



Estabelecimento e desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *Quassia amara* L. (Simaroubaceae)

Simone da Silva¹

Submetido 13/04/2015 – Aceito 12/08/2015 – Publicado on-line 25/08/2015

Resumo

Quassia amara L. é um arbusto pertencente à família Simaroubaceae. A cortiça do caule dessa planta contém princípios amargos dos quassinóides (Quassina, neoquassina), esteróides, alcalóides totais, fibras, pectina, sais minerais, dentre outros. É utilizada no combate à flatulência, diarreia, anemia, dispepsia e outras moléstias do estômago, além de ser usada como febrífuga, tônica, no tratamento dos males da vesícula e contra a malária. Além do uso terapêutico, o extrato da planta possui ação inseticida, sendo empregado em papel mata-moscas. A *Quassia amara* é geralmente propagada por sementes, mas com sucesso limitado, pois a baixa viabilidade da mesma restringe a sua propagação. Diante de tal dificuldade, torna-se necessário o estudo de condições adequadas à produção em larga escala destas mudas. Sabendo-se que em diversas espécies, o uso da micropropagação tem possibilitado a obtenção de grande quantidade de mudas livres de doenças e mais homogêneas, em tempo e espaço físico reduzidos, em comparação aos métodos de propagação convencionais, objetivou-se com este trabalho a obtenção de plantas matrizes assépticas, como primeira etapa no desenvolvimento de um protocolo de micropropagação para a quassia. As sementes foram coletadas de uma planta matriz localizada no Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA), em Manaus/AM. O experimento foi instalado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais/CBA, onde os explantes foram cultivados em meio de cultura segundo Murashige & Skoog (MS) e em Wood Plant Medium (WPM), durante 60 dias. A taxa de desinfestação foi de 28% e, das sementes desinfestadas, 83% germinaram. A taxa de multiplicação máxima foi obtida com o meio MS (3,75:1), cujas plântulas atingiram, em média 5,23 cm e 25% de enraizamento.

Palavras-Chave: cultura de tecidos vegetais, micropropagação, produção de mudas e biotecnologia

Abstract

Quassia amara L. is a shrub belonging to Simaroubaceae family. The stem cork of this plant contains bitter principles of quassinoids (Quassin, neoquassin), steroids, total alkaloids, fibers, pectin, and mineral salts, among others. It is used to combat flatulence, diarrhea, anemia, dyspepsia and other stomach disorders, as well as being used as a febrifuge, tonic for the vesicle treatment and malaria. In addition to the therapeutic use, the plant extract has insecticidal activity, being used in flypaper. *Quassia amara* is usually propagated by seeds, but with limited success, because their low viability restricts the propagation. Faced with this difficulty, it is necessary the appropriate conditions study for large scale production of these plants. Knowing that in many species, the micropropagation has been used to obtain a large amount of homogeneous plants and free seedling diseases, in reduced time and physical space, compared to conventional propagation methods, the aim of this work was to obtain aseptic plants, as the first stage in the development of a micropropagation protocol for quassia. The seeds were collected from a matrix plant located in the Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA), in Manaus, AM. The experiments were carried out at the Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais/CBA, where the explants were cultured in culture medium according to Murashige and Skoog (MS) and in Wood Plant Medium (WPM), during 60 days. The disinfection rate was 28% and 83% of this sterilized seeds were germinated. The maximum multiplication rate was obtained with MS medium (3.75:1), and the plants had an average of 5.23 cm and 25% of rooting.

Key-words: plant tissue culture, micropropagation, plant production and biotechnology

¹ Pesquisadora do Centro de Biotecnologia da Amazônia – CBA, Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais – Av. Governador Danilo de Matos Areosa, Nº 690 - Distrito Industrial – CEP 69075-351 – Manaus, AM, Brasil. Correspondência: simonydasilva@gmail.com



1. Introdução

A família Simaroubaceae é constituída por aproximadamente 32 gêneros e 200 espécies, distribuídas em todas as regiões tropicais e subtropicais do globo. No Brasil, está representada pelos gêneros *Quassia* e *Picrolemma*, na região Amazônica; *Castela* e *Picrasma*, no sul do país; *Simaba* e *Simarouba* em quase todas as regiões brasileiras (HALL et al., 1983).

