

CALOGÊNESE EM EXPLANTES FOLIARES DE *Piper tuberculatum*

CALLOGENESIS IN LEAF EXPLANTES OF *Piper tuberculatum*

Maurício Reginaldo Alves dos Santos^{1*} e Wanessa de Oliveira Nogueira²

1. Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, Embrapa Rondônia, Porto Velho-RO, Brasil. *Autor correspondente: mauricio.santos@embrapa.br

2. Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente – PGDRA, Fundação Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho-RO, Brasil.

* Autor correspondente: e-mail: mauricio.santos@embrapa.br

Recebido: 12/11/2017; Aceito: 15/08/2018

RESUMO

Piper tuberculatum (Piperaceae) está distribuída do México à Argentina e é reconhecida por suas atividades sedativas, analgésicas, antiofídicas e estomáquicas. A atividade inseticida também foi identificada e se deve, principalmente, à ação de suas piperamidas, em especial as isobutilamidas e piperidinas. Métodos de cultura de tecidos vegetais têm sido utilizados para a produção de metabólitos secundários em larga escala. O objetivo dessa pesquisa foi desenvolver um protocolo para a indução de calos a partir de explantes foliares de *P. tuberculatum* para o estabelecimento de suspensões celulares visando à produção de metabólitos secundários. Foram utilizados explantes foliares, os quais foram inoculados em meio Murashige & Skoog suplementado com os seguintes reguladores de crescimento, em combinações fatoriais: 2,4-D (0,0; 1,0; 2,0; 4,0 mg L⁻¹) + BAP (0,0; 1,0; 2,0; 4,0 mg L⁻¹); e 2,4-D (0,0; 0,1; 0,2; 0,4 mg L⁻¹) + BAP (0,0; 0,2; 2,0 mg L⁻¹) + ANA (1,0 mg L⁻¹) + GA₃ (0,5 mg L⁻¹). Foi avaliada a formação de calos nos explantes a cada sete dias, durante 35 dias. Após esse período, a maior porcentagem de formação de calos foi observada no tratamento que combinou 2,0 mg L⁻¹ de BAP + 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D, resultando em calogênese em 100% dos explantes.

Palavras-chave: Piperaceae, calos, metabólitos secundários.

ABSTRACT

Piper tuberculatum (Piperaceae) is distributed from Mexico to Argentina and is recognized for its sedative, analgesic, antivenom and stomachic activities. The insecticidal activity has also been identified and is mainly due to the action of its piperamides, especially the isobutylamides and piperidines. Methods of plant tissue culture have been used for the production of secondary metabolites on a large scale. The objective of this research was to develop a protocol for callus induction from leaf explants of *P. tuberculatum* for the establishment of cell suspensions aiming at the production of secondary metabolites. Leaf explants were inoculated in Murashige & Skoog medium supplemented with the following growth regulators, used in factorial combinations: 2,4-D (0.0, 1.0, 2.0; 4.0 mg L⁻¹) + BA (0.0, 1.0, 2.0; 4.0 mg L⁻¹) and 2,4-D (0.0, 0.1, 0.2; 0.4 mg L⁻¹) + BA

(0.0; 0.2; 2.0 mg L⁻¹) + ANA (1.0 mg L⁻¹) + GA₃ (0.5 mg L⁻¹). Callus formation was evaluated in the explants every 7 days for 35 days. After this period, the highest percentage of callus formation was observed in the treatment that combined 2.0 mg L⁻¹BA + 1.0 mg L⁻¹ 2,4-D, which resulted in calluses in 100% of the explants.

Key words: Piperaceae, callus, secondary metabolites.

1. INTRODUÇÃO

Um dos principais problemas da agricultura refere-se ao controle de pragas e doenças. O uso de inseticidas químicos compromete a qualidade dos alimentos, causa efeitos cumulativos sobre o ambiente e favorece o surgimento de pragas secundárias, devido ao desenvolvimento de resistência em insetos e outras pragas. Estes aspectos têm incentivado estudos sobre novas técnicas de controle, que incluem a utilização de produtos naturais que sejam menos agressivos ao meio ambiente [1, 2, 3].

A utilização de extratos vegetais se tornou uma prática cada vez mais frequente na agricultura, principalmente na linha de produção orgânica e agricultura familiar para controle biológico e sistemas de manejo. A efetividade dos extratos se deve à presença de metabólitos secundários, substâncias acumuladas em pequenas proporções nos tecidos vegetais e que possuem diversas funções específicas, em geral defesas bioquímicas que atuam no comportamento e fisiologia dos insetos [4, 5, 6].

