárias**, v. 42, p. 565-573, 2019.

MOURA, E. F.; MOTOIKE, S. Y. Indução da embriogênese somática em sementes imaturas de goiabeira cv. Paluma. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 31, n. 2, p. 507-511, 2009.

MOTOH, Michihiro et al. Suppression by Flavonoids of Cyclooxygenase-2 Promoter-dependent Transcriptional Activity in Colon Cancer Cells: Structure-Activity Relationship. **Japanese journal of cancer research: gann**, v. 91, n. 7, p. 686-691, 2000.

MURASHIGE, Toshio; SKOOG, Folke. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NARAYANI, M.; SRIVASTAVA, Smita. Elicitation: a stimulation of stress in in vitro plant cell/tissue cultures for enhancement of secondary metabolite production. **Phytochemistry Reviews**, v. 16, n. 6, p. 1227-1252, 2017.

NGBOLUA, K.; LUFULUABO, G. L.; MOKE, L. E.; BONGO, G. N.; LIYONGO, C. I.; ASHANDE, C. M.; SAPO, B. S.; ZOAWA, B. G.; MPIANA, P. T. A review on the Phytochemistry and pharmacology of *Psidium guajava* L. (Myrtaceae) and Future direction. **Discovery Phytomedicine**, v. 5, n. 2, p. 7-13, 2018.

NIMISHA, S. et al. Molecular breeding to improve guava (*Psidium guajava* L.): current status and future prospective. **Scientia Horticulturae**, v. 164, p. 578-588, 2013.

NODARI, Rubens Onofre. Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra. **Tese de Doutorado. Departamento de Fitotecnia, Centro de Ciências Agrárias.** Universidade Federal de Santa Catarina. 2016. Disponível em: <https://lfdgv.paginas.ufsc.br/files/2014/08/Apostila-Biotec-2016.1-Final.pdf>. Acessado em: 28 set. 2022.

OLIVEIRA, L. M., A. C. DAVIDE & M. L. M. DE CARVALHO. Avaliação de métodos para quebra da dormência e para a desinfestação de sementes de canafístula (*Peltophorum dubium* (sprengel) Taubert). **Revista Árvore**. 2003; 27(5): 597-603.

OLIVEIRA, E. F. de. Morfoanatomia e micromorfologia comparada das folhas de espécies de *Psidium* L. (MYRTACEAE) do cerrado goiano. 2015. 123 p. **Dissertação de Mestrado em Recursos Naturais do Cerrado** - Universidade Estadual de Goiás. Anápolis, GO. Disponível em: <https://www.bdtd.ueg.br/bitstream/tede/296/2/Elaine_.pdf>. Acesso em: 19 de set. 2022.

PENIDO, A. B.; DE MORAIS, S. M.; RIBEIRO, A. B.; SILVA, A. Z. Ethnobotanical study of medicinal plants in Imperatriz, State of Maranhão, Northeastern Brazil. **Acta Amaz.**, v. 46, p. 345-354, 2016.

PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, p. 237-243, 2002.

POSSA, J. Compostos bioativos e capacidade antioxidante de araçás (*Psidium Cattleianum* Sabine) morfotipo amarelo e vermelho cultivados no Rio Grande do Sul. 2016. 45 p. **Trabalho Conclusão de Curso (Graduação)** - Universidade Federal do Rio Grande do Sul / Faculdade de Medicina. Porto Alegre, RS.

PRADHAN, Bharat K.; BADOLA, Hemant K. Ethnomedicinal plant use by Lepcha tribe of Dzongu valley, bordering Khangchendzonga Biosphere Reserve, in north

Sikkim, India. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 4, n. 1, p. 1-18, 2008.

PROENÇA, C.E.B. et al. Myrtaceae in Flora do Brasil 2020. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro, 2020. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB171>>. Acesso em: 19 set. 2022.

RAMIREZ, V.; ALAZAR, Y.E.G. In vitro culture of guava (*Psidium guajava* L.) from immature embryos. **Revista de la Facultad de Agronomía Universidad del Zulia**, v. 15, n. 3, p. 211-221, 1998.

RASO, Giuseppina Mattace et al. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A. 1. **Life sciences**, v. 68, n. 8, p. 921-931, 2001.

RAZAVI, Seyed Mehdi; ARSHNESHIN, Homa; GHASEMIAN, Alireza. In vitro callus induction and isolation of volatile compounds in callus culture of *Lallemantia iberica* (M. Bieb.) Fisch. & CA Mey. **Journal of Plant Process and Function**, v. 5, n. 18, p. 65-68, 2016.

RENISUS, 2009. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/junho/06/renisus.pdf>>. Acesso em: 25 setembro, 2022.

RESCAROLLI, C. L. S.; ZAFFARI, G. R. Produção de mudas de *Etilingera elatior* (Jack) RM Sm. através da cultura de tecidos vegetais in vitro. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, p. 190-195, 2009.

REYES-SILVA, Jesús A.; SALAZAR-CAMPOS, Arturo; RÍOS-CORTES, Héctor H. Metabolitos secundarios de las plantas (angiospermas) y algunos usos interesantes. **UNO Sapiens Boletín Científico de la Escuela Preparatoria No. 1**, v. 2, n. 4, p. 16-18, 2020.

REZAZADEH, R.; NIEDZ, R. P. Protoplast isolation and plant regeneration of guava (*Psidium guajava* L.) using experiments in mixture-amount design. **Plant Cell Tissue Organ Cult**, v. 122, p. 585–604, 2015.

RIBEIRO, Brenno Barbosa. Aspectos comerciais da cultura da goiaba no Brasil. 2021. **Trabalho de conclusão de curso em Agronomia**. Faculdade de Agronomia

e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília. Brasília, 2021. Disponível em: <https://bdm.unb.br/handle/10483/30668>. Acesso em: 22 de set. 2022.

RIBEIRO, J. M. et al. Micropropagação e aclimatização de goiabeira Paluma. **Embrapa Semiárido-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)**, 2010.

SALLA, Tamiris Daros et al. Streptomyces rhizobacteria modulate the secondary metabolism of Eucalyptus plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 85, p. 14-20, 2014.

SAVOLDI, T. L.; GLAMOČLIJA, J.; SOKOVIĆ, M.; GONÇALVES, J. E.; RUIZ, S. P.; LINDE, G. A.; GAZIM, Z. C.; COLAUTO, N. B. Antimicrobial activity of essential oil from *Psidium cattleianum* Afzel. ex Sabine leaves. **Blacpma**, v, 19, n. 6, p. 614-627, 2020.

SEBBENN, A. M. Método para a seleção de árvores superiores para forma do fuste e produção de resina em plantios de Pinus sp. **IF Série Registros**, v. 28, p. 1-11, 2005.

SHRUTHI, S. D.; ROSHAN, A.; TIMILSINA, S. S.; SUNITA, S. A review on the medicinal plant *Psidium guajava* Linn. (Myrtaceae). **J. Drug Deliv. Ther.**, v. 3, p. 162-168, 2011.

SILVA, E. A. J. et al. Antibacterial and antiproliferative activities of the fresh leaf essential oil of *Psidium guajava* L. (Myrtaceae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 79, p. 697-702, 2018.

SILVA, R. C. E.; COSTA, J. S. D.; FIGUEIREDO, R. O. D.; SETZER, W. N.; SILVA, J. K. R. D; MAIA, J. G. S.; FIGUEIREDO, P. L. B. Monoterpenes and Sesquiterpenes of Essential Oils from *Psidium* Species and Their Biological Properties. **Molecules**, v. 26, n. 965, 2021.

SILVESTRINI, Andrea et al. Effects of alkaloid precursor feeding on a *Camptotheca acuminata* cell line. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, n. 9, p. 749-753, 2002.

SINGH, G.; TIWARI, J. P.; LAL, S. In vitro callus induction in guava (*Psidium guajava* L.). In: **I International Guava Symposium 735**. 2005. p. 139-143

SINGH, G.; TIWARI, J. P.; LAL, S. In vitro callus induction in guava (*Psidium guajava* L.). **Acta Hortic.**, v. 735, p. 139-143, 2007.

SINGH, Gurpreet; SAHARE, Homraj; DEEP, Maninder. Recent Trends in Guava Propagation—A Review. **Biosciences Biotechnology Research Asia**, v. 16, n. 1, p. 143-154, 2019.

SOARES, Fernanda Pereira et al. Organogênese direta em explantes caulinares de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, p. 1048-1053, 2007.

SOARES, FERNANDA PEREIRA et al. Taxa de multiplicação e efeito residual de diferentes fontes de citocinina no cultivo in vitro de *Hancornia speciosa* Gomes. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, p. 152-157, 2011.

SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; SOUZA, M.; MAZINE, F.; LUCAS, E. **Myrtaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2012. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB000171>>. Acessado em 19/04/ 2021.

SOBRINHO, Alessandra Carla Guimarães; SANTOS, Alberdan Silva. Estabelecimento de cultura in vitro de *Hibiscus sabdariffa* L.: obtenção de plântulas e indução de calos em diferentes condições de cultura visando o acúmulo de biomassa. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 15, p. e358101523114-e358101523114, 2021.

SOLÓRZANO-SANTOS, F.; MIRANDA-NOVALES, M. G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, p. 1-6, 2011.

SOUZA, T. S. FERREIRA, M. S. F.; MENINI, L.; SOUZA, J. L. C. L.; PARREIRA, L. A.; CECON, P. B.; FERREIRA, A. Essential oil of *Psidium guajava*: Influence of genotypes and environment. **Scientia Horticulturae**, v. 216, p. 38-44, 2017.

SCUR, M. C. et al. Atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial e diferentes extratos vegetais de *Psidium cattleianum* Sabine. **Brazilian Journal of Biology**, v. 76, p. 101-108, 2016.

SUGIYAMA, Munetaka. Organogenesis in vitro. **Current opinion in plant biology**, v. 2, n. 1, p. 61-64, 1999.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Tradução de Armando Molina Divan JUNIOR et al. 5ª. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918 p.

TEIXEIRA, Alrieta Henrique et al. Conhecimento popular sobre o uso de plantas medicinais no município de Sobral-Ceará, Brasil. **SANARE-Revista de Políticas Públicas**, v. 13, n. 1, 2014.

TULER, A. C.; CARRIJO, T. T.; NÓIA, L. R.; FERREIRA, A.; PEIXOTO, A. L.; FERREIRA, M. F. S. SSR markers: a tool for species identification in *Psidium* (Myrtaceae). **Mol Biol Rep**, v. 42, p. 1501–1513, 2015.

TULER, A. C.; CARRIJO, T. T.; PEIXOTO, A. L.; GARBIN, M. L.; FERREIRA, M. F. D. S.; CARVALHO, C. R.; SPADETO, M. S.; CLARINDO, W. R. Diversification and geographical distribution of *Psidium* (Myrtaceae) species with distinct ploidy levels. **Trees**, v. 33, p. 1101-1110, 2019.

VASCONCELOS, Loren Cristina et al. Chemical composition, phytotoxicity and cytogenotoxicity of essential oil from leaves of *Psidium guajava* L. cultivars. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 9, p. e6110917710-e6110917710, 2021.

VERDECÍA, D. M. et al. Metabolitos primarios y secundario de seis especies de árboles, arbustos y leguminosas herbáceas. **Cuban Journal of Agricultural Science**, v. 55, n. 1, p. 77-93, 2021.

WANG, Lu et al. Chemical compositions, antioxidant and antimicrobial activities of essential oils of *Psidium guajava* L. Leaves from different geographic regions in China. **Chemistry & biodiversity**, v. 14, n. 9, p. e1700114, 2017.