As Simaroubaceae geralmente se apresentam como árvores ou arbustos, tendo como característica marcante um sabor bastante amargo em seu córtex. Assim, muitas espécies dessa família (*Quassia amara*, *Picrasma excelsa*, *Jamaica quassia*) são conhecidas há mais de um século, por conterem substâncias amargas, denominadas de “quassina”, nome emprestado a toda esta classe de compostos estruturalmente relacionados, denominados de quassinóides (POLONSKY, 1973). Estes compreendem um grupo de substâncias naturais quase que exclusivo de espécies das Simaroubaceae, podendo, assim, ser considerado marcador taxonômico desta família (MURGU, 1998; SARAIVA et al., 2006). A presença ou ausência de quassinóides levou alguns gêneros a serem excluídos da família, sendo este um importante parâmetro de classificação taxonômica de Simaroubaceae.

Quassia amara é um arbusto de 4 a 7 m de altura (BERG, 1993), conhecida popularmente pelos nomes de Cedro-branco, Quassia amarga, Pau-tenente, Pau-amarelo e Pau-raposa (IKEGAME & PEREIRA, 2003). Distribui-se pela América Tropical, desde os 18° de latitude N do México até o norte da América do Sul, incluindo a Amazônia (BROWN, 1995; GENTRY, 1993; PÉREZ, 1990; HOLDRIDGE & POVEDA, 1975).

O uso terapêutico desta espécie é conhecido desde o século 18 (CARSON, 1848 in VILLALOBOS et al., 1997), sendo empregada na medicina tradicional para combater a malária, problemas gastrointestinais, inclusive úlcera gástrica, flatulência, diarreia, parasitas intestinais (*Entamoeba histolytica* e *Oxyurus*), desordens do fígado e males da vesícula, inclusive náuseas e manchas da pele causadas por problemas hepáticos, bem como um estimulante de apetite, em cefaléia, tontura, arritmia cardíaca, diabetes, leucemia, como inseticida contra piolhos, em infecções por bactérias, contra anemia e picadas

de cobras (ALCALDE & DEL POZO, 2007; SEGLEAU, 2001; TOMA, 2001; DOU et al., 1996; DUKE, 1994; GIRON et al., 1991; WILKELMAN, 1986; GUPTA et al., 1979; CECCHINI, 1971).

Tanto a madeira como as folhas de *Quassia amara* são utilizadas na medicina e, a escolha da parte dependeria teoricamente do uso pretendido. Assim, a simalikalactona D e a quassimarina encontradas na folha foram relacionadas com a atividade contra a malária e neoplasias. A atividade inseticida foi relacionada à quassina e neoquassina, encontradas principalmente no caule, porém detectadas também nas folhas, especialmente nas folhas jovens (MACEDO et al., 2005).

A *Quassia amara* é geralmente propagada por sementes, mas com sucesso limitado, pois a baixa viabilidade da mesma restringe a sua propagação (MARTIN & MADASSERY, 2005). Além disso, a propagação através de sementes pode trazer variações genéticas que, conseqüentemente, influenciam o teor dos princípios ativos presentes nas plantas.

Para muitas espécies florestais de importância econômica ou que se encontram em extinção, a micropropagação tem sido uma ferramenta útil para a obtenção de mudas mais uniformes em larga escala, em tempo e espaço físico reduzidos (DOUSSEAU et al., 2008). O cultivo *in vitro*, por meio da micropropagação, é um método viável para multiplicação de diversas espécies nativas, proporcionando a formação de populações de plantas homogêneas, possibilitando a produção de mudas com alta sanidade e vigor (SOUZA et al., 2007).