A família Piperaceae possui distribuição em regiões tropicais e

subtropicais, com cerca de 2.500 espécies e cinco gêneros, das quais 500 espécies de quatro gêneros ocorrem no Brasil [7]. O gênero *Piper* constitui mais de 700 espécies, distribuídas em todas as regiões tropicais e 170 são nativas do Brasil. Estas espécies são notáveis produtoras de compostos secundários com comprovados efeitos biológicos em insetos, fungos, bactérias, tripanossomas [8, 9, 10, 11] e podem também afetar a saúde humana, como analgésicos, antidepressivos, citoprotetores, antiulcerativos, anticonvulsivos, anti-inflamatórios e antioxidantes [12].

A espécie *Piper tuberculatum* Jacq. se encontra distribuída pelo continente americano, do México à Argentina. No Brasil, ocorre naturalmente nos estados do Amazonas, Pará, Maranhão, Piauí, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Rio de Janeiro e Mato Grosso [13]. Essa piperácea possui grande interesse econômico por suas atividades inseticidas e à ação de suas piperamidas, em especial, as isobutilamidas e piperidinas, bem como na medicina popular por suas atividades sedativas analgésicas, antiofídicas e em problemas estomacais [14, 15].

Foi constatada a atividade inseticida de extratos das folhas de *P. tuberculatum* sobre as larvas do mosquito *Aedes atropalpus*, o que revelou que os extratos da referida espécie são tão eficazes quanto o extrato das sementes de *Piper nigrum* e proveem um inseticida alternativo de uma fonte mais conveniente, as folhas [15]. Também foi identificado o potencial de atividade inseticida dessa piperácea em broca de cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* e *Anticarsia gemmatalis* [8]. Além disso, as amidas mostraram atividades antifúngicas contra fungos os fitopatogênicos *Cladosporium sphaerospermum* e *C. cladosporioides* [16, 17].

As técnicas de cultura de tecidos vegetais podem ser alternativas viáveis para a exploração do potencial de plantas produtoras de substâncias bioativas, pois possibilita a produção de metabólitos secundários *in vitro* em sistemas conhecidos como suspensões celulares [18]. A suspensão celular possibilita a produção de metabólitos secundários em larga escala a partir de um protocolo estabelecido para calogênese e determinação da curva de crescimento dos calos, tornando esse método o mais eficiente devido ao seu ciclo de crescimento rápido [19].

Diante da importância econômica e carência de estudos relacionados à produção *in vitro* de metabólitos secundários por esta piperácea, essa pesquisa teve por objetivo desenvolver um protocolo para a indução de

calos a partir de explantes foliares de *P. tuberculatum*, identificando combinações e concentrações de reguladores de crescimento eficientes para a produção de calos friáveis e consequente proliferação celular, visando ao subsequente estabelecimento de suspensões celulares da espécie.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MATERIAL VEGETAL E ESTERILIZAÇÃO

Foram utilizadas folhas de plantas matrizes, com cinco meses de idade e aproximadamente 70 cm de altura, mantidas em casa de vegetação na Embrapa Rondônia, em Porto Velho-RO, Brasil. As folhas foram conduzidas ao Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, onde foram lavadas com água corrente e detergente, com auxílio de esponja autoclavada, durante cinco minutos, e então enxaguadas com água destilada. Em câmara de fluxo horizontal, foram submersas em álcool 70% (v/v) por 1 minuto e em hipoclorito de sódio 2% (v/v) por 10 minutos e em seguida, enxaguadas três vezes com solução estéril de água destilada. As folhas foram reduzidas a segmentos de 1cm² em placas de Petri esterilizadas.

2.2 CONDIÇÕES DE CULTURA

Os explantes foram transferidos individualmente para tubos de ensaio (25 mm x 150 mm) contendo 10 mL de meio MS [20] com 3% (p/v) de sacarose e 0,6% (p/v) de ágar. O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da adição de ágar, seguido por autoclavagem a 121°C durante 20 min. O meio de cultivo foi suplementado com ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 6-benzilaminopurina (BAP), ácido naftalenacético (ANA) e ácido giberélico (GA3) em combinação fatorial. Todas as culturas foram mantidas em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas a 26±1°C.