WERNER, Elias Terra et al. Controle da calogênese do pau-brasil in vitro. **Revista Árvore**, v. 33, p. 987-996, 2009.

WITHERUP, Keith M. et al. *Taxus* spp. needles contain amounts of taxol comparable to the bark of *Taxus brevifolia*: analysis and isolation. **Journal of Natural Products**, v. 53, n. 5, p. 1249-1255, 1990.

YANG, Ying et al. Flavonoid accumulation in cell suspension cultures of *Glycyrrhiza inflata* Batal under optimizing conditions. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 64, n. 1-2, p. 68-72, 2009.

Periódico a ser submetido: Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), fevereiro de 2023.

EFEITO DO TIPO DE EXPLANTE E REGULADORES DE CRESCIMENTO VEGETAL NA INDUÇÃO DA CALOGÊNESE *in vitro* EM TRÊS CULTIVARES DE *Psidium guajava* VISANDO A PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Mayla Bessa Scotá¹ • Stefani Pereira Lopes² • Kaoany Ferreira da Silva³ • Aldino Neto Venancio⁴ • Milene Miranda Praça Fontes⁵ • Luciano Menini⁶ • Marcia Flores da Silva Ferreira⁵ • Elias Terra Werner¹

⁽¹⁾ Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e Naturais, Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal, CEP 29075-910, Vitória, ES, Brasil.

⁽²⁾ Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Exatas, Naturais e de Saúde, Departamento de Ciências Biológicas, CEP 29500-000, Alegre, ES, Brasil.

⁽³⁾ Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Programa de Pós-graduação em Agronomia, CEP 29500-000, Alegre, ES, Brasil.

⁽⁴⁾ Universidade Federal de Viçosa, Programa de Pós-graduação Multicêntrico em Química, CEP 36570-900, Viçosa, MG, Brasil.

⁽⁵⁾ Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, CEP 29500-000, Alegre, ES, Brasil.

⁽⁶⁾ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo, Programa de Pós-graduação em Agroecologia, CEP 29520-000, Alegre, ES, Brasil.

Autor correspondente: Mayla Bessa Scotá

Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e Naturais, Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal, CEP 29075-910, Vitória, ES, Brasil.

Endereço de e-mail: mayla_scotta@hotmail.com (M.B. Scotá)

Resumo

Técnicas de cultura de tecidos vegetais (CTV), como a calogênese *in vitro*, são utilizadas para propagar em larga escala espécies de interesses medicinais e agronômicos como a espécie *Psidium guajava* (goiabeira), amplamente conhecida pelo uso medicinal com a utilização de infusões de folhas e raízes, onde observa-se a presença dos metabólitos secundários (MeS), ou, fonte de herbicida natural através da utilização dos seus óleos essenciais. Através do tecido caloso é possível obter plântulas pela via organogênica ou embriogênica, além de, ser fonte de biomassa vegetal com possível produção de MeS. O objetivo do estudo foi germinar sementes e estabelecer plântulas *in vitro* de *P. guajava* cultivares Paluma e Cortibel (C1 e C6) para obter explantes de folhas, hipocótilos e raízes e induzir a calogênese *in vitro* utilizando diferentes combinações dos reguladores de crescimento vegetal (RCVs) (2,4-D, ANA, KIN e BAP), e, caracterizar anatomicamente e identificar a presença de grupos dos MeS nos calos. As variáveis avaliadas foram, IVG, porcentagem de germinação, indução e anatomia dos, e, prospecção fitoquímica em extrato aquoso e alcoólico dos calos de explantes foliares das três cultivares oriundos da combinação dos RCVs 2,0 mg L⁻¹ 2,4-D + 1,0 mg L⁻¹ ANA + 1,0 mg L⁻¹ KIN (T1) para identificação dos MeS. Taninos, flavonas, saponinas, chalconas, auronas, e catequinas foram detectados pela prospecção fitoquímica nas três cultivares. Explantes foliar mostraram-se mais suscetíveis a calogênese *in vitro* em menor tempo do que explantes de hipocótilos e raízes, e, capacidade de sintetizar MeS.

Palavras-Chave: Calos · goiaba · germinação · *in vitro* · myrtaceae

Mensagem-chave

Calos de explantes foliar cultivados sob a combinação dos RCVs 2,0 mg L⁻¹ 2,4-D + 1,0 mg L⁻¹ ANA + 1,0 mg L⁻¹ KIN são capazes de sintetizar MeS.

Introdução

Psidium guajava L. (família Myrtaceae), conhecida como goiabeira, é uma espécie amplamente cultivada em regiões tropicais e subtropicais do mundo (Silva et al., 2021). A espécie tem aproximadamente de 3 a 6 metros de altura, seus frutos variam de tamanho e

coloração da polpa em função da cultivar (Bandera et al., 2015), possui valor econômico pela comercialização dos frutos, ecológica e medicinal em virtude do potencial biológico dos MeS (Silva et al., 2021).

Entre as diferentes cultivares de goiaba existentes no Brasil, Paluma é a mais aceita e cultivada, em cerca de 70% dos pomares (Coser et al., 2014), seu fruto possui coloração vermelha. A cultivar Cortibel foi desenvolvida na cidade de Santa Tereza (ES), altamente marcada pela diversidade genética (Mendonça et al., 2007). Dentre elas, a cultivar Cortibel C1 possui o mesocarpo branco, e, C6, rosa escuro (Coser et al., 2014).

Comumente utiliza-se infusão de folhas e flores da espécie para tratar diarreia (Silva et al., 2021), raízes para tratar tosse, dor de estômago, disenteria, dor de dente, indigestão e constipação (Penido et al., 2016; Costa et al., 2016; Moraes et al., 2019), e cascas para tratar feridas de úlcera, disenteria, doenças de pele, feridas com sangramento vaginal, febre, desidratação e distúrbios respiratórios (Shruthi et al., 2011), para além, possui ação bactericida (Aguilar et al., 2018), atividades antioxidantes (Menezes et al., 2016). Além disso, plantas produtoras de MeS com elevado potencial de atividade biológica, como as espécies de *Psidium*, são alvo de pesquisas que visam o desenvolvimento de herbicidas ecológicos como alternativa para minimizar os danos causados pelos herbicidas sintéticos (Vasconcelos et al., 2021).

O uso de plantas com fins medicinais pode ser comprometido por fatores como a variabilidade genética e bioquímica dos MeS, assim como a dificuldade de multiplicação da espécie pelo uso predatório (Morais et al., 2012). Diante do exposto, pesquisas biotecnológicas utilizando as técnicas de CTV vêm sendo realizadas a fim de elucidar diferentes questões que envolvem o tema.

Dentre as técnicas de CTV a calogênese *in vitro* vem ganhando destaque. O tecido caloso é uma massa de células parenquimáticas indiferenciadas formado a partir da interação entre explantes vegetal, meio nutritivo contendo micro e macronutrientes e RCVs capazes de promover a divisão e crescimento celular em condições controladas *in vitro* (Sobrinho et al., 2021). A partir dos calos é possível obter biomassa vegetal em larga escala pela possibilidade de multiplicação de plântulas *in vitro* pela via de embriogênese somática ou organogênese, ou até mesmo, induzir a biossíntese de MeS a partir do próprio tecido caloso com maiores rendimentos (Witherup et al., 1990; Massot et al. 2000; Bourgaud et al., 2001), e, além disso, mitigar a superexploração de materiais vegetais vindos de fontes nativas ou áreas cultivadas (Isah et al., 2018). O desenvolvimento do tecido caloso pode ser obtido de

diferentes órgãos vegetais, como, folhas e hipocótilos, todavia, explantes foliares vem se destacando pela utilização mais frequente em espécies de *P. guajava* (goiabeira) (Sing et al., 2005; Butt et al., 2013). De acordo com Thorpe et al., (1984) e Werner et al., (2009), a utilização de explantes de órgãos jovens, como folhas, influencia diretamente na formação de calos e obtenção de maiores quantidades de biomassa vegetal, e portanto, são recomendados como fonte doadora de explantes. Além disso, o desenvolvimento de tecido caloso *in vitro* é fortemente influenciado pelo uso de RCVs, especialmente concentrações mais altas de auxinas como o 2,4- diclorofenoxiacético (2,4-D) e Ácido 1-naftalenoacético (ANA), e, citocininas mais baixas como a cinetina (KIN) e o 6-Benzilaminopurina (BAP), sendo estes, os mais recomendados nas literaturas para espécie *P. guajava* (Singh et al., 2005; Beas et al., 2010; Butt et al., 2013; Jain et al., 2013; Rezazadeh et al., 2015).

A maioria dos estudos na área de CTV para as espécies de *Psidium* estão relacionados a regeneração e propagação *in vitro* através de brotos (Arruda et al., 2019), embriões somáticos (Kamile et al., 2017) e protoplastos (Rezazadeh et al., 2015). Outros estudos estão relacionados a indução de calos (Singh et al., 2005; Butt et al., 2013) e produção de óleo essencial (OEs) a partir de brotos *in vitro* (Capote et al., 2008). A porcentagem de desenvolvimento de tecido caloso descrita para *P. guajava* varia entre os protocolos adotados, origem, idade e tipo de explantes utilizados. Singh et al., (2005) notou o aparecimento de calos em meio MS (Murashige and Skoog 1962) contendo ANA (1 mg L⁻¹), 2,4-D (2 mg L⁻¹) e cinetina (1 mg L⁻¹), médias de 23,56,43% (folha), 28,58 % (epicótilo) e 34,57 % (hipocótilo) a partir de explantes excisados de plantas cultivadas *in vitro* de *P. guajava*, e, 19,06 % (folha), 25,04 % (epicótilo) e 31,03 % (hipocótilo) de plantas *ex vitro*. Butt et al., (2013) utilizou explantes foliares e obteve 88,67% de calos em meio B5 suplementado com 1,5 mg L⁻¹ de 2,4-D, e 89,33% suplementado com 2,0 mg L⁻¹ de ANA. Rezazadeh et al., (2015) obteve médias de 18,33% de microcalos induzidos a partir do cultivo de protoplastos em meio contendo 0,75 mg L⁻¹ de ANA e 0,25 mg L⁻¹ de BAP.

Os estudos com o potencial de produção de MeS *in vitro* com a espécie *P. guajava* são escassos, e, até o momento, não há relatos na literatura do potencial de biossíntese dos MeS em biomassa de calos. Capote et al., (2009) relatou pela primeira vez o perfil metabólico de brotos de *P. guajava* cultivados *in vitro*, onde, apesar do rendimento ter sido menor, 23 compostos foram detectados a mais quando comparado a plantas *ex vitro*.

A hipótese deste estudo é que a maior produção de calos *in vitro* da espécie *P. guajava* cultivares Paluma e Cortibel (C1 e C6) é proveniente de explantes foliares

associados a combinação dos RCVs 2,4-D, ANA e KIN. Para isso avaliou-se as melhores condições para obtenção de plântulas doadoras de explante através da germinação *in vitro* de sementes de *P. guajava* das cultivares Paluma e Cortibel (C1 e C6), e, a interação entre diferentes concentrações de RCVs e diferentes explantes (foliares, hipocotiledonares e raízes) para a indução da calogênese *in vitro* das cultivares Paluma e Cortibel (C1 e C6) para obtenção de biomassa vegetal. Mais adiante, realizou-se a prospecção fitoquímica em extratos aquosos e alcoólicos provenientes da maceração da biomassa dos calos para identificação de grupos dos MeS.