Pelo fato das plantas trabalhadas serem geneticamente padronizadas, pode-se eliminar a interferência da variabilidade genética nos resultados. Conseqüentemente, os resultados obtidos são efeitos das variáveis introduzidas no processo pelo experimentador (SILVA et al., 2007).

Diversos critérios são importantes para o estabelecimento de cultivos *in vitro* como, por exemplo, a escolha do tipo de explante e do meio nutritivo. Embora, teoricamente, qualquer tecido possa ser utilizado como fonte de explante, alguns aspectos devem ser considerados e testados quanto à escolha do mais adequado aos processos morfogênicos de interesse (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Na micropropagação, o uso de métodos eficientes de desinfestação e germinação, *in vitro*, de sementes, permitem a obtenção de plantas assépticas fornecedoras de propágulos livres de contaminantes, os quais podem ser usados para a multiplicação e posterior enraizamento *in vitro* ou *ex vitro* (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Diversas substâncias têm sido utilizadas para a desinfestação de sementes de espécies arbóreas, entre as quais se destaca o hipoclorito (de sódio ou de cálcio), pela facilidade de remoção dos tecidos das sementes durante a lavagem com água, por favorecer a germinação em virtude da capacidade de estimular a atividade da α -amilase e, ainda, pelo fato de promover o rompimento da dormência das sementes de algumas espécies (KANEKO & MOROHASHI, 2003).

Quanto aos meios nutritivos, existem formulações distintas que devem ser ajustadas para cada espécie. O meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) e suas diluições são, costumeiramente, as mais utilizadas. No entanto, existem formulações específicas a determinados grupos de plantas como, por exemplo, o meio WPM (LLOYD & MCCOWN, 1981), mais usual em espécies lenhosas (CALDAS et al., 1998).

Na tentativa de otimizar o crescimento *in vitro* dos tecidos vegetais, diversos estudos propõem a redução ou incremento de alguns macro e/ou micronutrientes que compõem esses meios de cultura, suprimindo melhor as exigências nutricionais de cada espécie, a exemplo dos 23 meios modificados para amoreira-preta (*Rubus* sp.) e videira (*Vitis* sp.) (VILLA et al., 2008, 2009).

Devido à importância desta planta para múltiplos propósitos e à dificuldade de germinação, ações que envolvam a produção de mudas são imprescindíveis para delinear estratégias que visem à conservação, ao manejo sustentável e ao melhoramento genético dessa espécie. Objetivou-se com esse trabalho, avaliar a influência da utilização de dois diferentes meios de cultivo sobre o estabelecimento e desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *Quassia amara*, como primeira etapa no desenvolvimento de um protocolo de micropropagação para a espécie.

2. Material e Método

Sementes de *Quassia amara* coletadas de uma planta matriz no Centro de Biotecnologia da

Amazônia, em Manaus/AM, foram levadas ao Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, onde foram lavadas com detergente líquido (de origem comercial) e água corrente e, posteriormente, imersas em água destilada, autoclavada, por 24 horas. Após este período, as mesmas foram imersas em solução de detergente comercial, durante trinta minutos (sob agitação) e, logo após, em água destilada autoclavada, por vinte minutos.

Em seguida, em câmara de fluxo laminar, foram desinfestadas com lavagens sucessivas em álcool 70% durante 5 minutos, seguida de imersão em hipoclorito de sódio (2% de cloro ativo) por 30 minutos, e lavadas (três vezes) em água destilada estéril, por 5, 5 e 15 minutos.

O tegumento das sementes foi retirado e as mesmas foram inoculadas em tubos de ensaio (150 x 24 mm) contendo 10 mL de meio de cultura semissólido de composição básica segundo MURASHIGE & SKOOG (1962), sem reguladores de crescimento (MS0), suplementado com 3% de sacarose; 4,1 μ M de ácido nicotínico; 0,6 mM de mio-inositol; 2,4 μ M de piridoxina-HCl; 1,5 μ M de tiamina-HCl e solidificado com 2% de phytigel. O pH foi ajustado para 5,8 e os meios foram esterilizados em autoclave a 120 °C e 1,1 Kg/cm², durante 15 minutos.