2.3 INDUÇÃO DE CALOS

Os explantes foliares foram transferidos para dois meios de cultura suplementados com combinações dos reguladores de crescimento: ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) (0,0; 1,0; 2,0 e 4,0mg L⁻¹) + benzilaminopurina (BAP) (0,0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹) e de 2,4-D (0,0; 0,1; 0,2; 0,4 mg L⁻¹) + BAP (0,0; 0,2; 2,0 mg L⁻¹) + ácido naftalenoacético (ANA) (1 mg L⁻¹) + giberelina (GA3) (0,5 mg L⁻¹) totalizando 16 e 15 tratamentos, respectivamente, onde foram colocados com a superfície adaxial em contato com o meio. Foi avaliada a formação de calos nos explantes a cada sete dias, durante 35 dias.

2.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E AVALIAÇÃO

Os tratamentos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições de cinco tubos de ensaio por tratamento, cada um contendo um explante. O número de calos por explante foi submetido à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A formação de calos iniciou aos 14 dias após a inoculação. Após 42 dias, observou-se vigoroso desenvolvimento das células de calo. Na Tabela 1 é possível observar o efeito da combinação fatorial de 0, 1, 2 e 4 mg L⁻¹ dos reguladores de crescimento BAP e 2,4-D. Não foi observada a indução de calos na ausência de reguladores. Porém, houve indução até mesmo onde apenas 2,4-D ou BA isoladamente estava presente. As concentrações de 1,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹ de 2,4-D proporcionaram 25, 40 e 60% de calogênese, respectivamente, sendo que as mesmas concentrações de BAP resultaram em valores similares: 25, 60 e 60% de calogênese. No entanto, as porcentagens de indução de calos foram maiores nos tratamentos em que ambos os reguladores foram suplementados. Nos tratamentos em que foram suplementados BAP e 2,4-D ocorreu calogênese em 50 a 100% dos

explantes, com exceção da combinação de 4,0 mg L⁻¹ de BAP + 4,0 mg L⁻¹ de 2,4-D, que provavelmente teve efeito tóxico sobre os explantes, levando à indução de calos em apenas 25% dos explantes. A combinação de

1,0 mg L⁻¹ de BAP + 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D foi significativamente superior aos demais tratamentos, resultando em 100% de calogênese.

Tabela 1: Porcentagens de indução de calos em explantes de *P. tuberculatum* submetidos a combinações fatoriais de 2,4-D (0,0; 1,0; 2,0 e 4,0 mgL⁻¹) e BAP (0,0; 0,1; 0,5 e 2,5 mgL⁻¹), após 42 dias de cultivo.

2,4-D (mg L ⁻¹)	BAP (mg L ⁻¹)			
	0,0	1,0	2,0	4,0
0,0	0 Cd	25 Cc	40 Cb	60 Ba
1,0	25 Bb	80 Ba	80 Aa	80 Aa
2,0	60 Ab	100 Aa	60 Bb	60 Bb
4,0	60 Ab	80 Ba	50 BCb	25 Cc

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si dentro da mesma coluna, e seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si dentro da mesma linha, pelo teste de Tukey a 5%.

Outras pesquisas relatam a importância desses reguladores. Valle [21], estudando a influência de diferentes concentrações de auxinas e citocininas sobre a formação de calos em explantes foliares de *Piper hispidinervum*, verificou que o cultivo desses explantes em meio contendo 5,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e 10,2 mg L⁻¹ de BAP proporcionou a maior formação de calos. Kelkar e colaboradores [22] e Briskin e colaboradores [23] obtiveram sucesso em concentrações menores quando avaliaram a interação de BAP com 2,4-D e potencializaram a indução de calos em explantes foliares de *Piper methysticum* e *P. colubrinum* realizando subcultivos nas concentrações de 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e 1,0

mg L⁻¹ de BAP, respectivamente. Já Balbuena e colaboradores [11], visando ao estabelecimento de suspensão celular, utilizou explantes de folhas e pecíolos de *P. solmsianum* para calogênese e alcançou maior crescimento de calos (massa fresca) com 0,2 mg L⁻¹ de 2,4-D e 2 mg L⁻¹ de BAP. Porém, Kelkar e colaboradores [22] atingiu 90, 75, 75 e 67% de indução de calos em explantes foliares de *Piper colubrinum*, utilizando 0,04 mg L⁻¹; 0,09 mg L⁻¹; 0,19 mg L⁻¹ e 0,29 mg L⁻¹ de BAP, respectivamente.