Materiais e métodos

Germinação in vitro

Frutos maduros de *P. guajava* cultivares Paluma e Cortibel (C1 e C6) foram coletados na Zonal Rural Palmeiras, Mimoso do Sul - Espírito Santo, e, em laboratório despulpados para obtenção de sementes. As sementes foram desinfestadas em álcool 70% (1 minuto), hipoclorito de sódio 2% acrescido de 3 gotas de Tween-20 (15 minutos) e enxaguadas 5 vezes em água deionizada estéril. Após desinfestação, parte das sementes foram submetidas a quebra de dormência com água estéril aquecida (80°C) por 1 minuto (Arruda et al., 2019). As sementes, com e sem quebra de dormência, foram incubadas em placas de Petri contendo 10 mL do meio basal MS meia força (MS^{1/2}) acrescido de ágar (7,5 g L⁻¹), ácido ascórbico (0,1 g L⁻¹), associados, ou não, a adição de sacarose (0,0 g L⁻¹, 15,0 g L⁻¹, 30,0 g L⁻¹), pH 5,7 ± 0,1. As sementes foram mantidas em sala de crescimento a 25±2 °C sob fotoperíodo de 16/8 h (luz/escuro) por 30 dias. As variáveis avaliadas, ao longo destes 30 dias de incubação foram índice de velocidade de germinação (IVG) e porcentagem de germinação (%G). O experimento foi conduzido para cada cultivar num delineamento inteiramente casualizado (DIC), esquema fatorial duplo 2x3 (quebra de dormência x sacarose), 12 repetições por tratamento, sendo a repetição constituída por uma placa de Petri contendo 5 sementes. As sementes germinadas nos diferentes tratamentos foram subcultivadas de forma aleatória, a cada 30 dias, para um novo meio basal MS suplementado com ágar (7,5 g L⁻¹), ácido ascórbico (0,1 g L⁻¹) e sacarose (30,0 g L⁻¹), pH 5,7 ± 0, até completar 120 dias, onde então foram utilizadas para obtenção dos explantes de folha, hipocótilos e raízes.

Indução de calos

Para a indução de calos, plântulas *in vitro* com 120 dias (Fig. 1A) foram utilizadas como doadoras de explantes foliares (Fig. 1A-f e B), hipocotiledonar (Fig. 1A-h e C), e radicular (Fig. 1A-r D), medindo aproximadamente 5 mm, sendo incubados em placas de Petri contendo 10 mL do meio MS acrescido de ágar ($7,5 \text{ g L}^{-1}$), ácido ascórbico ($0,1 \text{ g L}^{-1}$) e sacarose ($30,0 \text{ g L}^{-1}$), pH $5,7 \pm 0,1$, e diferentes concentrações e combinações dos RCVs 2,4-D, BAP, ANA e KIN (Tabela 1). Os explantes foram mantidos por 60 dias, sendo subcultivados em 30 dias, a $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ sob escuro constante. A variável avaliada foi porcentagem (%) de indução de calos aos 30 e 60 dias de incubação. O experimento seguiu um delineamento em DIC para cada cultivar, esquema fatorial duplo 3×5 (explante x RCVs), 5 repetições por tratamento, sendo a repetição constituída por uma placa de Petri contendo 4 explantes.

Tabela 1 Combinações e concentrações dos RCVs para a indução de calogênese *in vitro* em explantes foliar, hipocotiledonar e radicular obtidos de plântulas germinadas *in vitro* com 120 dias da espécie *P. guajava* cultivar Paluma e Cortibel (C1 e C6)

Tratamentos	Combinações de diferentes RCVs em diferentes concentrações
T1	$2,0 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D + $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ANA + $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ KIN
T2	$4,0 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D + $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ANA + $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ KIN
T3	$1,0 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D + $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ANA + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ BAP
T4	$2,0 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D + $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ANA + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ BAP
T5	$4,0 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D + $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ANA + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ BAP

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Calos induzidos *in vitro* a partir de explantes foliar contendo as combinações dos RCVs $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D + $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ANA + $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ KIN (T1) (Tabela 1) da cultivar Paluma, onde apresentou 100% de indução (Tabela 6), foram utilizados para identificação da ontogenia do surgimento dos calos em MEV. As amostras de calos foram coletadas no tempo 0, 14, 28, 42 e 49 dias de incubação, armazenadas em eppendorf contendo 1 mL do fixador Karnovsky (glutaraldeído 2,5% + formaldeído 2% + Tampão PBS 0,1M) e refrigeradas (4°C) até o momento das análises. Para visualização das imagens no MEV, as amostras foram lavadas em Tampão PBS 0,1M, pós-fixadas em solução de Ferrocianeto de Potássio 1,25% + Tetróxido de Ósmio 1% + Tampão PBS 0,1M, desidratadas em gradiente crescente de etanol (30, 50, 70, 90 e 100%), secas no ponto crítico de CO_2 (Autosandri-815,

Tousimis®), fixadas nos stubs e pulverizadas com ouro (20 nm) em um metalizador (Desk V, DentonVaccum®). As imagens foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura (MEV) (modelo JSM-IT200A, Jeol®), operado com filamento de tungstênio a 20Kv.

Prospecção fitoquímica dos metabólitos secundários em extratos aquosos e alcoólicos

Para a análise de prospecção fitoquímica foram utilizados calos induzidos *in vitro* com 60 dias de incubação a partir de explantes foliar contendo as combinações dos RCVs 2,0 mg L⁻¹ 2,4-D + 1,0 mg L⁻¹ ANA + 1,0 mg L⁻¹ KIN (T1) (Tabela 1), onde apresentaram 100% de indução de calos nas três cultivares testadas, sendo Paluma e Cortibel (C1 e C6) (Tabela 6). A prospecção fitoquímica dos grupos dos MeS, alcaloides, fenóis, taninos, antocianinas, antocianidinas, flavonas, flavonóis, xantonas, chalconas, auronas, flavanonóis, leucoantocianidinas, catequinas, flavononas, esteroides, triterpenoides e saponinas, foi realizada a partir dos extratos alcoólicos e aquosos seguindo a metodologia proposta por De Menezes et al., (2019). Para tanto, 30g de massa fresca de calos, para cada cultivar testada, foi macerada e diluída em 150 mL de água deionizada estéril, e para o extrato etanólico, 10g de massa fresca de calos foi macerada e diluída em 150 mL de álcool 70% (v/v). Após macerada e diluída, os extratos foram mantidos refrigerados (2 a 8°C) por 7 dias até a realização das análises, onde, os resultados obtidos foram avaliados qualitativamente baseados em reações colorimétricas e de precipitações.

Análise estatística

Os pressupostos de linearidade, independência de erros, normalidade dos resíduos e homocedasticidade das variâncias das variáveis %Germinação, IVG e indução de calos foram verificados por meio da correlação de Pearson, teste de Durbin-Watson, teste de Shapiro-Wilk e teste de Bartlett, respectivamente. Após atendidos os pressupostos, foi aplicada a análise de variância multidirecional (ANOVA) utilizando o teste F a 5% de probabilidade. As médias das variáveis foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade em caso de significância na ANOVA. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software R versão 4.1.1 (R Development Core Team, 2021) com o pacote “ExpDes.pt” versão 1.2.2.

Resultados

Germinação in vitro

A evidência (*P-Valor*) entre as interações de suplementação com sacarose (g L^{-1}) e quebra de dormência (QD) em água aquecida (80°C) de *P. guajava* cultivares Paluma e Cortibel (C1 e C6) para as variáveis de Índice de porcentagem de germinação (%G) demonstraram interação dupla entre os fatores, e, a variável de IVG apenas na cultivar Cortibel C6. A variável de IVG das cultivares Paluma e Cortibel C1 foi avaliado os fatores de quebra de dormência e suplementação com sacarose de forma independente. (Tabela 2).

Tabela 2 Resultados de *P-valor* da análise de variância em esquema fatorial duplo, referente ao Índice de Velocidade de Germinação (IVG) e porcentagem de germinação (%G) de sementes de *P. guajava* cultivares Paluma (PL) e Cortibel (C1 e C6), submetidas, ou não, a quebra de dormência (QD) por imersão em água estéril aquecida a 80°C (1 minuto), incubadas em meio $\text{MS}\frac{1}{2}$ suplementado com diferentes concentrações de sacarose (g L^{-1}) após 30 dias de incubação

Fatores	GL	<i>P-Valor</i>					
		Cortibel (C1)		Cortibel (C6)		Paluma	
		IVG	%G	IVG dias	%G	IVG	%G
QD	1	0.00000	0.000001	0.0000000	0.00044541	0.000000	0.001484
Sacarose	2	0.00000	0.081189	0.0000000	0.00006170	0.00021	0.131798
QD x Sacarose	2	0.43653	0.017542	0.0092546	0.00006170	0.30331	0.021538

GL: grau de liberdade.

As médias de IVG da cultivar C1, no fator *Sacarose*, foi maior em meio de cultura sem adição de sacarose (0,88), se comparado as médias com a adição de 15 gL^{-1} (0,86) e 30 gL^{-1} (0,85) de sacarose. A cultivar Paluma obteve similaridade nas médias em meio de cultura com 0 gL^{-1} (0,87) e 15 gL^{-1} (0,87) de sacarose, e, a menor média em meio de cultura suplementado com 30 gL^{-1} (0,85). No fator *Quebra de Dormência*, a cultivar C1 obteve a maior média na presença da QD (0,88), seguida pela média de 0,84 na ausência da QD. Da mesma forma, a cultivar Paluma obteve a maior média de IVG na presença de QD (0,87) e a menor na ausência de QD (0,84).

As médias de IVG da cultivar C6, considerando as interações entre os fatores *Sacarose x Quebra de Dormência*, demonstraram maior influência da quebra de dormência alcançando as maiores médias, independente da concentração de sacarose, 0 gL^{-1} (0,90), 15

g L^{-1} (0,88), 30 g L^{-1} (0,87) e da sacarose, todavia, na ausência da QD e maiores concentrações de sacarose (30 g L^{-1}), o IVG tende a diminuir (0,8) (Tabela 3).

Tabela 3 Médias de índice de velocidade de germinação (IVG) das sementes de *P. guajava* cultivar Cortibel C6 submetida, ou não, a quebra de dormência (QD) por imersão em água estéril aquecida a 80°C (1 minuto), e incubadas em meio MS $\frac{1}{2}$ suplementado com diferentes concentrações de sacarose (g L^{-1})

	Quebra de dormência	Fatores		
		Sacarose (0 g L^{-1})	Sacarose (15 g L^{-1})	Sacarose (30 g L^{-1})
Cortibel C6	Presença	0,90 ^{aA}	0,88 ^{aB}	0,87 ^{aB}
	Ausência	0,86 ^{bA}	0,84 ^{bB}	0,8 ^{bC}

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna ou maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

As médias de %G das cultivares Paluma e Cortibel (C1 e C6), considerando as interações entre os fatores *Sacarose x Quebra de Dormência*, demonstraram maior influência da quebra de dormência e da sacarose, sendo que as cultivares testadas se comportaram de maneira semelhante (Tabela 4).