As culturas foram mantidas no escuro, a 25 \pm 1°C, durante uma semana. Após este período, foram mantidas sob iluminação, com lâmpadas fluorescentes (Sylvania, Phillips/luz do dia) com intensidade de 30,0 μ moles.m⁻².s⁻¹, e 16 horas de fotoperíodo. Foram realizadas observações diárias, sendo avaliado o desenvolvimento e a porcentagem de contaminação.

Quando as plântulas atingiram a altura máxima livre dos tubos de ensaio (8 cm), foram utilizadas como doadoras de explantes para os testes com os meios de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) e WPM (LLOYD & MCCOWN, 1981) (Tabela 1). Cada explante ou fitômero constituiu-se de uma região nodal, sem folhas, com tamanho aproximado de 1 cm.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com dois tratamentos e três repetições, sendo utilizados 30 explantes para cada tratamento, que foram realizados em triplicata. As avaliações foram realizadas após 60 dias de cultivo.

Os dados obtidos quanto ao efeito dos diferentes meios de cultura (MS e WPM) sobre a altura das plântulas, o número de brotos e de

segmentos nodais por broto e a taxa de multiplicação foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey-Kramer, ao nível de significância 5%. Estas análises foram efetuadas utilizando-se o *Graph Pad in Stat*, versão 3,01. Para a análise das porcentagens de germinação e enraizamento, conforme o meio utilizado, foi usado o teste de diferença entre porcentagens (p_1 e p_2) ao nível de 5% de significância utilizando-se o Software Statistica for Windows™, versão 5.0.

Tabela 1 - Composição dos meios de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) e WPM (LLOYD & McCOWN, 1981)

Componentes	MS (mg/L)	WPM (mg/L)
Macronutrientes		
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	96
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	-	556
KH ₂ PO ₄	170	170
KNO ₃	1900	-
K ₂ SO ₄	-	990
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	370
NH ₄ NO ₃	1650	400
Micronutrientes		
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	-
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,25
H ₃ BO ₃	6,2	6,2
KI	0,83	-
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3	22,3
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,25
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	8,6
FeEDTA		
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8	27,8
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,3	37,3
Orgânicos		
Ácido Nicotínico	0,5	0,5
Glicina	2,0	-
Mio-inositol	100	100
Piridoxina.HCl	0,5	0,5
Tiamina	0,1	1,0
Sacarose (g/L)	30	20

3. Resultados e Discussão

Após cinco dias de cultivo, foi observado que 28% das sementes apresentaram-se assépticas, sendo utilizadas para o início da cultura, das quais

83% germinaram (Figura 1). A quebra de dormência tegumentar e a pré-asepsia das sementes possibilitam o estabelecimento *in vitro* de plantas de *Quassia*. O hipoclorito pode ter atuado como estimulante da germinação, em razão da capacidade de estimular a atividade da α -amilase pelo aumento da quantidade dessa enzima na semente, ou ainda, pelo fato de promover a quebra da dormência das sementes em algumas espécies (KANEKO & MOROHASHI, 2003).



Figura 1 - Germinação *in vitro* de *Quassia amara*

As avaliações de desenvolvimento em WPM foram comparadas com as obtidas de plântulas cultivadas em meio MS. Ocorreram diferenças significativas entre os meios de cultura MS e WPM para o comprimento da parte aérea de *Q. amara*, pois, ao utilizar o meio MS obtiveram-se plântulas com altura média de 5,23 cm, enquanto as cultivadas em meio WPM tiveram um crescimento de 1,39 cm (Figura 2 e Tabela 2).



