



DOLORES ROSALIA MENDOZA CHUMO

**TIPO DE EXPLANTE E REGULADORES DE CRESCIMENTO
VEGETAL NA INDUÇÃO DE CALOS, PRODUÇÃO DE
COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE
EM *Amburana cearensis***

**LAVRAS-MG
2024**

DOLORES ROSALIA MENDOZA CHUMO

**TIPO DE EXPLANTE E REGULADORES DE CRESCIMENTO VEGETAL NA
INDUÇÃO DE CALOS, PRODUÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE EM *Amburana cearensis*.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, área de concentração em Fisiologia Vegetal, da Universidade Federal de Lavras, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Renato Paiva
Orientador

Dr. Afonso Ricardo de Souza
Coorientador

**LAVRAS-MG
2024**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

CHUMO, D M.

Tipo de explante e reguladores de crescimento vegetal na
indução de calos, produção de compostos fenólicos e atividade
antioxidante em *Amburana cearensis*. / DOLORES MENDOZA
CHUMO. - 2024.

61 p.: il.

Orientador(a): Renato Paiva.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2024.

Bibliografia.

1. ABTS. 2 DPPH. 3 Fosfomolibdênio. 4 Calo. 2. I. Renato,
Paiva. II Título.

DOLORES ROSALIA MENDOZA CHUMO

**TIPO DE EXPLANTE E REGULADORES DE CRESCIMENTO VEGETAL NA
INDUÇÃO DE CALOS, PRODUÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE EM *Amburana cearensis***

**EXPLANT TYPE AND PLANT GROWTH REGULATORS ON CALLUS
INDUCTION, PRODUCTION OF PHENOLIC COMPOUNDS, AND ANTIOXIDANT
ACTIVITY IN *Amburana cearensis***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, área de concentração em Fisiologia Vegetal, da Universidade Federal de Lavras, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 2 de agosto de 2024

Dr. Eduardo Valerio De Barros Vilas Boas (UFLA)

Dr. Afonso Ricardo De Souza (CTC)

Dra. Ana Hortencia Fonseca Castro (UFSJ)

Prof. Dr. Renato Paiva
Orientador

Dr. Afonso Ricardo de Souza
Coorientador

**LAVRAS-MG
2024**

AGRADECIMENTOS

Quero expressar meu sincero agradecimento ao Grupo de Cooperação Internacional de Universidades Brasileiras (GCUB) e ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Lavras (UFLA) por me proporcionar a oportunidade de me formar em uma instituição de tanto prestígio. Estendo minha gratidão às agências financiadoras do meu projeto: CAPES, FAPEMIG e CNPq, assim como à UFLA, cujo apoio foi fundamental para a realização da minha pesquisa.

Muito obrigada

RESUMO

Amburana cearensis, espécie nativa do Brasil, é valorizada pela madeira e benefícios medicinais de seus metabólitos. A extração direta desses compostos pode levar à extinção da espécie, tornando a cultura de tecidos uma alternativa eficaz para a produção de metabólitos em ambiente controlado. O objetivo deste estudo foi avaliar o tipo de explante e de reguladores de crescimento vegetal (RCV) na indução de calos, produção de compostos fenólicos e atividade antioxidante em *A. cearensis*. Sementes de *A. cearensis* foram germinadas in vitro e após 30 dias, as plântulas foram seccionadas em quatro tipos de explantes: folha, cotilédono, epicótilo e raiz. Esses explantes foram colocados em meio Murashige-Skoog (MS) com combinações de RCV (Thidiazuron (TDZ) + ácido 1-naftalenacético (ANA) e TDZ + ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)) para a formação e crescimento de calos. Após a indução, os três tratamentos com maior crescimento foram analisados após 30 dias para determinar o teor fenólico total (TPC), o teor total de flavonoides (CTF) e a atividade antioxidante, utilizando os ensaios 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS) e fosfomolibdênio. As combinações de RCV foram eficazes na indução e crescimento de calo. No entanto, as combinações 5 mg L⁻¹ TDZ + 1 mg L⁻¹ ANA (5T+1A), 1 mg L⁻¹ TDZ + 1 mg L⁻¹ ANA (1T+1A), 1 mg L⁻¹ TDZ + 1 mg L⁻¹ 2,4-D (1T+1-2,4D) resultaram em maior ($p \leq 0,05$) massa nos calos de todos os explantes, destacando-se folhas e cotilédones. O calo de epicótilo com a combinação 1T+1A e 1T+1-2,4D apresentou maiores teores ($p \leq 0,05$) de compostos fenólicos, enquanto o cotilédono com as combinações 5T+1A e 1T+1A, maiores teores de flavonoides e cumarina, respectivamente, em comparação com a raiz e a folha. A atividade antioxidante foi muito variável de acordo com o tipo de explante e a combinação de RCV. Nos calos de epicótilo e raiz, não houve relação entre compostos fenólicos e atividade antioxidante. Em contraste, nos calos de folha e cotilédono, assim como na planta de *A. cearensis*, houve correlação com ao menos um método antioxidante (DPPH, ABTS e fosfomolibdênio). Todos os calos, assim como a planta mãe, continham compostos fenólicos e apresentaram atividade antioxidante em diferentes concentrações, o que demonstra sua capacidade de produzir os mesmos compostos que a planta original. Em conclusão, embora não se tenha encontrado uma relação direta entre a atividade antioxidante e os compostos fenólicos, os calos têm compostos fenólicos, incluindo cumarinas e flavonoides, o que os torna potencialmente valiosos para a indústria farmacêutica.