Pereira e colaboradores [24] avaliando a indução de calos em explantes foliares de *P. anduncum*, combinou diferentes concentrações de ANA e BAP, obtendo 100% de calos na combinação de 0,9 mg L⁻¹ de BAP

+ 1,0 mg L⁻¹ de ANA. Da mesma forma, Costa e colaboradores [25], ao testarem a influência de auxinas (ANA, AIA, AIB e 2,4-D) na indução de calos primários em explantes foliares e entrenós de *P. hispidinervum* verificaram que a adição da auxina ANA nas concentrações de 2,5 e 5,0 mg L⁻¹ possibilitou os maiores percentuais de formação de calos em explantes foliares, e que o tipo de explante utilizado teve forte influência sobre esta variável. Nessas concentrações de ANA, a formação de calos observada com a utilização de segmentos foliares foi de 83,2% a 91,6%, e valores significativamente inferiores para os segmentos internodais, de 43,1% e 49,6%. Trabalhando também com explantes foliares de *P. hispidinervum*, Santiago [26] avaliou o efeito de combinações de 2,4-D, BAP e ANA, observando uma maior porcentagem de indução de calos, com 98,3% nas combinações de 0,6 mg L⁻¹ de 2,4-D, 0,2 mg L⁻¹ de BAP e 0,05 mg L⁻¹ de ANA.

Delgado-Paredes e colaboradores [27] induziram calos em explantes de folhas e

entrenós de *P. aduncum*, *P. cernuum*, *P. crassinervium* e *P. regnellii*, com diferentes concentrações de AIA (0,05 e 0,5 mg L⁻¹), ANA (0,5 e 1,0 mg L⁻¹), 2,4-D (0,2 mg L⁻¹) e BAP (0,2 mg L⁻¹) e concluíram que a melhor interação de reguladores para a indução de calos foi de 0,5 e 1,0 mg L⁻¹ de ANA + 0,2 mg L⁻¹ BAP em explantes de entrenós, independentemente da espécie de *Piper*.

Na Tabela 2, pode-se observar o efeito das combinações dos reguladores BAP, 2,4-D, ANA e GA₃. Não foi observada calogênese no tratamento onde não houve suplementação com reguladores. A suplementação com 2,4-D (0,1; 0,2 ou 0,4 mg L⁻¹) isoladamente não resultou em indução de calos. A combinação de 2,4-D (0,2 ou 0,4 mg L⁻¹) com BAP (2,0 mg L⁻¹) ou com GA₃ (0,5 mg L⁻¹) resultou em porcentagens variando de 40 a 55%. A utilização de ANA não foi eficiente, causando apenas 33% de indução quando utilizada isoladamente e 25% quando em combinação com 0,2 mg L⁻¹ de BAP.

Tabela 2: Porcentagens de indução de calos em explantes de *P. tuberculatum* submetidos a combinações de 2,4-D (0,0; 0,1; 0,2 e 0,4 mg L⁻¹), BAP (0,0; 0,2 e 2,0 mg. L⁻¹), GA₃ (0,5 mg L⁻¹) e ANA (1,0 mg L⁻¹) após 42 dias de cultivo.

2,4-D (mg L ⁻¹)	BAP (mg L ⁻¹)	GA ₃ (mg L ⁻¹)	ANA (mg L ⁻¹)	Indução de calos (%)
-	-	-	-	0 e
0,1	-	-	-	0 e
0,2	-	-	-	0 e
0,4	-	-	-	0 e
-	2,0	-	-	40 bc
0,1	2,0	-	-	50 ab
0,2	2,0	-	-	55 a
0,4	2,0	-	-	55 a
-	-	0,5	-	0 e
0,1	-	0,5	-	40 bc
0,2	-	0,5	-	50 ab
0,4	-	0,5	-	40 bc
-	0,2	-	-	0 e
-	-	-	1,0	33 cd
-	0,2	-	1,0	25 d

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

A combinação de 2,4-D e GA₃ não promoveu indução de calos em explantes foliares de *P. tuberculatum*. Danelutte e colaboradores [10], visando ao estabelecimento de suspensões celulares de folhas de *P. crassinervium*, obtiveram maior indução de calos utilizando 1,92 mg L⁻¹ de ácido indolacético (AIA) e 2,07 mg L⁻¹ de GA₃, mas não tiveram sucesso com a combinação de 0,02 mg L⁻¹ de 2,4-D e 0,04 mg L⁻¹ de GA₃.