Figura 2 - Cultivo *in vitro* de *Quassia amara* em meio MS



Tabela 2 - Efeitos dos meios de cultura MS e WPM no cultivo *in vitro* de *Quassia amara*

Parâmetros avaliados	MS	WPM
Altura (cm)	5,23 ^a	1,39 ^b
Número de brotos	1,5 ^a	1,28 ^a
Número de segmentos nodais por broto	2,75 ^a	2,66 ^a
Taxa de multiplicação	3,75 ^a	3,05 ^b
Taxa de enraizamento (%)	25 ^a	0 ^b
Taxa de calogênese (%)	100 ^a	67 ^b

LENCINA et al., 2014, ao realizar experimentos com grábia (*Apuleia leiocarpa* Vog. Macbride) observou que não houve diferença significativa entre os meios de cultura WPM, MS e MS ½ para o comprimento da parte aérea, número de folhas e comprimento da raiz, após 15 dias de cultivo.

Em relação à brotação, os resultados obtidos com o meio MS e WPM mostraram-se estatisticamente semelhantes, com produção média de 1,5 e 1,28 brotos, por explante, respectivamente (Tabela 2).

Na micropropagação, plantas que apresentam maior número de segmentos nodais ou gemas axilares são preferidas, ao se considerar que esses tipos de propágulos possuem menor variação somaclonal e epigenética (TORRES et al., 1999). Neste estudo, não houve diferença significativa entre os meios de cultura MS e WPM para o número de segmentos nodais (Tabela 2), indicando que o meio de cultura não influenciou o crescimento *in vitro* das plântulas de quassia. Entretanto, o meio de cultura WPM foi utilizado nos experimentos por causa da sua formulação, que foi desenvolvida especialmente para espécies lenhosas e apresenta 25% das concentrações de íons nitrato e amônia do meio MS (MELO et al., 1999), estimulando o crescimento *in vitro* pelas baixas concentrações de nitrogênio na forma amoniacal (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Além disso, o meio de cultura WPM possui maior quantidade da vitamina tiamina – HCl, se comparado ao meio de cultura MS (Tabela 1). A tiamina é apontada como uma substância benéfica para a multiplicação *in vitro*, possibilitando maior indução de brotos em explantes de espécies arbóreas (MANTOVANI & FRANCO, 1998).

Com relação à taxa de multiplicação, o melhor resultado foi obtido em plântulas cultivadas no meio MS0, onde foi observada a produção de, em média, 3,75 novas plântulas por explante, após 60 dias de cultivo (Tabela 2).

HASSAN et al., 2012, relatam que ao trabalhar com *Eurycoma longifolia*, espécie da mesma família botânica da Quassia, obtiveram maior taxa de multiplicação em MS0 do que em WPM. Em plantas de *Cordia trichotoma*, foi verificado crescimento da parte aérea (1,6 cm) e da raiz (7,3cm) significativamente superior nos cultivos em meio WPM, se comparados àqueles realizados em meio de cultura MS ½ (0,7 e 1,3 cm respectivamente), aos 28 dias de avaliação (FICK, 2007). Comparado ao meio de cultura MS, o meio WPM também se mostrou mais adequado para o estabelecimento *in vitro* de plantas de açoita cavalo (*Luehea divaricata* Mart. & Zucc.), no qual foi observado maior número de segmentos nodais por broto (4,9) e maior enraizamento dos explantes (66,8%), aos 60 dias de avaliação (FLÔRES, 2007).