Tabela 4 Médias de porcentagem de germinação (%G) das sementes de *P. guajava* cultivares Paluma (PL) e Cortibel (C1 e C6) submetidas, ou não, a quebra de dormência (QD) por imersão em água estéril aquecida a 80°C (1 minuto), e incubadas em meio MS $\frac{1}{2}$ suplementado com diferentes concentrações de sacarose (g L^{-1})

Cultivar	Quebra de Dormência	Concentrações de Sacarose		
		0 g L^{-1}	15 g L^{-1}	30 g L^{-1}
Cortibel C1	Presença	98,33 ^{aA}	100 ^{aA}	100 ^{aA}
	Ausência	95 ^{aA}	88,33 ^{bAB}	81,66 ^{bB}
Cortibel C6	Presença	100 ^{aA}	100 ^{aA}	100 ^{aA}
	Ausência	100 ^{aA}	98,33 ^{aA}	75 ^{bB}
Paluma	Presença	98,33 ^{aA}	98,33 ^{aA}	100 ^{aA}
	Ausência	98,33 ^{aA}	93,33 ^{aAB}	88,33 ^{bB}

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna ou maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

A %G das sementes foi estatisticamente igual entre os meios associados a quebra de dormência para as três cultivares testadas, com 100% de germinação em C6 (0 g L⁻¹, 15 g L⁻¹ e 30 g L⁻¹), C1 (15 g L⁻¹ e 30 g L⁻¹) e Paluma (30 g L⁻¹). Todavia, na ausência da quebra de dormência meios contendo concentrações mais elevadas de sacarose (30 g L⁻¹) obteve as menores médias, com 81,66% de germinação em C1 (30 g L⁻¹), 75% na cultivar C6, e, 88,33% de germinação na cultivar Paluma (Tabela 4).

A partir dos resultados observa-se que para o fator de IVG as maiores médias foram obtidas na ausência de sacarose associado a QD em água aquecida (80°C). Não houve diferença significativa nos resultados finais de %G nos meios testados associados a quebra de dormência, independente da concentração de sacarose, todavia, na ausência de QD e maiores concentrações de sacarose as três cultivares testadas, Paluma e Cortibel (C1 e C6) demonstraram um decréscimo na porcentagem final da germinação. Sendo assim, para o sucesso da germinação *in vitro* dessas cultivares pode-se adotar o protocolo de QD com água estéril aquecida (80°C) por 1 minuto e incubação em meio MS½ sem adição ou baixas concentrações de sacarose.

Indução de calos

Os protocolos e RCVs testados para a indução de calos *in vitro* em *P. guajava* cultivares Paluma e Cortibel (C1 e C6) mostraram-se eficientes em explantes foliares (Fig. 1B, E e F), hipocotiledonares (Fig. 1C, G e H) e raízes (Fig. 1D, I e J) provenientes de plântulas germinadas *in vitro* (Fig. 1A). Para além, os aspectos morfológicos (Fig. 1F-J) dos calos obtidos nos diferentes explantes possuem similaridades na predominância de cor entre o creme e amarelo e de aspecto friável (Fig. 1).

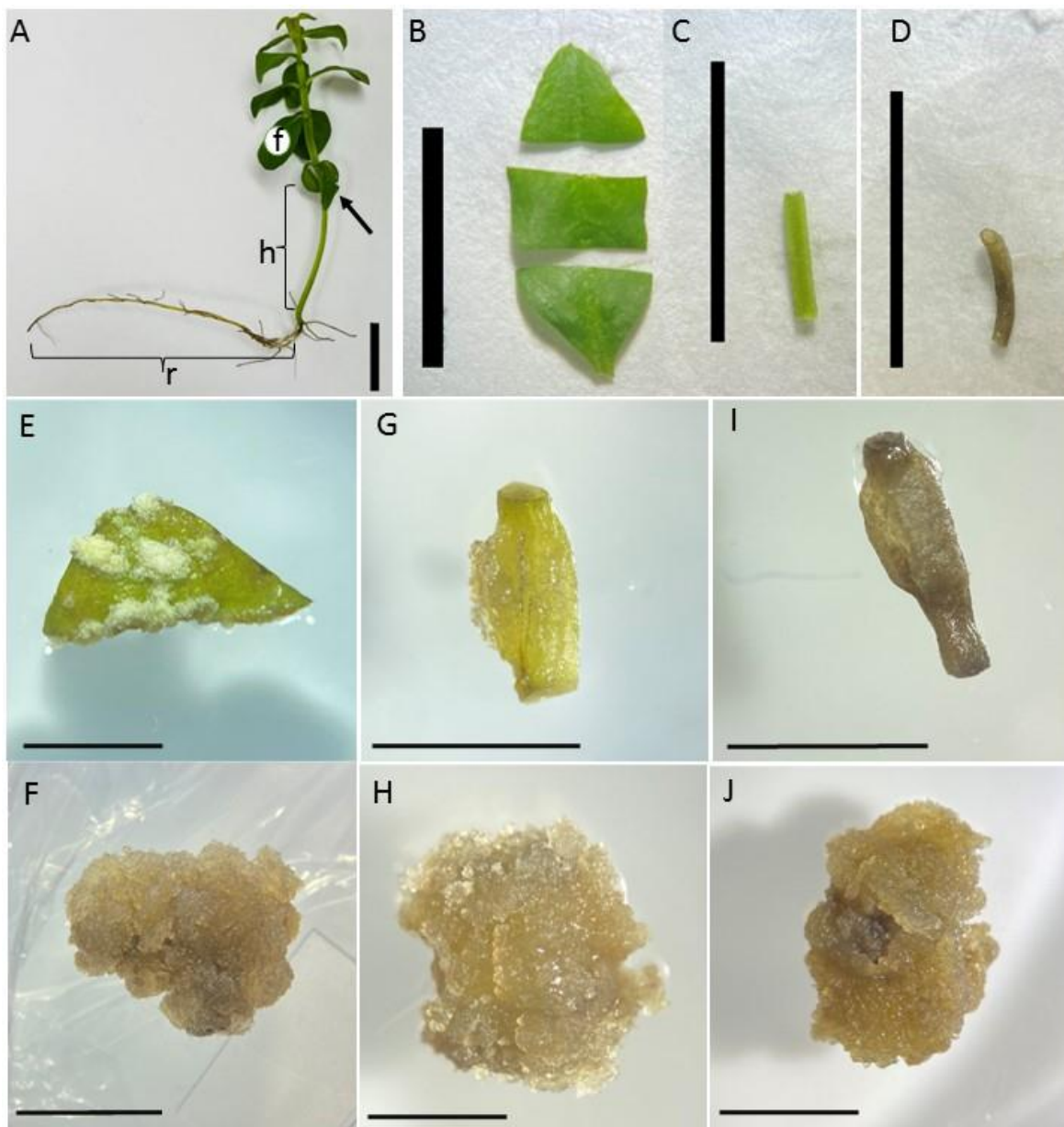


Fig. 1. **A** Plântula de *P. guajava* Paluma germinada *in vitro* com 120 dias em meio MS suplementado com ágar ($7,5 \text{ g L}^{-1}$), sacarose ($30,0 \text{ g L}^{-1}$) e ácido ascórbico ($0,1 \text{ g L}^{-1}$), utilizada para a obtenção dos explantes de folha (**f**), hipocótilo (**h**) e raiz (**r**). **B** Explantes de folha. **C** Explante de hipocótilo. **D** Explante de raiz. Desenvolvimento dos calos em explante de folha aos 30 (**E**) e 60 dias (**F**), hipocótilo aos 30 (**G**) e 60 (**H**) e de raiz aos 30 (**I**) e 60 (**J**) dias de incubação em meio MS, nas mesmas proporções anteriores, suplementado com os RCVs $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D + $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ANA + $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ KIN (T1). A seta em **A** indica os cotilédones, não utilizados no experimento. Barra = 1 cm em **A**, **B**, **C** e **D**, e, 4 mm em **E**, **F**, **G**, **H**, **I** e **J**.

Os resultados das análises de variância em esquema fatorial duplo demonstraram interação ($P\text{-Valor} < 0.05$) entre os *Explantos* e as *Combinações de RCVs* aos 30 e 60 dias, com exceção para C1 aos 30 dias (Tabela 5).

Tabela 5 Resultados de $P\text{-valor}$ da análise de variância em esquema fatorial duplo, referente a porcentagem de indução de calos aos 30 e 60 dias de incubação sob diferentes combinações de RCVs e explantes (Exp) obtidos de plântulas germinadas *in vitro* da espécie *P. guajava* cultivares Paluma e Cortibel (C1 e C6)

Fatores	GL	$P\text{-Valor}$					
		Cortibel (C1)		Cortibel (C6)		Paluma	
		30 dias	60 dias	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias
Explantos	2	0.000000	0.0000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000 ^{e+00}
RCVs	4	0.003591	0.0002462	0.02797	0.000032	0.11913	8.571 ^{e-06}
Exp x RCVs	8	0.165239	0.0004162	0.03476	0.015512	0.02222	1.088^{e-07}

GL: grau de liberdade.

As médias de porcentagem de calos *in vitro*, cultivar C1 aos 30 dias, no fator *Explante*, foi maior em explantes foliares (93 %), comparado com explantes de hipocótilos (20 %) e raízes (18 %). Para C1 aos 30 dias a combinação dos RCVs 2,0 mg L⁻¹ 2,4-D + 1,0 mg L⁻¹ ANA + 1,0 mg L⁻¹ KIN (T1) (60 %) e 1,0 mg L⁻¹ 2,4-D + 1,0 mg L⁻¹ ANA + 0,1 mg L⁻¹ BAP (T3) (45 %) apresentaram as maiores médias de porcentagem de calos induzidos (Tabela 6).

Tabela 6 Porcentagem de indução de calos *in vitro* nos diferentes explantes de folha, hipocótilo e raiz, obtidos de plântulas com 120 dias germinadas *in vitro* de *P. guajava* cultivar Cortibel (C1) aos 30 dias de incubação submetidos a diferentes combinações dos RCVs (Tabela 1)

Explante				
Folha	Hipocótilo	Raiz		
93 ^a	20 ^b	18 ^b		
Combinações de RCVs				
T1	T2	T3	T4	T5
60 ^a	36,66 ^b	45 ^{ab}	38,33 ^b	38,33 ^b

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Aos 60 dias para C1, a porcentagem de calos induzidos em explantes de folha e hipocótilo foram estatisticamente iguais, com 100% de indução nas folhas com a combinação de RCVs 2,0 mg L⁻¹ 2,4-D + 1,0 mg L⁻¹ ANA + 1,0 mg L⁻¹ KIN (T1) e 4,0 mg L⁻¹ 2,4-D + 1,0 mg L⁻¹ ANA + 1,0 mg L⁻¹ KIN (T2). Exceto na combinação de RCVs contendo 4,0 mg L⁻¹ 2,4-D + 1,0 mg L⁻¹ ANA + 1,0 mg L⁻¹ KIN (T2) (55%) em explantes de hipocótilos. Os menores valores de porcentagem de calos foram observados em explantes de raízes, diferenciando dos outros explantes dentro de cada tratamento (Tabela 7).