Todas as pesquisas mencionadas, bem como os resultados apresentados por esse estudo, demonstram que para a indução de calos em espécies de *Piper* é necessário que haja um equilíbrio hormonal adequado e que apesar dos grandes avanços na química

sintética, a produção de metabólitos secundários de plantas, por muito tempo, vem sendo feita por cultivo das plantas medicinais. Algumas espécies de plantas comuns não podem ser cultivadas em larga escala devido à sua susceptibilidade a patógenos. Isto tem aumentado o incentivo às técnicas com culturas de células, tecidos e órgãos como uma alternativa para produzir os correspondentes metabólitos secundários *in vitro* [28].

4. CONCLUSÃO

Os resultados indicam que é possível, por meio de técnicas de cultivo *in vitro*,

induzir a formação de calos em explantes foliares de *P. tuberculatum*, o que possibilitará o estabelecimento de suspensões celulares e consequente produção *in vitro* de metabólitos secundários de interesse agrônomo e pecuário. Para a indução de calos em explantes foliares recomenda-se a utilização de meio MS suplementado com 2,0 mg L⁻¹ de BAP + 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D.

5. AGRADECIMENTO

Os autores agradecem à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão de bolsa de Mestrado a Nogueira, W. O.

6. REFERÊNCIAS

- [1] MARTINEZ, S.S. (Ed.). **O nim – *Azadirachta indica*: natureza, usos múltiplos, produção**. Londrina: IAPAR, 2002.
- [2] TAVARES, M.A.G.C. **Bioatividade da erva-de-santa-maria, *Chenopodium ambrosoides* L. (Chenopodiaceae), em relação a *Sitophilus zeamais* Mots., 1855 (Col: Curculionidae)**. (Dissertação) Mestrado em Entomologia - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (Piracicaba), 2002.
- [3] RODITAKIS, E.; VASAKIS, E.; GRISPOU, M.; STAVRAKAKI, M.; NAUEN, R.; GRAVOUIL, M.; BASSI, A. First report of *Tuta absoluta* resistance to diamide insecticides **Journal of Pest Science**, v. 88, n. 1, p. 9-16, 2015.
- [4] SANTOS, M.R.A.; SOUZA, C.A.; PAZ, E.S. Growth pattern of friable calluses from leaves of *Capsicum annuum* var. *annuum* cv. Iberaba Jalapeño. **Revista Ciência Agronômica**, v. 48, n. 3, p. 523-530, 2017.
- [5] SENTHIL-NATHAN, S. Physiological and biochemical effect of neem and other Meliaceae plants secondary metabolites against Lepidopteran insects. **Frontiers in Physiology**, v. 20, p. 1-17, 2013.
- [6] NISHIDA, R. Chemical ecology of insect-plant interactions: ecological significance of plant secondary metabolites. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 78, p. 1-13, 2014.
- [7] MAGEVSKI, G.C.; CZEPAK, M.P.; SCHMILDT, E.R.; ALEXANDRE, R.S.; FERNANDES, A.A. Propagação vegetativa de espécies silvestres do gênero *Piper*, com potencial para uso como porta enxertos em pimenta-do-reino (*Piper nigrum*). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, p. 559-563, 2011.
- [8] NAVICKIENE, H. M. D.; BOLZANI, V. S.; KATO, M. J.; PEREIRA, M. S.; BERTONI, B. W.; FRANÇA, S. C.; FURLAN, M. Quantitative determination of anti-fungal and insecticide amides in adult plants, plantlets and callus from *Piper tuberculatum* by reverse-phase high-performance liquid chromatography. **Phytochemical Analysis**, v. 14 n. 5, p. 281-284, 2003.
- [9] DYER, L.A.; RICHARDS, J.; DODSON, C. Isolation, synthesis, and evolutionary ecology of *Piper* amides. In: DYER, L.A.; PALMER, A.D.N. (Eds.) ***Piper: a model genus for studies of phytochemistry, ecology, and evolution***. New York: Kluwer Academic, p.117-139, 2004.
- [10] DANELUTTE, A.P.; CONSTANTIN, M.B.; DELGADO, G.E.; BRAZ-FILHO, R.; KATO, M.J. Divergence of secondary metabolism in cell suspension cultures and differentiated plants of *Piper cernuum* and *P. crassinervium*. **Journal of the Brazilian**

Chemical Society, v. 16, n. 6b, p. 1425-1430, 2005.