Quanto ao enraizamento das plântulas, a taxa máxima de enraizamento (28%) foi obtida em meio MS0. Já o meio WPM não promoveu enraizamento, em 60 dias de cultivo (Tabela 2). O enraizamento *in vitro* depende do genótipo da planta, podendo ocorrer naturalmente, durante o processo de micropropagação, de modo que o uso de reguladores de crescimento nos meios de cultura pode ser evitado (GEORGE & SHERRINGTON, 1984). O meio MS ½ foi utilizado na análise do processo de enraizamento *in vitro* de *E. longifolia*, uma vez que foi observado que a concentração de sais minerais mais baixas auxiliam o aumento da percentagem, do comprimento e número de raízes, em outras espécies. No entanto, a reação pode variar entre cultivares da mesma espécie. Foi sugerido que a proporção de compostos de carbono / nitrogênio e nitrogênio no metabolismo das auxinas afeta o processo de enraizamento. Por outro lado, nutrientes limitados podem afetar a produção e desenvolvimento de todo o sistema radicular de plantas *in vivo* (KARHU, 1997).

Quanto à formação de calos, ela ocorreu em todos os tratamentos testados, porém no meio MS foi observada em 100% dos explantes (Tabela 2). A referida taxa de calogênese pode ser atribuída à adaptação dos explantes às condições de cultivo *in vitro*, como relata OLIVEIRA et al., 2000.

A fase de estabelecimento *in vitro*, que antecede as fases do cultivo *in vitro* propriamente dito, é fundamental para o sucesso no desenvolvimento de um sistema de micropropagação, principalmente para espécies



lenhosas nativas. A composição do meio de cultura, em relação aos macro e micro elementos e dos elementos orgânicos, apresenta grande importância e, sendo assim, ao iniciar um processo biotecnológico com células vegetais, deve-se, em primeira instância, estabelecer a formulação adequada do meio que será utilizado (Drapeau *et al.*, 1986).

4. Conclusão

O processo de desinfestação utilizado garantiu a assepsia de 28% das sementes, porém é possível melhorar esta porcentagem, através de novos experimentos relacionados às concentrações e tempos de imersão nos agentes desinfestantes. O meio MS0 pode ser considerado o mais indicado para o desenvolvimento das demais etapas da micropropagação desta espécie, pois neste meio as plantas tiveram uma taxa de multiplicação de 3,75:1, aos 30 dias de cultivo.

Divulgação

Este artigo é inédito e não está sendo considerado para qualquer outra publicação. O autor e revisores não relataram qualquer conflito de interesse durante a sua avaliação. Logo, a revista *Scientia Amazonia* detém os direitos autorais, tem a aprovação e a permissão dos autores para divulgação, deste artigo, por meio eletrônico.

Referências

ALCALDE, M.T.; DEL POZO, A. Vinagre de quassia como tratamento cosmético natural contra los piojos. **Farmacia practica**. Formacion Permanente en Dermofarmacia. OFFARM (Barcelona), v.26, n.3, p.132-133, 2007.

BERG, M.E.V.D. **Plantas Mediciniais na Amazonia: Contribuição ao seu Conhecimento Sistemático**, 2a. Edição. Museu Paraense Emilio Goeldi, Belem, 1993, p. 58-61.

BROWN, N.R. **The autoecology and agroforestry potential of the bitterwood tree *Quassia amara* L. ex Blom (Simaroubaceae)**. 1995. 250 p. Thesis PhD - Cornell University.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformacao genetica de plantas**. Brasilia: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1998. p. 87-132.

CARSON, J. 1848. On Quassia amara, Linnaeus. Am. **Journal of Pharmacology**, v. 20, p. 257-260.

CECCHINI, T. **Enciclopedia de las hierbas y de las plantas medicinales**. Ed. De Vecchi, Barcelona, 1971, 153p.

DOU, J.; KHAN, I.A.; MCCHESENEY, J.D.; BURANDT JR, C. Qualitative and Quantitative High Performance Liquid Chromatographic Analysis of Quassinoids in Simaroubaceae Plants. **Phytochemical Analysis**, v.7, p. 192-200, 1996.

DOUSSEAU, S.; ALVARENGA, A.A.; CASTRO, E.M.; SOARES, R.P.; EMRICH, E.B. Anatomia Foliar de *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nich. (Bignoniaceae) Propagadas *in vitro*, *in vivo* e Durante a Aclimatização. **Ciência Agrotécnica**, v. 2, n. 6, p. 1694-1700, Nov./dez., 2008.