Palavras-chave: ABTS; DPPH; Fosfomolibdênio; calo.

ABSTRACT

Amburana cearensis, a native species of Brazil, is valued for its wood and the medicinal benefits of its metabolites. Direct extraction of these compounds can lead to the species' extinction, making tissue culture an effective alternative for producing metabolites in a controlled environment. The aim of this study was to evaluate the type of explant and plant growth regulators (PGRs) in callus induction, phenolic compound production, and antioxidant activity in *A. cearensis*. Seeds of *A. cearensis* were germinated in vitro, and after 30 days, the seedlings were sectioned into four types of explants: leaf, cotyledon, epicotyl, and root. These explants were placed in Murashige-Skoog (MS) medium with combinations of PGRs (Thidiazuron (TDZ) + 1-naphthaleneacetic acid (ANA) and TDZ + 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)) for callus formation and growth. After induction, the three treatments with the highest growth were analyzed after 30 days to determine total phenolic content (TPC), total flavonoid content (TFC), and antioxidant activity, using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), and phosphomolybdenum assays. The PGR combinations were effective in callus induction and growth. However, the combinations 5 mg L⁻¹ TDZ + 1 mg L⁻¹ ANA (5T+1A), 1 mg L⁻¹ TDZ + 1 mg L⁻¹ ANA (1T+1A), 1 mg L⁻¹ TDZ + 1 mg L⁻¹ 2,4-D (1T+1-2,4D) resulted in the greatest ($p \leq 0.05$) mass of callus from all explants, particularly leaves and cotyledons. The epicotyl callus with the combination 1T+1A and 1T+1-2,4D showed higher ($p \leq 0.05$) levels of phenolic compounds, while the cotyledon with the combinations 5T+1A and 1T+1A showed higher levels of flavonoids and coumarin, respectively, compared to root and leaf. Antioxidant activity varied significantly according to the explant type and PGR combination. In epicotyl and root calluses, there was no correlation between phenolic compounds and antioxidant activity. In contrast, in leaf and cotyledon calluses, as well as in the parent plant of *A. cearensis*, there was a correlation with at least one antioxidant method (DPPH, ABTS, and phosphomolybdenum). All calluses, as well as the parent plant, contained phenolic compounds and exhibited antioxidant activity at different concentrations, demonstrating their ability to produce the same compounds as the original plant. In conclusion, although a direct relationship between antioxidant activity and phenolic compounds was not found, the calluses contain phenolic compounds, including coumarins and flavonoids, making them potentially valuable for the pharmaceutical industry.

Keywords: ABTS; DPPH; Phosphomolybdenum; callus.