A porcentagem de calos em explantes foliares apresentaram sucesso em todas as combinações de RCVs testadas, sendo maior comparado com os hipocótilos e raízes (Tabela 7). Os calos induzidos em explantes de folhas em C6 aos 30 e 60 dias, apresentaram os maiores valores de porcentagem de calos em todas as combinações de RCVs testadas quando comparadas com hipocótilo e raiz, chegando a 100% nas combinações dos RCVs 2,0 mg L⁻¹ 2,4-D + 1,0 mg L⁻¹ ANA + 1,0 mg L⁻¹ KIN (T1), 1,0 mg L⁻¹ 2,4-D + 1,0 mg L⁻¹ ANA + 0,1 mg L⁻¹ (T3) e 4,0 mg L⁻¹ 2,4-D + 1,0 mg L⁻¹ ANA + 0,1 mg L⁻¹ BAP (T5). Exceto aos 60 dias quando comparados as combinações dos RCVs 4,0 mg L⁻¹ 2,4-D + 1,0 mg L⁻¹ ANA + 0,1 mg L⁻¹ BAP (T5) (75 %) no explante de hipocótilo e com 1,0 mg L⁻¹ 2,4-D + 1,0 mg L⁻¹ ANA + 0,1 mg L⁻¹ (T3) (75 %) em explante de raízes, onde são estatisticamente iguais. Os calos de raízes aos 30 dias de incubação são estatisticamente iguais, no entanto, aos 60 dias, as combinações dos RCVs 1,0 mg L⁻¹ 2,4-D + 1,0 mg L⁻¹ ANA + 0,1 mg L⁻¹ (T3) (75 %) possui a maior média, sendo os demais, estatisticamente iguais (Tabela 7).

Os resultados na indução de calos em Paluma são similares aos encontrados na cultivar C6 quando diz respeito a utilização de explantes foliares, onde, aos 30 e 60 dias de incubação, as combinações de RCVs são estatisticamente iguais entre si. Aos 30 dias de incubação os calos de folhas possuem as maiores médias em todas as combinações, chegando a 100% nas combinações de RCVs contendo 2,0 mg L⁻¹ 2,4-D + 1,0 mg L⁻¹ ANA + 1,0 mg L⁻¹ KIN (T1) e 4,0 mg L⁻¹ 2,4-D + 1,0 mg L⁻¹ ANA + 0,1 mg L⁻¹ BAP (T5). No entanto, aos 60 dias são estatisticamente iguais entre as combinações 2,0 mg L⁻¹ 2,4-D + 1,0 mg L⁻¹ ANA + 1,0 mg L⁻¹ KIN (T1) (Folha 100 % e Hipocótilo 100%), 4,0 mg L⁻¹ 2,4-D + 1,0 mg L⁻¹ ANA + 1,0 mg L⁻¹ KIN (T2) (Folha 95 % e Hipocótilo 90 %) e 1,0 mg L⁻¹ 2,4-D + 1,0 mg L⁻¹ ANA + 0,1 mg L⁻¹ (T3) (Folha 85 % e Hipocótilo 80 %). Os menores valores observados da indução de calos para Paluma também foram em explantes de raízes, assim como o observado na cultivar C1 e C6 (Tabela 7).

Tabela 7 Porcentagem de indução de calos *in vitro* nos diferentes explantes, folha, hipocótilo e raiz, obtidos de plântulas com 120 dias germinadas *in vitro* de *P. guajava* cultivar Cortibel (C1), aos 60 dias, Paluma (PL) e Cortibel (C6) aos 30 e 60 dias de incubação submetidos a diferentes combinações dos RCVs (Tabela 1)

Interação entre os fatores de Explantes x RCVs					
	T1	T2	T3	T4	T5
CORTIBEL C1					
60 Dias					
Folha	100 ^{a A}	100 ^{a A}	85 ^{a A}	95 ^{a A}	95 ^{a A}
Hipocótilo	90 ^{a A}	55 ^{b B}	85 ^{a A}	80 ^{a AB}	80 ^{a AB}
Raiz	45 ^{b A}	5 ^{c B}	55 ^{b A}	10 ^{b B}	10 ^{b B}
CORTIBEL C6					
30 Dias					
Folha	100 ^{a A}	85 ^{a A}	100 ^{a A}	90 ^{a A}	100 ^{a A}
Hipocótilo	55 ^{b A}	15 ^{b BC}	35 ^{b ABC}	50 ^{b AB}	10 ^{c C}
Raiz	25 ^{b A}	10 ^{b A}	25 ^{b A}	30 ^{b A}	45 ^{b A}
60 Dias					
Folha	100 ^{a A}	85 ^{a A}	100 ^{a A}	95 ^{a A}	100 ^{a A}
Hipocótilo	55 ^{b A}	15 ^{b B}	55 ^{b A}	60 ^{b A}	75 ^{a A}
Raiz	30 ^{b B}	15 ^{b B}	75 ^{ab A}	30 ^{b B}	35 ^{b B}
PALUMA					
30 Dias					
Folha	100 ^{a A}	95 ^{a A}	95 ^{a A}	80 ^{a A}	100 ^{a A}
Hipocótilo	35 ^{b AB}	20 ^{b AB}	15 ^{b AB}	45 ^{b A}	5 ^{b B}
Raiz	25 ^{b A}	15 ^{b A}	0 ^{b A}	30 ^{b A}	30 ^{b A}
60 Dias					
Folha	100 ^{a A}	95 ^{a A}	95 ^{a A}	85 ^{a A}	100 ^{a A}
Hipocótilo	100 ^{a A}	90 ^{a A}	15 ^{b B}	80 ^{a A}	10 ^{b B}
Raiz	30 ^{b AB}	15 ^{b AB}	0 ^{b B}	30 ^{b AB}	40 ^{b A}

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna ou maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As imagens obtidas pelo MEV (Fig. 2) permitem a identificação das mudanças morfológicas ocorridas nos explantes foliares de Paluma sob influência da combinação dos RCVs 2,0 mg L⁻¹ 2,4-D + 1,0 mg L⁻¹ ANA + 1,0 mg L⁻¹ KIN (T1) em diferentes tempos de

incubação (0, 14, 28, 42 e 49 dias). A anatomia da face abaxial das folhas jovens de *P. guajava* Paluma coletadas em plântulas germinadas *in vitro* com 120 dias (tempo 0 de incubação) possuem grandes quantidades de estômatos (Fig. 2A), em corte transversal podemos identificar um mesofilo com epiderme unisseriada (Fig. 2B-ep1 e ep2), parênquima paliádico com uma única camada celular (Fig. 2B-pp) e parênquima lacunoso com poucas células e espaçadas (Fig. 2B-pl). Aos 14 dias sob influência da combinação dos RCVs 2,0 mg L⁻¹ 2,4-D + 1,0 mg L⁻¹ ANA + 1,0 mg L⁻¹ KIN (T1) os explantes foliares apresentaram modificações estruturais dos tecidos (Fig. 2C e D), em que, o mesofilo perde as características dos tecidos diferenciados (Fig. 2D), e irregularidades e rachaduras na epiderme surgem em virtude da alta divisão mitótica e entumescimento das células (Fig. 2C-ra). Após 28 dias as células do parênquima (Fig. 2 E e F-cp) surgem a partir das rachaduras presentes na epiderme, evidenciando que o início da formação de calos em explantes foliares de *P. guajava* Paluma ocorrem a partir das células do tecido parenquimatoso. A divisão mitótica a partir dos 28 dias é intensificada, e, aos 42 (Fig. 2G) e 49 dias (Fig. 2H) de inoculação é possível visualizar altas quantidades de células indiferenciadas dos calos com aspecto desuniforme. Os calos possuem aspecto friável aos 49 dias (Fig. 2H) de incubação, as células variam entre os formatos isodiamétricas (Fig. 2H-ci) e alongadas (Fig. 2H-ca), e, quando manipulados, destacam-se do tecido calogênico facilmente.

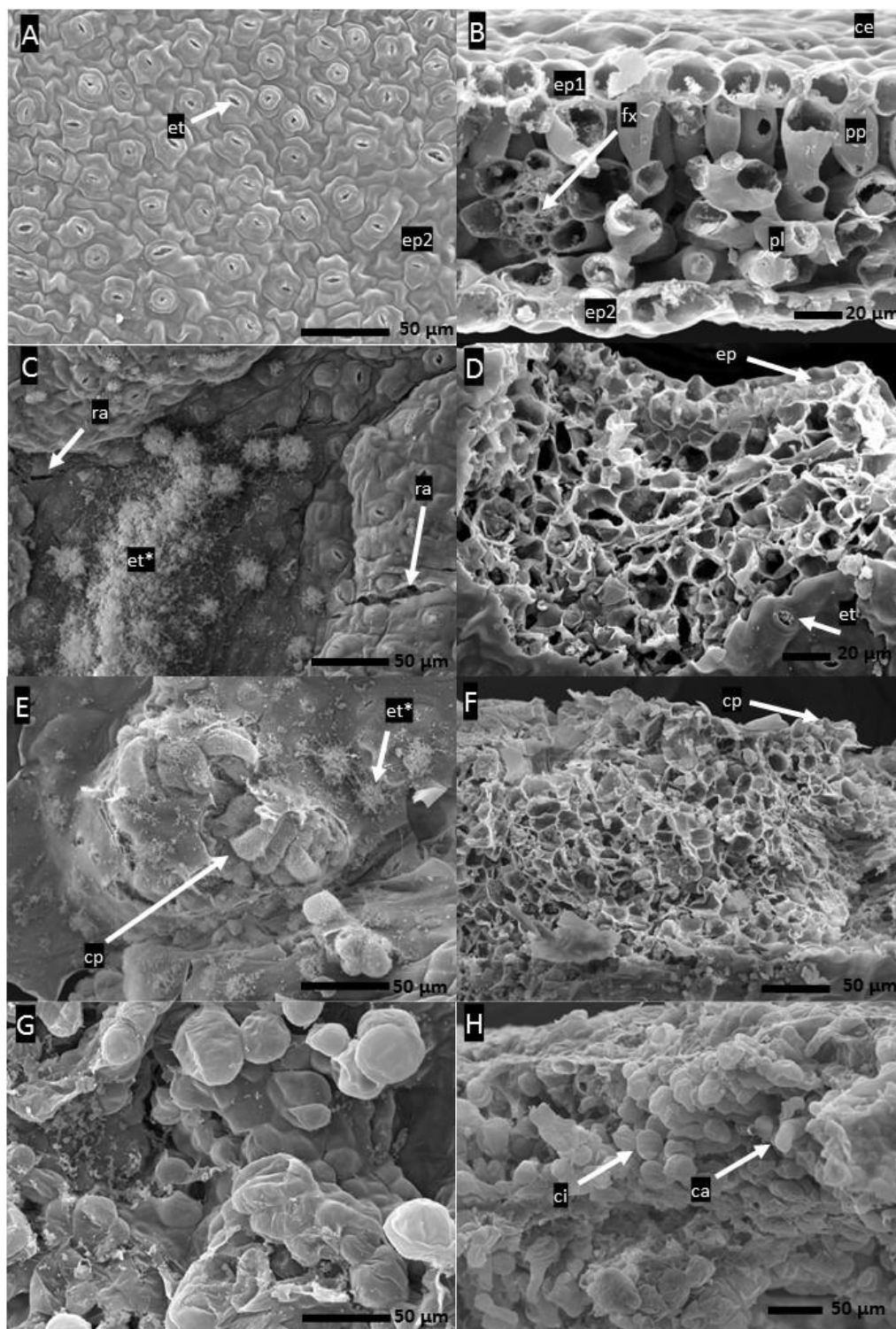


Fig. 2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) ao longo da indução de calos em explantes foliares de *P. guajava* Paluma submetidos à combinação dos RCVs $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D + $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ANA + $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ KIN (T1). Epiderme abaxial no tempo 0 (A), 14 (C) e 28 (E) dias de incubação. Mesofilo foliar no tempo 0 (B), 14 (D) e 28 (F) dias de incubação. Aspecto do tecido calogênico no tempo 42 (G) e 49 (H) dias de incubação. **et** Estômato (A,

D); **ep1** Epiderme adaxial (**B**); **ep2** Epiderme abaxial (**A** e **B**); **ce** Cera epicuticular (**B**); **fx** Feixe vascular (**B**); **pp** Parênquima paliçádico (**B**); **pl** Parênquima lacunoso (**B**); **ra** Rachaduras na epiderme e região com tecido entumecido (**C**); **et*** secreção de substâncias pela abertura estomática (**C** e **E**); **ep** Epiderme (**D**); **cp** Células parenquimáticas (**E** e **F**) surgindo na epiderme indicando a ontogenia dos calos; **ci** Células isodiamétricas; **ca** Células alongadas.