DRAPEAU, D.; BLANCH, H. W.; WILKE, C. R. Growth kinetics of *Dioscorea deltoidea* and *Catharanthus roseus* in batch culture. **Bioengineering and Biotechnology**, v. 28, p. 1555-1563, 1986.

DUKE, J.A. **Amazonian Ethnobotanical Dictionary**. CRC Press, USA, 1994, 181p.

FICK, T. A. Estabelecimento e crescimento *in vitro* de plântulas de Louro-Pardo. **Ciência Florestal**. v. 17. n 4. p. 343-349. 2007.

FLÔRES, A. **Introdução ao cultivo *in vitro* de açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Martius et Zuccarini)**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Curso de Pós-graduação em Engenharia Florestal, Universidade Federal de Santa Maria, 2007, 73p.

GENTRY, A.H. **A field guide to the families and genera of woody plants of northwest South America (Colombia, Ecuador, Peru)**. Conservation International, Washington, p. 783-786, 1993.

GEORGE, E.F., SHERRINGTON, P.D. **Plant propagation by tissue culture: handbook and directory of commercial laboratories**. Exegetics, Basingstokes. 1984, p. 71- 83.

GIRON, L.M.; FREIRE, V.; ALONZO, A.; CACERES, A. Ethnobotanical survey of the medicinal flora used by the Caribs of Guatemala. **Journal of Ethnopharmacology**, v.34, p. 173-187, 1991.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: Torres, A. C.; Caldas, L. S. & Buso, J. A. **Cultura de Tecidos e**



Transformação Genética de Plantas. Brasília, CBAB/EMBRAPA. 1988, v. 1, p. 183-260.

GUPTA, M.P.; ARIAS, T.D.; CORREA, M.; LAMBA, S.S. Ethnopharmacognostic observations on Panamanian medicinal plants. Part. I. **Quarterly Journal of Crude Drug Research**, v.17, p.115-130, 1979.

HALL, I. H.; LEE, K. H.; IMAKURA, Y.; OKANO, M.; JOHNSON, A.; **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 72, 1983, 1282p.

HASSAN, N.H.; ABDULLAH, R.; KIONG, L.S.; AHMAD, A.R.; ABDULLAH, N.; ZAINUDIN, F.; ISMAIL, H.; RAHMAN, S.S.A. Micropropagation and production of eurycomanone, 9-methoxycanthin-6-one and canthin-6-one in roots of *Eurycoma longifolia* plantlets. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 26, p. 6818-6825, 29 March, 2012.

HOLDRIDGE, L.R.; POVEDA, L.J. Arboles de Costa Rica. I. **Palmas, otras monocotiledoneas arboreas y arboles com hojas compuestas o lobuladas.** Centro Cientifico Tropical, San Jose. 1975. p. 432-439.

IKEGAME, A.N.; Pereira, N.A. Atividade hipoglicemiante do cerne da *Quassia-do-Brasil* (*Picrasma crenata* [vell.] engl. - Simaroubaceae). **Revista Brasileira de Farmácia**, 84, n. 2, p. 51-53. 2003.

KANEKO, K; MOROHASHI, Y. Effect of sodium hypochlorite treatment on the development of α -amylase activity in mung bean cotyledons. **Plant Science**, v. 164, p. 287-292, 2003.

KARHU, S.T. Rooting of blue honeysuckle microshoots. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. v. 48, p. 153-159. 1997.

LENCINA, K.H.; BISOGNIN, D.A.; KIELSE, P.; PIMENTEL, N.P.; FLEIG, F.D. Estabelecimento e crescimento *in vitro* de plantas de grápia. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 6, p. 1025-1030, jun, 2014.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of montain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Combined Proceedings of the International Plant Propagator's Society**, v. 30, p. 421-327, 1981.