INDICADORES DE IMPACTO

O impacto deste estudo é principalmente tecnológico e se enquadra nas áreas de meio ambiente, educação, tecnologia e produção da Política Nacional de Extensão. O estudo demonstra que é possível induzir calos e produzir compostos fenólicos a partir de diferentes explantes de *Amburana cearensis*. Esses achados impulsionam o desenvolvimento de tecnologias de cultivo in vitro para a produção em massa de compostos bioativos de alto valor, como a cumarina, amplamente utilizada nas indústrias farmacêutica e cosmética. Além disso, o estudo pode contribuir para a conservação de *A. cearensis*, ao reduzir a pressão sobre seu habitat natural e promover práticas de conservação. No âmbito educacional, o estudo estimula a inovação em pesquisa e fornece um exemplo prático de aplicações biotecnológicas. Este trabalho está alinhado principalmente com o Objetivo de Desenvolvimento Sustentável (ODS) 12: Produção e Consumo Responsáveis, ao promover métodos de produção mais sustentáveis e diminuir a necessidade de coleta de plantas silvestres, favorecendo um uso mais responsável dos recursos naturais.

IMPACT INDICATORS

The impact of this study is primarily technological and falls within the areas of environment, education, technology, and production as outlined by the National Extension Policy. The study demonstrates the feasibility of inducing callus and producing phenolic compounds from different explants of *Amburana cearensis*. These findings advance the development of in vitro cultivation technologies for the mass production of high-value bioactive compounds, such as coumarin, which are widely used in the pharmaceutical and cosmetic industries. Additionally, the study may contribute to the conservation of *A. cearensis* by reducing pressure on its natural habitat and promoting conservation practices. In the educational realm, the study fosters innovation in research and provides a practical example of biotechnological applications. This work is primarily aligned with Sustainable Development Goal (SDG) 12: Responsible Consumption and Production, by promoting more sustainable production methods and decreasing the need for wild plant collection, thereby encouraging a more responsible use of natural resources.

LISTA DE FIGURA

Figura 1. Efeito da combinação dos reguladores de crescimento 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), TDZ (thidiazuron) e ANA (ácido 1-naftalenacético) na massa fresca do calo de folha, cotilédono, epicótilo e raiz de <i>A. cearensis</i> , após 4 semanas de cultivo.....	33
Figura 2. Influência dos reguladores de crescimento vegetal (RCV) e calos de <i>A. cearensis</i> no teor fenólico total (TPC).....	38
Figura 3. Influência dos reguladores de crescimento vegetal (RCV) e calos de <i>A. cearensis</i> no teor total de flavonoides (CTF)	39
Figura 4. Influência dos reguladores de crescimento vegetal (RCV) e calos de <i>A. cearensis</i> no ABTS (2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)).....	41
Figura 5. Influência dos reguladores de crescimento vegetal (RCV) e calos de <i>A. cearensis</i> no DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil).	42
Figura 6. Influência dos reguladores de crescimento vegetal (RCV) e calos de <i>A. cearensis</i> no fosfomolibdênio.....	43
Figura 7. A cromatografia de HPLC mostra o pico de cumarina (tempo de retenção ~ 25,25) da folha (A), epicótilo (B), calo do cotilédono (1T+1-2,4D) (C), calo da raiz (1T+1-2,4D) (D), calo do epicótilo (1T+1-2,4D) (E) e calo da folha (1T+1-2,4D) (F) de <i>A. cearensis</i>	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tratamentos contendo reguladores de crescimento vegetal (RCV) com diferentes concentrações para indução dos calos.	25
Tabela 2. Porcentagem de indução de calos em explantes de <i>A. cearensis</i> , utilizando diversas combinações de reguladores de crescimento após um mês de cultivo in vitro	30
Tabela 3. Compostos fenólicos e atividade antioxidante de diferentes partes da planta in vitro de <i>A. cearensis</i> com 30 dias de idade.	36
Tabela 4. TPC, CTF e atividade antioxidante (DPPH, ABTS e fosfomolibdênio) em explantes e calos de <i>A. cearensis</i> submetidos a diferentes combinações de reguladores de crescimento vegetal. A: Explantes de folha e calos de folha. B: Explantes de cotilédone e calos de cotilédone. C: Explantes de epicótilo e calos de epicótilo. D: Explantes de raiz e calos de raiz.	44
Tabela 5. Correlação de Pearson entre as variáveis TPC, CTF, DPPH, ABTS e Fosfomolibdênio em explantes e calos de <i>A. cearensis</i>	47
Tabela 6. Cumarina em explantes e calos de <i>A. cearensis</i> submetidos a diferentes combinações de reguladores de crescimento.....	50