Prospecção fitoquímica dos metabólitos secundários em extratos aquosos e alcoólicos

Através dos métodos qualitativos de prospecção fitoquímica foram identificados a presença de alguns grupos dos MeS em amostras de calos cultivados *in vitro* de explantes foliar de *P. guajava* cultivares Paluma e Cortibel (C1 e C6) proveniente da combinação dos RCVs 2,0 mg L⁻¹ 2,4-D + 1,0 mg L⁻¹ ANA + 1,0 mg L⁻¹ KIN (T1) (Tabela 8).

Tabela 8 Prospecção fitoquímica das classes dos MeS identificados nos diferentes extratos obtidos dos calos induzidos *in vitro* submetidos a combinação dos RCVs 2,0 mg L⁻¹ 2,4-D + 1,0 mg L⁻¹ ANA + 1,0 mg L⁻¹ KIN (T1) de explantes foliar de *P. guajava* cultivares Paluma (PL) e Cortibel (C1 e C6)

Classes dos Metabólitos Secundários	Extratos					
	Aquoso			Álcool Etílico 70%		
	C1	C6	PL	C1	C6	PL
Alcaloides	-	-	-	-	-	-
Fenóis	-	-	-	-	-	-
Taninos	+	+	+	+	+	+
Antocianinas e Antocianidinas	-	-	-	-	-	-
Flavonas, Flavonóis, Xantonas	+	+	+	+	+	+
Chalconas e Auronas	+	+	+	-	-	-
Flavanonóis	-	-	-	-	-	-
Leucoantocianidinas	-	-	-	-	-	-
Catequinas	+	+	-	+	+	-
Flavononas	-	-	-	-	-	-
Esteroides	-	-	-	-	-	-
Triterpenoides	-	-	-	-	-	-
Saponinas	+	+	+	+	+	+

(+) presente; (-) não detectado

De acordo com os resultados qualitativos dos ensaios de prospecção fitoquímica realizados nos calos, é possível observar que ambos os extratos testados, aquoso e alcoólico, testaram positivo para os grupos dos Taninos, Flavonas, Flavonóis, Xantononas e Saponinas nas três cultivares testadas, Paluma e Cortibel (C1 e C6). O grupo de Chalconas e Auronas foram detectados apenas no extrato aquoso, para as três cultivares testadas. O grupo Catequinas foi detectado nas cultivares de Cortibel C1 e C6, em ambos os extratos. Os demais compostos investigados não foram detectados nos extratos para as cultivares testadas.

Discussão

Os resultados obtidos nos testes de germinação (Tabela 4) *in vitro* de *P. guajava* cultivares Paluma e Cortibel (C1 e C6) indicam similaridade nas respostas germinativas e alto potencial de germinação, atingindo percentuais acima de 98,33% em todas as cultivares testadas em meios de cultura contendo MS^{1/2}, suplementado ou não com sacarose, associada a QD em água estéril aquecida (80°C) por 1 minuto, corroborando com o proposto por Martins et al., (2015), Arruda et al., (2019) e Fernandes (2020). Os resultados de germinação estão vinculados as condições ambientais maternas expressas ao longo da formação das sementes que influenciam nas propriedades fenotípicas e fisiológicas, e, portanto, diferentes cultivares de *Psidium* inseridas no mesmo ambiente, podem apresentar similaridades nas respostas de germinação (Martins et al., 2015; Fernandes 2020). Além disso, a germinação é influenciada por outros fatores tais como os endógenos e exógenos ao local onde encontram-se as sementes, temperatura, potencial osmótico do substrato, níveis hormonais e permeabilidade do tegumento (Taiz et al., 2013; Fernandes 2020).

De Menezes et al., (2010) e Arruda et al., (2019) consideram que o sucesso da germinação *in vitro* com altas % de germinação e maiores índices de IVG em espécies de *P. guajava* está atrelado ao uso de meio MS^{1/2} ou JADES associados a baixas concentrações de sacarose, variando entre 0, 15 e 30 g L⁻¹, e, exposição das sementes por 1 minuto a água estéril aquecida (80°C). Para além, temperaturas entre 20 e 30°C são recomendadas para a germinação de espécies tropicais e subtropicais (Brancalion et al., 2010). O uso do meio MS^{1/2} com baixas concentrações de sacarose, ou até mesmo a ausência, proporciona menor pressão osmótica entre meio/semente, favorecendo a absorção de água pela semente (Monfort et al., 2015). Corroborando com o proposto, os resultados apresentados (Tabela 3) demonstraram que as cultivares atingiram maiores médias de IVG em meio sem adição de

sacarose quando associado a QD, no entanto, quando avaliado a porcentagem final de germinação (Tabela 4) em baixas concentrações de sacarose estando ou não associado a QD, estas não foram afetadas e apresentaram médias similares nas três cultivares, Paluma e Cortibel (C1 e C6). Da mesma forma, Ribeiro et al., (2010) obteve 97% de germinação na cultivar Paluma em meio MS suplementado com 10 gL⁻¹ de Sacarose e De Menezes et al., (2010), obteve IVG próximo a 1 em sementes de *P. guajava* germinadas em meio JADS na ausência de sacarose, semelhante ao encontrado nesse estudo. Fernandes (2020) germinou *in vitro* sementes de *P. guajava* coletadas em Manaus (AM) e Itumirim (MG), utilizando caixas Gerbox, papel filtro, água estéril e temperatura de 25°C, e, obteve diferença nas médias de IVG, sendo 1,65 (MG) e 1,10 (AM). Contrapondo ao resultado de Fernandes (2020), nas mesmas condições de temperatura, o maior IVG encontrado nesse estudo foi de 0,90 em meio MS½ na ausência de sacarose e associado a QD, cultivar C6 (Tabela 3).

A exposição das sementes em água aquecida danifica a estrutura das paredes celular, dissolve a camada cuticular cerosa, o que torna o tegumento maleável facilitando rupturas que irão otimizar a absorção de água e início dos processos bioquímicos relacionados ao processo de germinação (Bianchetti et al., 1982; Castro et al., 2004; De Souza et al., 2007), como, síntese das enzimas α -amilase responsáveis pela hidrólise do amido presente no endosperma para obtenção de energia que será associada e utilizada pelo embrião no processo de germinação e desenvolvimento inicial da plântula (Marcos Filho et al., 2005; Taiz et al., 2013). Novamente foi demonstrado que o IVG foi afetado pela exposição das sementes em água aquecida, mas, a porcentagem final de germinação foi similar nas três cultivares (Tabela 4). Arruda et al., (2019) descreve uma taxa de 66% de germinação de *Psidium cattleianum* (araçá) em meio MS suplementado com 30 gL⁻¹ de sacarose e imersão por 1 minuto das sementes em água aquecida (80°C), contraponto ao obtido nesse estudo, com 100% de germinação nas três cultivares, quando associados a QD. Diante do exposto, observou-se que sementes de *P. guajava* são capazes de germinar na ausência de sacarose, disponibilidade adequada de luminosidade e água, indicando que essas sementes possuem no interior do endosperma quantidades de carboidratos suficientes para o desenvolvimento inicial do seu crescimento (Marcos Filho et al., 2005), concentrações endógenas do hormônio giberelina capazes de promover a germinação (Taiz et al., 2013), e, quando associada a QD em água aquecida (80°C) obtém maiores médias de IVG. Portanto, para o sucesso da germinação *in vitro* dessas cultivares pode-se adotar o protocolo de QD com água

estéril aquecida (80°C) por 1 minuto e incubação em meio MS^{1/2} sem adição de sacarose, ou, baixas concentrações.

Os resultados da calogênese *in vitro* (Tabela 6 e 7) confirmam descrições citadas na literatura ao evidenciar que a utilização de explantes de órgãos jovens, como folhas, tem grande influência na formação de calos para obtenção de maiores quantidades de biomassa vegetal e em menor tempo (Thorpe et al., 1984; Werner et al., 2009), e, nesse caso, são recomendados como fonte doadora de explantes (Thorpe e Patel, 1984). Além disso, o desenvolvimento de tecido caloso *in vitro* é fortemente influenciado pelo uso de RCVs, especialmente concentrações mais altas de auxinas (2,4-D, ANA), e, mais baixas de citocininas (KIN, BAP), sendo estes, os mais recomendados nas literaturas para espécie *P. guajava* (Singh et al., 2005; Beas et al., 2010; Butt et al., 2013; Jain et al., 2013; Rezazadeh et al., 2015).

De acordo com Grattapaglia e Machado (1990), alta razão de auxina/citocinina estimula a desdiferenciação celular e divisão mitótica, resultando na formação do tecido caloso. Segundo Taiz et al., (2013) e Fouda (1996), tecidos jovens possuem níveis de auxinas endógenos mais elevados, maior densidade estomática e menor deposição de cera epicuticular, o que favorece a absorção dos nutrientes e RCVs. Werner et al., (2009) também associa o sucesso da calogênese *in vitro* em explantes de folhas pelo fato do explante ter maior contato de superfície com o meio nutritivo favorecendo a absorção de água, nutrientes e RCVs. Estas afirmações podem ser verificadas na Tabela 6 e 7, onde o menor tempo de resposta dos explantes a formação de calos foi observado em folhas quando comparado a explantes de hipocótilo e raízes. Semelhantemente, os melhores resultados de indução de calos óbitos por Dhar e Joshi (2005) foram em explantes de folhas quando comparado a explantes de hipocótilo, raízes e cotilédones em espécie de *Saussurea obvallata*. As combinações dos RCVs 2,0 mg L⁻¹ 2,4-D + 1,0 mg L⁻¹ ANA + 1,0 mg L⁻¹ KIN (T1) estimulou a proliferação celular indiferenciada originando os calos nas cultivares Paluma, C1 e C6, alcançando 100% de indução em explantes de folhas. Resultado similar encontrado em explantes de hipocótilo (90%) na cultivar C1 e Paluma (100%), nas mesmas concentrações. Butt et al., (2013) utilizou explantes foliares e obteve 88,67% de calos em meio B5 suplementado com 1,5 mg L⁻¹ de 2,4-D, e 89,33% suplementado com 2,0 mg L⁻¹ de ANA. Rodríguez (2013) obteve pouco mais de 50% de indução de calos em explantes de folhas de *P. cattleyanum* (araçá) cultivados em meio MS suplementado com 1 mgL⁻¹ cinetina + 1 mgL⁻¹

¹ auxina. Em contrapartida, Singh et al., (2005) obteve 35,29% de calos a partir de explantes foliar excisados de plantas cultivadas *in vitro* de *P. guajava* e 29,33% de plantas *ex vitro*, e, em explantes de hipocótilo 46,29% a partir de explantes *in vitro* e 41,01% *ex vitro* utilizando as combinações de RCVs 2,0 mg L⁻¹ 2,4-D + 1,0 mg L⁻¹ ANA + 1,0 mg L⁻¹ KIN. Os resultados apresentados confirmam que a interação entre auxinas e citocininas, e, a origem do explante é, muitas das vezes, responsável pelo sucesso na obtenção da calogênese *in vitro*.