[11] BALBUENA, T.S.; SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V.; KATO, M.J.; FLOH, E.I.S. *In vitro* morphogenesis and cell suspension culture establishment in *Piper solmsianum* C. DC. (Piperaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, n. 1, p. 274-281, 2009.

[12] AHMAD, N.; FAZAL, H.; ABBASI, B.H.; RASHID, M.; MAHMOOD, T.; FATIMA, N. Efficient regeneration and antioxidant potential in regenerated tissues of *Piper nigrum* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.102, p.129-134, 2010.

[13] GUIMARÃES, E.F.; GIORDANO, L.C.S. Piperaceae do nordeste brasileiro I: estado do Ceará. **Rodriguésia**, v. 55, n. 84, p. 21-46, 2004.

[14] ARAÚJO-JÚNIOR, J.X.; CUNHA, V.L.; EMIDIO, C.M.C.; GRAY, A.I. Piperdardine, a piperidine alkaloid from *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 3, p. 559-561, 1997.

[15] SCOTT, I. M. Insecticidal activity of *Piper tuberculatum* Jacq. extracts: synergistic interaction of piperamides. **Agricultural and Forest Entomology**, v. 4, n. 2, p. 137-144, 2002.

[16] NAVICKIENE, H.M.; ALÉCIO, A.C.; KATO, M.J. BOLZANI, V.S.; YOUNG, M.C.M.; CAVALHEIRO, A.J.; FURLAN, M. Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 621-626, 2000.

[17] SILVA, R.V.; NAVICKIENE, H.M.D.; KATO, M.J., BOLZANI, V.S.; MEDA, C.I.; YOUNG, M.C.M.; FURLAN, M. Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v. 59, n. 5, p. 521-527, 2002.

[18] GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; KLERK, G-J.D. Adventitious regeneration. In: ___(eds.) **Plant Propagation by Tissue Culture**. 3rd ed. Dordrecht: Springer, 2008. p. 355-401.

[19] VANISREE, M.; LEE, C.Y.; LO, S.; NALAWADE, S.M.; LIN, C.Y.; TSAY, H.S. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 45, n. 1, p. 1-22, 2004.

[20] MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio-assay with tobacco tissue cultures. **Physiology Plant**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

[21] VALLE, R.C.S.C. **Estratégias de cultivo de células de pimenta longa (*Piper hispidinervium*) e determinação de parâmetros cinéticos**. (Tese) Doutorado em Engenharia Química - Universidade Federal de Santa Catarina (Florianópolis), 2003.

[22] KELKAR, S.M.; DEBOO, G.B.; KRISHNAMURTHY, K.V. *In vitro* plant regeneration from leaf callus in *Piper colubrinum* Link. **Plant Cell Reports**, v. 16, n. 4, p. 215-218, 1996.

[23] BRISKIN, D.; KOBAYASHI, H.; METHA, A.; GAWIENOWSKI, M.; AINSWORTH, L.; SMITH, M.A.L. Production of kavapyrones by Kava (*Piper methysticum*) tissue cultures. **Plant Cell Reports**, v. 20, n. 6, p. 556-561, 2001.

[24] PEREIRA, A.M.S.; BERTONI, B.W.; CARLOS, R.N.; PEREIRA, P.S.; FRANÇA, S.C. Callus culture of *Piper aduncum* for the production of bioactive micromolecules. In: **Latin-American Symposium on the Production of Medicinal, Aromatic and Condiments Plants**, 2000.

[25] COSTA, F.H.S.; LOUREIRO, T.S.; PEREIRA, J.E.S. Influência de auxinas e tipos de explantes na indução de calos friáveis em *Piper hispidinervium* C. DC. **Revista**

Ciência Agrônômica, v. 39, n. 2, p. 269-274, 2008.

[26] SANTIAGO, E.J.A. Caracterização morfológica e bioquímica de calos de pimenta longa (*Piper hispidinervium* Candolle, De Candolle). (Tese) Doutorado em Fitotecnia - Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Lavras (Lavras), 2003.

[27] DELGADO-PAREDES, G.E.; KATO, M.J.; ROJAS-IDROGO, C. Suspensiones

celulares y producción de metabolitos secundários en cultivos *in vitro* de *Piper* sp. **Blacpma**, v. 12, n. 3, p. 269-282, 2013.

[28] FUMAGALI, E.; GONCALVES, R.A.C.; MACHADO, M.F.P.S.; VIDOTI, G.J.; OLIVEIRA, A.B. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n. 4, p. 627-641, 2008.