LISTA DE IMAGEM

Imagem 1. Aspecto visual de calos de cotilédone, folha e epicótilo e raiz de <i>A. cearensis</i> após 60 dias de cultivo in vitro	35
---	----

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1.	<i>AMBURANA CEARENSIS</i>	15
2.1.1.	Características botânicas	15
2.1.2.	Usos da <i>A. cearensis</i>	15
2.1.3.	Metabólitos especializados em <i>A. cearensis</i>	17
2.2.	COMPOSTOS FENÓLICOS	18
2.3.	FLAVONOIDES	19
2.4.	CUMARINA.....	20
2.5.	BIOSSÍNTESE DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM PLANTAS	20
2.6.	ANTIOXIDANTES	20
2.7.	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE NÃO ENZIMÁTICA.....	21
2.7.1.	Teste DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil).....	21
2.7.2.	Teste ABTS (2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)).....	21
2.7.3.	Método do fosfomolibdênio.....	22
2.8.	REGULADORES DE CRESCIMENTO VEGETAL.....	22
2.9.	INDUÇÃO DE CALOS	23
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1.	LOCALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO.....	24
3.2.	GERMINAÇÃO E OBTENÇÃO DE PLÂNTULAS IN VITRO DE <i>A. CEARENSIS</i>	24
3.3.	INDUÇÃO DE CALOS	24
3.4.	PREPARAÇÃO DE EXTRATO DE CALOS E EXPLANTES DE <i>A. CEARENSIS</i> IN VITRO	26
3.5.	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS.....	26
3.6.	DETERMINAÇÃO DO TEOR TOTAL DE FLAVONOIDES.....	26
3.7.	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	27
3.7.1.	Método de eliminação de radicais livres de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)	27
3.7.2.	Método de eliminação de radicais livres 2,2'-Azino-bis (ácido 3- etilbenzotiazolina-6-sulfônico).....	27
3.7.3.	Método do Fosfomolibdênio	28

3.8.	QUANTIFICAÇÃO DE CUMARINA UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)	28
3.8.1.	Procedimento de extração	28
3.8.2.	Preparação de soluções padrão	29
3.8.3.	Análise HPLC-DAD	29
3.9.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	29
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1.	INDUÇÃO DO CALO	30
4.2.	CRESCIMENTO DO CALO	32
4.3.	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DO CALO	34
4.4.	COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM EXPLANTES E CALOS DE <i>A. CEARENSIS</i>	36
4.5.	ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE VARIÁVEIS	46
4.6.	QUANTIFICAÇÃO DE CUMARINA UTILIZANDO HPLC	49
5.	CONCLUSÕES	52
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

1. INTRODUÇÃO

As plantas com propriedades medicinais e nutricionais são tradicionalmente consideradas como uma das principais fontes de metabólitos especializados e fármacos naturais com propriedades antioxidantes. Esses metabólitos especializados são ingredientes importantes para a produção de diversos cosméticos, fragrâncias, sabores, aditivos alimentares e produtos farmacêuticos e industriais (Yazdanian *et al.*, 2022). Quanto maior o teor de metabólitos especializados ativos encontrado nas plantas, mais são utilizadas na medicina popular e maior é o seu efeito sobre a saúde humana (Mamdouh; Smetanska, 2022).

Amburana cearensis (Allemão) A.C. Sm. (Fabaceae), conhecida popularmente como cumaru, é uma árvore caducifólia amplamente distribuída nas regiões semiáridas do Brasil, estendendo-se até o Paraguai, Argentina e Bolívia (Seleme *et al.*, 2015). Essa espécie é valorizada na medicina popular devido aos benefícios oferecidos por seus extratos, que possuem propriedades antimicrobianas, antinociceptivas, anti-inflamatórias, antioxidantes, neuroprotetoras e miorrelaxantes. Tais propriedades são atribuídas a compostos ativos como a cumarina, flavonoides, amburosídeo e ácido vanílico (De Araújo *et al.*, 2022; Silveira *et al.*, 2022).