Os resultados obtidos pela MEV evidenciam o surgimento do tecido caloso em explantes foliares de *P. guajava* Paluma (Fig. 2) a partir de células parenquimáticas emergindo nas rupturas surgidas na epiderme (Fig.2 F), da mesma forma que Rodrigues (2013) utilizando folhas de *Psidium cattleyanum* e Werner et al., (2010) em explantes foliares de *Caesalpinia echinata*. O tempo maior de resposta para a formação de calos em explantes de hipocótilos e raízes pode ser associado a limitação do contato do explante ao meio nutritivo, e, pelas células parenquimáticas encontradas no córtex e na medula de caules e raízes possuírem poucos espaços intercelulares (Evert et al., 2013), sendo um dificultador para maior absorção de água e nutrientes disponibilizado pelo meio nutritivo em que os explantes estão inseridos. Em contrapartida, células parenquimáticas encontradas no limbo foliar, como visto na Fig. 2 B, são mais espaçadas, assim como observado por Do Rocio et al., (2005), corroborando com o proposto por diferentes pesquisadores (Thorpe et al., 1984; Fouda 1996; Werner et al., 2009; Taiz et al., 2013), onde, explantes foliares respondem mais rápido a formação dos calos. Os aspectos anatômicos observados pela MEV (Fig 2 H), assim como a olho nu (Fig 1 F, H e J) possuem características de aspecto friável, com células alongadas e de arranjo frouxo, e, em outros pontos, células isodiamétricas (Fig 2 H). Segundo observado por Mello et al., (2000) e Lombardi et al., (2007) células isodiamétricas foram responsáveis pela formação de meristemóides, e, Pinto et al., (2011) na formação de embriões. Por outro lado, células alongadas são descritas como não embriogênicas (Da Silva et al., 2009; Pinto et al., 2011). De modo geral, através das análises anatômicas observadas dos calos, nesse estudo, não foi identificado tendência a formação de embriões ou formação de órgãos através da organogênese. Resultados similares foram observados por Santos et al., (2005) em estudo com Salgueiro (*Salix humboldtiana*) que obteve calos friáveis em explantes de folhas sob efeito de 2,4-D (2,0 mg L⁻¹), assim como Rodriguês et al., (2020) com explantes de folha de *Vernonia condensata* utilizando 4,44 µM do RCVs BAP.

Os estudos com o potencial de produção de MeS *in vitro* com a espécie de *P. guajava* são escassos, e, até o momento, não há relatos na literatura do potencial de produção de MeS em biomassa de calos. No entanto, alguns estudos com o gênero *Psidium* foram realizados. Testes fitoquímicos realizados por Aquiar et al., (2018) identificaram a partir de extrato hidroalcolico das folhas de *P. guajava* os grupos flavonóides, taninos, saponinas e triterpenóides. Compostos fenólicos, terpenóides e esteroides foram detectados em extratos de folhas de *Psidium myrtoides* por Reis (2019). Bacelar (2020) identificou o grupo dos taninos e flavonoides em extrato metanólico de folhas de *P. guajava*, corroborando com os resultados encontrados nesse estudo em extratos alcoólicos e aquosos a partir da biomassa de calos provenientes de explantes foliares, onde obteve maiores rendimentos de indução de calos comparado a explantes de hipocótilos e raízes, cultivados *in vitro*.

A diversidade dos compostos químicos obtidos em diferentes tipos de extratos é dependente de fatores genéticos, ambientais, ou até mesmo da técnica utilizada para extração (Soares et al., 2016), conforme observado nesse estudo (Tabela 8). Segundo Simões et al., (2010), para análises de prospecção fitoquímica e extração, o solvente desempenha a principal função, e, a maior parte dos compostos de MeS apresentam alguma solubilidade em misturas etanólicas ou metanólicas, sendo, portanto, frequentemente utilizadas. Quando utilizada apenas água como solvente, técnicas suplementares podem ser aplicadas, como extrações a frio e decocção, otimizando a extração dos MeS (Simões et al., 2010; Soares et al., 2016).

Muitos compostos são encontrados dentro do grupo fenol, como os flavonoides, flavonas, catequinas e taninos (Tsuchiya et al., 1996). Matias et al., (2011), assim como Monteiro et al., (2005), associa a atividade biológica do grupo em função da capacidade desses compostos em formar complexos com proteínas extracelulares presentes na parede celular de algumas bactérias, podendo levar a ruptura na membrana plasmática do microrganismo. As atividades antioxidantes decorrem das propriedades de óxido-redução, onde desempenham ação de absorção e neutralização de radicais livres (Degáspari *et al.*, 2004). Amâncio et al., (2015) utilizou extrato alcóolico de *P. guajava* e obteve resposta positiva contra cepas de *Staphylococcus aureus*, da mesma forma que Menezes et al., (2004) utilizando extrato aquoso. No geral, o uso de plantas medicinais produtoras de MeS, como *P. guajava*, tem demonstrado importantes atividades biológicas como bactericida (Aguiar et al., 2018), fungicida (Braga, 2016), antioxidante (Menezes et al., 2016), anti-hipertensivo

(Braga, 2019), e, para tratamentos gastrointestinais, como, constipação, dor de estômago, e desintéria (Gutiérrez *et al.*, 2008; Penido *et al.*, 2016; Costa *et al.*, 2016; Maes *et al.*, 2019), respaldando seu uso na medicina tradicional. Somado ao fato do potencial de produção de MeS em biomassa de calos cultivados *in vitro* com a espécie de *P. guajava*, e, das diferentes aplicações biológicas mencionadas com extratos da espécie *Psidium*, valiosos a saúde humana, é notório a importância da continuidade da pesquisa afim de elucidar possíveis aplicações biológicas utilizando extratos provenientes da biomassa de calos cultivados *in vitro*.

Conclusão

Os resultados desse estudo evidenciam que:

- A germinação *in vitro* de sementes de *P. guajava* cultivares Cortibel (C1 e C6) e Paluma apresenta vantagens quando utilizado o meio MS sem adição de sacarose ou baixas concentrações, associados a QD com água aquecida (80°C);
- O uso dos RCVs atuou significativamente na indução dos calos, principalmente em explantes foliares que foram mais responsivos em menor tempo do que os explantes de hipocótilo e raiz para as cultivares Paluma e Cortibel (C1 e C6), indicando que, o uso de explantes foliar permitirá maior rendimento de biomassa vegetal;
- O surgimento dos calos em explantes de folha ocorreu após 28 dias de incubação, onde, células parenquimáticas surgiram na superfície da epiderme através de aberturas causadas pela irregularidade do tecido epidérmico;
- A calos cultivados *in vitro* de *P. guajava* das cultivares Paluma e Cortibel (C1 e C6) são capazes de sintetizar MeS, como taninos, flavonas e saponinas.

Dessa forma, os resultados obtidos reforçam a necessidade de novos estudos relacionados a síntese de MeS *in vitro* em biomassa de calos e possíveis efeitos biológicos, assim como em brotos e plântulas germinadas *in vitro* de *P. guajava*. Para além, otimizar através de técnicas biotecnológicas como a CTV *in vitro*, a síntese e extração de MeS com qualidade e rendimento aceitável, contendo componentes de interesse medicinal.

Referências

AGUIAR, Ana Luiza Ribeiro et al. Atividade antimicrobiana do extrato de *Psidium guajava* L.(goiabeira) e sinergismo com antimicrobianos convencionais. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 24, n. 1, 2018.

AMANCIO, Aline Maritan et al. Estudo da ação antimicrobiana de extratos de plantas do gênero *Psidium*. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 13, n. 1, p. 644-652, 2015.

ARRUDA, Ana Luiza et al. Estabelecimento in vitro de sementes de *Psidium cattleianum* Sabine. **Acta Biológica Catarinense**, v. 6, n. 4, p. 105-113, 2019.

BACELAR, Thais Siqueira. **Identificação de flavonoides e taninos em plantas medicinais pertencente a lista estadual de plantas medicinais comercializadas em um mercado público em Fortaleza-CE**. 2020. Tese de Doutorado. Centro Universitário Fametro (UNIFAMETRO) – Curso de Farmácia – Fortaleza. 2020.

BANDERA FERNÁNDEZ, Evelyn; PÉREZ PELEA, Leneidy. Mejoramiento genético de guayabo (*Psidium guajava* L.). **Cultivos Tropicales**, v. 36, p. 96-110, 2015.

BEAS, R.C.; BATISTA-GALVEZ, A. Induction and callus characterization from leaf, hypocotyls and embryos of *Psidium guajava* L. **Acta Hortic.**, v. 849, p. 231-234, 2010.

BIANCHETTI, Arnaldo; RAMOS, Adson. Comparação de tratamentos para superar a dormência de sementes de canafístula (*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert). **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 4, p. 91-99, jun. 1982.

BOURGAUD, Frederic et al. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant science**, v. 161, n. 5, p. 839-851, 2001.

BRAGA, Joelma Correia Beraldo; DA SILVA, Luan Ramos. Consumo de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil: perfil de consumidores e sua relação com a pandemia de COVID-19. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 4, n. 1, 2021.

BRAGA, M. F. B. M. Composição química e avaliação da atividade antifúngica de extratos de *Psidium guajava* L. (Goiabeira) e *Psidium brownianum* mart. ex dc. (Araçá de veado) sobre espécies de *Candida*. 2016. **Tese de Doutorado em Etnobiologia e Conservação da Natureza**. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Crato, 2016. Disponível em: <http://www.pgetno.ufrpe.br/sites/ww2.pgetno.ufrpe.br/files/documentos/tese_moraisbraga_0.pdf>. Acesso em: 26 set. 2022.

BRAGA, D. C. A. Efeitos do tratamento com suspensão de extrato de folhas de *Psidium guajava* L. (goiabeira) sob a pressão arterial e balanço hidroeletrolítico de ratos Wistar sob dieta com sobrecarga de sódio. 2019. 97 f. **Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas**. Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2019. Disponível em: <[https://repositorio.ufop.br/bitstream/123456789/12459/1/DISSERTA%
3O_EfeitosTratamentoSuspens%
3O_EfeitosTratamentoSuspens](https://repositorio.ufop.br/bitstream/123456789/12459/1/DISSERTA%c3%87%c3%83O_EfeitosTratamentoSuspens%c3%a3o.pdf)>. Acesso em: 26 set. 2022.

BRANCALION, Pedro Henrique Santin; NOVENBRE, Ana Dionísia Da Luz Coelho; RODRIGUES, Ricardo Ribeiro. Temperatura ótima de germinação de sementes de espécies arbóreas brasileiras. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, p. 15-21, 2010.

BUTT, MADIHA; USMAN, MUHAMMAD; FATIMA, BILQUEES. Enhanced Seed Germination and Callogenesis under long days using Leaf Disc as Explant in Guava cultivars. **Biologia (Pakistan)**, v. 59, n. 2, p. 293-298, 2013.

CAPOTE, A.; PÉREZ-ALONSO, N.; PÉREZ, A.; BARBÓN, R.; SALAS, E.; WILKEN, D.; GERTH, A.; MÜLLER-KUHRT, L.; JIMÉNEZ, E. Perfil metabólico de extractos obtenidos de cultivos *in vitro* y plantas de campo de *Morinda royoc* L., *Psidium guajava* L. y *Morus alba* L. **Biotecnología Vegetal**, v. 8, n. 1, p. 119-121, 2008.