MACEDO, E.G.; POTIGUARA, R.C.V.; ROCHA NETO, O. Anatomia Foliar de *Quassia amara* L. (Simaroubaceae), uma Espécie Medicinal e Inseticida. **Boletim do Museu Paraense Emilio Goeldi**. Ser. Ciências Naturais, v.1, p. 9-18, 2005.

MARTIN, K.P.; MADASSERY, J. Direct and indirect somatic embryogenesis on cotyledon explants of *Quassia amara* L., an antileukaemic drug plant. **In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**. v. 41, n. 1, p. 54-57, 2005.

MANTOVANI, N.C.; FRANCO, E.T.H. **Cultura de tecidos de plantas lenhosas.** Santa Maria: Centro de Pesquisas Florestais, UFSM, 1998, Serie Técnica, v. 12, 132p.

MELO, N.F. de et al. Estabelecimento do cultivo *in vitro* de aceroleira (*Malpighia emarginata* DC). **Ciência e Agrotecnologia**, v.23, n.1, p. 102-107, 1999.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**. v. 15, p. 473-497, 1962.

MURGU, M. **Metodologia de Análise de Quassinóides: Cromatografia e Espectrometria de Massas.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, SP, Brasil. 1998.

OLIVEIRA, R.P.; GOMES T.S.; VILARINHOS, A.D. Avaliação de um sistema de micropropagação massal de variedades de mandioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 25, p. 2329-2334, 2000.

PÉREZ, E. **Plantas utiles de Colombia.** Ed. Victor Hugo, Medellin, Colombia, 1990, p. 695-697.

POLONSKY, J. **Fortschr. Chem. Org. Nat**, 1973, v. 30, 101p.

SARAIVA, R.C.G.; PINTO, A.C.; NUNOMURA, S.M.; POHLIT, A.M. Triterpenes and a canthinone alkaloid from the stems of *Simaba polyphylla* (Cavalcante) W.W. Thomas (Simaroubaceae). **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 264-268, Mar-Abr, 2006.

SEGLEAU, J. **Plantas medicinales en el tropico humedo**, San Jose, Ed. Guayacan. 2001, p. 102-103.

SILVA, S. *Melissa officinalis* (L.): **Produção Estimulada de Óleos Essenciais nas Culturas in vitro. Testes de Atividade Larvicida do Hidrolato de Plantas Micropropagadas Sobre o Aedes aegypti** L. Tese de Doutorado. 2007, 142p.

SOUZA, J.A. DE; SCHUCH, M.W.; SILVA, L.C. DA; FERRI, J.; SOARES, G.C. Solidificante no meio de cultura e tamanho do explante no



estabelecimento da propagação *in vitro* de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.). **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.13, n.1, p. 115-118, jan-mar, 2007.

TOMA, W. **Atividade analgésica e antiulcerogênica de quatro extratos de diferentes polaridades obtidos a partir das cascas de *Quassia amara* L.** Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, 2001, 122p.

TORRES, A.C. et al. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: EMBRAPA, 1999, v. 2, 517p.

VILLA, F. *et al.* Cloreto de potássio e fosfato de sódio na multiplicação *in vitro* de amoreira preta cv. Tupy. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 1, p. 37-41, 2008.

VILLA, F. *et al.* Micropropagação de duas espécies frutíferas, em meio de cultura DSD1, modificado com fontes de boro e zinco. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 2, p. 468-472, mar./abr., 2009.

VILLALOBOS, R.; CHANG, Y.; MARMILLOD, D.; BEDOYA, R.; LEIGUE, L. 1997. **Desarrollo de criterios silviculturales para el manejo de *Quassia amara*, um producto no maderable del bosque tropical.** In: Simpósio Internacional Possibilidades de Manejo Forestal Sostenible em América Tropical. Santa Cruz de la Sierra, Bolivia, 15-20 jul., p. 1-6.

WILKELMAN, M. Frequently used medicinal plants in Baja California Norte. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 18, p. 109-131, 1986.