Além de seus usos medicinais, a *A. cearensis* também é valorizada por sua madeira, o que levou a uma exploração extensiva da espécie. Infelizmente, essa exploração, combinada com a perda de seu habitat natural, causou uma diminuição significativa no número de indivíduos dessa espécie (Vasconcelos *et al.*, 2019). A produção agrícola em larga escala, ou mesmo a exploração extrativista de espécies arbóreas, visando-se a extração de seus compostos bioativos, é inviável devido ao seu crescimento lento, à disponibilidade limitada de terra cultivável, às populações restritas e, em alguns casos, ao fato de estarem ameaçadas de extinção (Ochoa-Villarreal *et al.*, 2016; Sharma *et al.*, 2011). Além disso, há uma variação no rendimento de metabólitos especializados devido à exposição da planta a diversos fatores abióticos e bióticos, como condições sazonais, climáticas, geográficas, do solo, disponibilidade de água, temperatura, intensidade da luz, infecção por patógenos, etc (Shasmita *et al.*, 2023).

Portanto, a cultura de tecidos é relatada como uma técnica eficaz para a produção de metabólitos especializados em um ambiente controlado (Sagharyan *et al.*, 2020). Entre essas técnicas, a formação de calos tem atraído muita atenção tanto para pesquisa quanto para fins industriais, pois o crescimento dos calos não é afetado por condições sazonais ou climáticas.

Isso permite que sejam acessíveis durante todo o ano, garantindo uma produção contínua e estável de metabólitos (Najhah *et al.*, 2021; Sagharyan *et al.*, 2020).

No entanto, o cultivo de calos às vezes não produz níveis altos em comparação com toda a planta, então novas tecnologias são empregadas para aumentar a produção. Isso envolve inicialmente a seleção de células adequadas, escolhendo um explante apropriado e iniciando o crescimento de calos. Além disso, os reguladores de crescimento também têm um impacto significativo na produção de metabólitos especializados, podendo aumentar ou inibir a síntese de compostos desejados, dependendo da concentração dos reguladores de crescimento (Ibrahim, 2022).

Thidiazuron (TDZ) é um potente regulador de crescimento de plantas (RCV); *in vitro*, é amplamente utilizado para a indução de calos e pode produzir uma grande quantidade de biomassa contendo níveis elevados de compostos fenólicos comercialmente importantes (Khan *et al.*, 2016). No entanto, seu rendimento depende da concentração e também da combinação com outros RCV (Ali *et al.*, 2022). Neste sentido, não há nenhum estudo disponível sobre a indução de calos em *A. cearensis* com TDZ em combinação com outros RCV para a produção de metabólitos especializados. Portanto, é crucial desenvolver uma investigação eficiente para determinar a combinação de RCV e o explante adequado para a maior produção desses compostos.

Por meio da técnica de cultura de tecidos, oferece-se uma alternativa importante para conservação de populações vegetais, permitindo a extração direta de metabólitos especializados dos calos sem sacrificar toda a planta. Isso garante a produção de quantidades suficientes de metabólitos *in vitro*, reduzindo assim a pressão sobre a espécie em seu habitat natural para fins medicinais e contribuindo para sua conservação. Além disso, essa abordagem pode gerar benefícios econômicos por meio de aplicações comerciais. Portanto, o principal objetivo do presente estudo foi avaliar o tipo de explante e dos reguladores de crescimento vegetal na indução de calos, na produção de compostos fenólicos e na atividade antioxidante em *A. cearensis*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Amburana cearensis*

2.1.1. Características botânicas

A. cearensis é uma espécie pertencente à família Fabaceae (Leguminosae Papilionoideae), popularmente conhecida no Brasil como amburana, imburana de-cheiro, umburana-de-cheiro, cerejeira, cumaru (nordeste do Brasil), cumaru-das-Caatingas (Sudeste do Brasil), assim como roble criollo na Argentina, tumi na Bolívia e trébol no Paraguai (Araujo; Dantas, 2018; Melo; Souza; Damasceno, 2014). *A. cearensis* cresce naturalmente na Argentina (Norte), Bolívia (sul), Paraguai (nordeste) e Peru (nordeste) (Carvalho, 2008). No Brasil, essa espécie é encontrada na Caatinga, no Cerrado e nos biomas de floresta tropical do Atlântico (regiões Central e Centro-Oeste). No território brasileiro, a espécie é distribuída em uma faixa altitudinal que varia entre 20 e 800 metros acima do nível do mar (Araujo; Dantas, 2018).