CAPOTE, A.; PÉREZ-ALONSO, N.; PÉREZ, A.; BARBÓN, R.; SALAS, E.; WILKEN, D.; GERTH, A.; MÜLLER-KUHRT, L.; JIMÉNEZ, E. Efecto del cultivo *in vitro* en el perfil metabólico de *Psidium guajava* L. **Biotecnología Vegetal**, v. 9, n. 1, 2009.

CASTRO, RD de; BRADFORD, K. J.; HILHORST, H. W. M. Embebição e reativação do metabolismo. **Germinação: do básico ao aplicado**, v. 1, p. 149-162, 2004.

COSER, Sara Morra et al. Diversidade genética de seleções de goiabeiras cortibel. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, p. 391-399, 2014.

COSTA, J. C.; MARINHO, M. G. V. Etnobotânica de plantas medicinais em duas comunidades do município de Picuí, Paraíba, Brasil. **Rev. Bras. Plantas Med.**, v. 18, p. 125-134, 2016.

DA SILVA, Maurecilne Lemes et al. A novel regeneration system for a wild passion fruit species (*Passiflora cincinnata* Mast.) based on somatic embryogenesis from mature zygotic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 99, p. 47-54, 2009.

DEGÁSPARI, Cláudia Helena; WASZCZYNSKYJ, Nina. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão acadêmica**, v. 5, n. 1, 2004.

DHAR, Uppeandra; JOSHI, Mitali. Efficient plant regeneration protocol through callus for *Saussurea obvallata* (DC.) Edgew.(Asteraceae): effect of explant type, age and plant growth regulators. **Plant Cell Reports**, v. 24, p. 195-200, 2005.

DE MENEZES FILHO, A. C. P.; DE SOUZA CASTRO, C. F. Identificação das classes de metabólitos secundários em extratos etanólicos foliares de *Campomanesia adamantium*, *Dimorphandra mollis*, *Hymenaea stigonocarpa*, *Kielmeyera lathrophytum* e *Solanum lycocarpum*. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 9, n. 1, p. 89-101, 2019.

DE MENEZES, THATIANE PADILHA et al. Sacarose e GA3 na germinação de sementes e no desenvolvimento in vitro de plântulas de goiabeira 'Pedro Sato'. **Plant Cell Culture & Micropropagation-ISSN 1808-9909**, v. 6, n. 2, p. 70-76, 2010.

DE SOUZA, Eli Regina Barboza et al. Efeito de métodos de escarificação do tegumento em sementes de *Leucaena diversifolia* L. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 37, n. 3, p. 142-146, 2007.

DO ROCIO DUARTE, Marcia; DE PAULA, F. M. Morfodiagnose de *Psidium guajava* L., Myrtaceae. **Visão Acadêmica**, v. 6, n. 2, 2005.

EVERT, Ray F.; ESAU, Katherine. **Anatomia das plantas de Esau: meristemas, células e tecidos do corpo da planta: sua estrutura, função e desenvolvimento**. Editora Blucher, 2013.

FERNANDES, A. C. Perda da tolerância à dessecação em sementes de espécies florestais. 2020. 103 p. **Tese de Doutorado em Engenharia Florestal** – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2020. Disponível em; <http://177.105.2.185/bitstream/1/45805/1/TESE_Perda%20da%20toler%c3%a2ncia%20%c3%a0%20desseca%c3%a7%c3%a3o%20em%20sementes%20de%20esp%c3%a9cies%20florestais.pdf>. Acesso em: 11 de janeiro 2022.

FOUDA, R. A. Anatomical characteristics of juvenile and adult shoots associated with rooting ability of *Cupressocyparis leylandii* cuttings. **Horticultural Science**, v.28, n.1, p.107-111, 1996.

GOLLE, Diego Pascoal et al. Fitorreguladores e luminosidade na indução à calogênese em explantes foliares de *Eugenia involucrata* DC. **Ciência Florestal**, v. 30, p. 898-906, 2020.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Eds.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas** Brasília: ABCTP/Embrapa-CNPq, 1990. p.99-169.

GUTIÉRREZ, R. M.; MITCHELL, S.; SOLIS, R. V. J. *Psidium guajava*: a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. **Journal Ethnopharmacology**, v. 117, p. 1–27, 2008.

ISAH, Tasiu et al. Secondary metabolism of pharmaceuticals in the plant in vitro cultures: strategies, approaches, and limitations to achieving higher yield. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 132, n. 2, p. 239-265, 2018.

JAIN, S. Mohan; GUPTA, Pramod K.; NEWTON, Ronald J. (Ed.). **Somatic Embryogenesis in Woody Plants: Volume 6**. Springer Science & Business Media, 2013.

KAMLE, M.; BAEK, K. H. Embriogênese somática em goiaba (*Psidium guajava* L.): situação atual e perspectivas futuras. **3 Biotech**, v. 7, n. 203, 2017.

LOMBARDI, Simone Pacheco et al. In vitro shoot regeneration from roots and leaf discs of *Passiflora cincinnata* mast. **Brazilian Archives of biology and technology**, v. 50, p. 239-247, 2007.

MA, Xin-Ye et al. Leaf callus induction and suspension culture establishment in lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) cv. Huaizhi. **Acta physiologiae plantarum**, v. 31, p. 401-405, 2009.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de plantas cultivadas**. Piracicaba, v. 12, 2005, 495p.

MARTINS, J. R. et al. Seedling survival of *Handroanthus impetiginosus* (Mart ex DC) Mattos in a semi-arid environment through modified germination speed and post-germination desiccation tolerance. **Brazilian Journal of Biology**, v. 75, p. 812-820, 2015.

MASSOT, B.; MILESI, S.; GONTIER, E.; BOURGAUD, F.; GUCKERT, A. Optimized culture conditions for the production of furanocoumarins by micropropagated shoots of *Ruta graveolens*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 62, p. 11-19, 2000.

MATIAS, E. F. F. et al. Phytochemical prospection and modulation of aminoglycoside antibiotic activity by *Croton campestris* A. **Chemotherapy**, v. 57, n. 4, p. 305-309, 2011.

MELLO, Marcia O.; MELO, Murilo; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, Beatriz. Bauhinia forficata link shoot regeneration: histological analysis of organogenesis pathway. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 43, p. 431-431, 2000.

MENDONÇA, Romário Delbons et al. Características físicas e químicas de goiabas' Cortibel 1'e'Cortibel 4'armazenadas em condições ambientais. **Bragantia**, v. 66, p. 685-692, 2007.

MENEZES, Paula Ebling et al. Composição centesimal, compostos bioativos, atividade antioxidante e caracterização fenólica da polpa de goiaba. **Disciplinarum Scientia| Saúde**, v. 17, n. 2, p. 205-217, 2016.

MENEZES BRAGA, Joelma Correia Beraldo; DA SILVA, Luan Ramos. Consumo de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil: perfil de consumidores e sua relação com a pandemia de COVID-19. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 4, n. 1, 2021.

MONFORT, Lucila Elizabeth Frago et al. Micropropagação e germinação de sementes in vitro de atoveran. **Revista Ceres**, v. 62, p. 215-223, 2015.

MONTEIRO, Julio Marcelino et al. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química nova**, v. 28, p. 892-896, 2005.

MORAES, L. L. C.; FREITAS, J. L.; MATOS FILHO, J. R.; SILVA, R. B. L.; BORGES, C. H. A.; SANTOS, A. C. Ethno-knowledge of medicinal plants in a community in the eastern Amazon. **Rev. Ciências Agrárias**, v. 42, p. 565-573, 2019.

MORAIS, T. P. et al. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, p. 110-121, 2012.

MURASHIGE, Toshio; SKOOG, Folke. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

PENIDO, A. B.; DE MORAIS, S. M.; RIBEIRO, A. B.; SILVA, A. Z. Ethnobotanical study of medicinal plants in Imperatriz, State of Maranhão, Northeastern Brazil. **Acta Amaz.**, v. 46, p. 345-354, 2016.

PINTO, Daniela Lopes Paim et al. Somatic embryogenesis from mature zygotic embryos of commercial passionfruit (*Passiflora edulis* Sims) genotypes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 107, p. 521-530, 2011.

REIS, Érica Karoline dos. **Atividade antioxidante de extratos das folhas da *Psidium myrtoides* O. Berg.** 2019. 60 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química Industrial) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2020.

REZAZADEH, R.; NIEDZ, R. P. Protoplast isolation and plant regeneration of guava (*Psidium guajava* L.) using experiments in mixture-amount design. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, v. 122, p. 585–604, 2015.

RIBEIRO, J. M. et al. Micropropagação e aclimatização de goiabeira Paluma. **Embrapa Semiárido-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)**, 2010.

RODRIGUÉZ, Edwin Antonio Gutiérrez. **Contribuições à propagação de araçazeiro (*Psidium cattleianun* Sab.) e grumixameira (*Eugenia brasiliensis* Lam.)**. Gilmar Schafer. 2013. 161 pg. Dissertação (Mestrado) – Pós graduação em fitotecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre (RS), 2013.

SANTOS, Breno Régis et al. Indução de calos friáveis em explantes foliares de *Salix* (*Salix humboldtiana* Willd). **Ciência Rural**, v. 35, p. 510-514, 2005.

SHRUTHI, S. D.; ROSHAN, A.; TIMILSINA, S. S.; SUNITA, S. A review on the medicinal plant *Psidium guajava* Linn. (Myrtaceae). **J. Drug Deliv. Ther.**, v. 3, p. 162-168, 2011.

SILVA, R. C. E.; COSTA, J. S. D.; FIGUEIREDO, R. O. D.; SETZER, W. N.; SILVA, J. K. R. D; MAIA, J. G. S.; FIGUEIREDO, P. L. B. Monoterpenes and Sesquiterpenes of Essential Oils from *Psidium* Species and Their Biological Properties. **Molecules**, v. 26, n. 965, 2021.

SINGH, G.; TIWARI, J. P.; LAL, S. In vitro callus induction in guava (*Psidium guajava* l.). In: **I International Guava Symposium 735**. 2005. p. 139-143.

SOARES, FERNANDA PEREIRA et al. Taxa de multiplicação e efeito residual de diferentes fontes de citocinina no cultivo in vitro de *Hancornia speciosa* Gomes. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, p. 152-157, 2011.

SOBRINHO, Alessandra Carla Guimarães; SANTOS, Alberdan Silva. Estabelecimento de cultura in vitro de *Hibiscus sabdariffa* L.: obtenção de plântulas e indução de calos em diferentes condições de cultura visando o acúmulo de biomassa. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 15, p. e358101523114-e358101523114, 2021.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Tradução de Armando Molina Divan JUNIOR et al. 5ª. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918 p.

THORPE, T. A.; PATEL, K. R. Clonal propagation: adventitious buds. In: VASIL, I. (Ed.) Cell 1 Terra et al. Controle da calogênese do pau-brasil in vitro. **Revista Árvore**, v. 33, p. 987-996, 2009.

TSUCHIYA, Hironori et al. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 50, n. 1, p. 27-34, 1996.

VASCONCELOS, Loren Cristina et al. Chemical composition, phytotoxicity and cytogenotoxicity of essential oil from leaves of *Psidium guajava* L. cultivars. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 9, p. e6110917710-e6110917710, 2021.

WERNER, Elias Terra et al. Meios de cultura, reguladores de crescimento e fontes de nitrogênio na regulação da calogênese do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.). **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, p. 1046-1051, 2010.

WITHERUP, Keith M. et al. *Taxus* spp. needles contain amounts of taxol comparable to the bark of *Taxus brevifolia*: analysis and isolation. **Journal of Natural Products**, v. 53, n. 5, p. 1249-1255, 1990.