A. cearensis é considerada uma planta caducifólia, que perde suas folhas na estação seca, rebrotando no início da temporada de chuvas (Japiassú *et al.*, 2016). Essa espécie se apresenta como uma árvore de porte médio e caule ereto, capaz de atingir entre 3 a 12 metros de altura e 20 a 50 cm de diâmetro à altura do peito. Suas folhas são compostas, dispostas de forma alternada, imparipinadas, com 7 a 11 folíolos pequenos e ovados que não apresentam ápices agudos. As sementes são achatadas e rugosas, com formas variáveis que podem ser ovais, oblongas ou, em raras ocasiões, arredondadas. Elas têm dimensões que variam de 10 a 20 mm de comprimento e 9 a 13 mm de largura e são equipadas com uma asa lateral, uma fina película de cor amarelo-palha em suas extremidades. Estas sementes emanam um aroma agradável próprio da cumarina e têm um sabor amargo e picante. A germinação é hipógea, com hipocótilo muito reduzido, iniciando-se entre 5 e 30 dias após semeadura e alcançando uma média de 80% de taxa de germinação (Carvalho, 2008).

2.1.2. Usos da *A. cearensis*

A. cearensis é amplamente empregada em carpintaria, perfumaria e para fins farmacêuticos (CANUTO; SILVEIRA; BEZERRA, 2010). Além disso, sua madeira é

empregada em serviços de movelaria, por artesãos e na marcenaria e, as suas sementes, em função do odor agradável exalado, são utilizadas para perfumar roupas (Almeida *et al.*, 2010).

No Brasil, essa espécie é muito utilizada para a fabricação de tonéis para o envelhecimento da cachaça, devido aos seus derivados fenólicos, entre os quais se destaca a cumarina (Santiago *et al.*, 2016). Seu teor é determinante nas características sensoriais desenvolvidas na bebida durante o processo de envelhecimento (Maia; Marinho; Nelson, 2020).

Diferentes partes dessa planta, como a casca do caule, as folhas e as sementes, são amplamente utilizadas na medicina tradicional por meio de chás (Silveira *et al.*, 2022). Essas preparações são usadas para o tratamento de distúrbios do sistema respiratório, como asma, sinusite, bronquite, tosse, rinite, trombose e gripe (Macedo *et al.*, 2018).

A. cearensis é utilizada não apenas para tratar problemas respiratórios, mas também para abordar distúrbios intestinais e inflamatórios. A planta é altamente indicada para inflamação da pele, inflamação da garganta, inflamação ginecológica, cólicas, diarreia, parto placentário, dores de cabeça, trombose, hipertensão, acidez estomacal, úlceras cutâneas, infecções do trato urinário, desidratação, vômitos, dores articulares, tonturas e febre (Macedo *et al.*, 2018; Macêdo *et al.*, 2018). Extratos e componentes derivados de *A. cearensis* demonstraram uma variedade de atividades biológicas, incluindo atividade antimicrobiana, antinociceptivas analgésica, anti-inflamatória, broncodilatadora, antioxidante, neuroprotetora e miorrelaxante, entre outras (Silveira *et al.*, 2022).

A casca do caule, recomendada para tratar problemas respiratórios, é amplamente empregada na medicina tradicional na elaboração de um remédio caseiro conhecido como "lambedor", além de ser usada na produção industrial do fitoterápico "xarope de cumaru" (Canuto; Silveira; Bezerra, 2010). No Estado brasileiro do Acre, os nativos usam partes da casca do caule de *A. cearensis* para preparar um xarope caseiro destinado ao tratamento da tosse e do resfriado, além de usar sementes trituradas para aliviar a dor de dente. Por outro lado, a etnia Chacobo, localizada no Departamento de Beni, Bolívia, prepara uma decocção aquosa a partir da casca do caule de *A. cearensis* para combater os sintomas da febre (Bravo *et al.*, 1999). Enquanto isso, a etnia Tocana (Departamento de La Paz, Bolívia) utiliza a casca na forma de decocções para tratar dores abdominais e renais, e a aplica em forma de banhos para combater o raquitismo (Silveira *et al.*, 2022).

2.1.3. Metabólitos especializados em *A. cearensis*

Vários metabólitos especializados foram isolados de *A. cearensis*, incluindo ácido protocatecoico, ácido vanílico, cumarina, aiapina, amburosídeo A, amburosídeo B, quercetina, isocamMFerídeo, camMFerol, 4'- metoxi-fisetina, afrormosina, 3,4-dihidroxi-benzoato de 6-cumarila, uma mistura de β -sitosterol e estigmasterol glicosilados, além dos biflavonoides (Almeida *et al.*, 2010).

Quimicamente, a casca do caule é principalmente constituída de cumarina, flavonoides (isocamMFerídio, camMFerol e afrormosina) glicosídios fenólicos (amburosídios A e B) e ácidos fenólicos (ácido vanílico e ácido protocatecoico (Canuto; Silveira; Bezerra, 2010).

Em sementes de umburana em estado natural, foi detectada a presença de taninos, alcaloides, cumarinas, flavonoides, triterpenos, esteroides, bem como foram identificados ácido ascórbico, ácido gálico, ácido elágico, catequina, rutina, naringina, miricetina e morina (Aguiar *et al.*, 2017; Costa *et al.*, 2016). Essas sementes são ricas em substâncias capazes de eliminar os radicais livres e representam uma fonte de compostos com propriedades farmacológicas (Aguiar *et al.*, 2017). É importante destacar que há cada vez mais evidências de que os compostos extraídos das sementes de *A. cearensis* constituem uma fonte de novos compostos neuroprotetores, incluindo cumarina, glicosídeos fenólicos e flavonoides. Esses compostos podem ser eficazes no combate a diversas doenças neurodegenerativas, especialmente devido à sua capacidade de reduzir o estresse oxidativo, a inflamação e a morte neuronal induzida pela excitotoxicidade do glutamato (Silva *et al.*, 2020).

Nas folhas de *A. cearensis* também foram identificados compostos fenólicos, como ácido protocatecoico, epicatequina, ácido *p*-cumárico, ácido gálico e quemMFerol (Gouveia *et al.*, 2015). As folhas possuem propriedades antioxidantes e essas atividades podem estar principalmente relacionadas ao seu teor de compostos fenólicos, especialmente taninos e flavonoides (Araujo *et al.*, 2023). O extrato das folhas a uma dose de 50 mg/kg protegeu os ovários de camundongos durante a quimioterapia experimental com cisplatina, preservou a morfologia folicular, inibiu a apoptose e o dano mitocondrial e promoveu a proliferação celular por meio de seus efeitos antioxidantes (Gouveia *et al.*, 2022).

Foram descritas numerosas propriedades farmacológicas de extratos semipurificados e compostos isolados de *A. cearensis* em vários sistemas biológicos, que variam de efeitos antimicrobianos a efeitos anti-inflamatórios. Algumas dessas atividades são atribuídas às cumarinas e aos compostos fenólicos, os principais compostos presentes em *A. cearensis*

(Silva *et al.*, 2020). Oliveira *et al.*, (2020a) demonstraram um possível efeito antibacteriano sinérgico do extrato proteico total das sementes em conjunto com conhecidos medicamentos antibacterianos (norfloxacin, penicilina e gentamicina) contra cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. A fração proteica das sementes exibiu atividade antifúngica contra diferentes espécies de fungos, apresentando um efeito inibitório de até 60% sobre os fungos filamentosos *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum lindemuthianum* (Dos Santos *et al.*, 2010). Farias *et al.*, (2010) determinaram que o extrato aquoso é 100% tóxico para as larvas do mosquito *Aedes aegypti*, o que sugere que a presença de compostos especializados é capaz de atuar como larvicida por meio da inibição das proteases.

De Araújo *et al.*, (2022) indicaram que os compostos bioativos de *A. cearensis*, incluindo cumarina e amburósido, exerceram atividade anti-inflamatória em 6 tipos de células microglicais ativadas por lipopolissacarídeos. Cumarina e amburósido apresentam potencial terapêutico para o tratamento de doenças inflamatórias nas quais a ativação microglial desempenha um papel fundamental, como as doenças neurodegenerativas. Descobriu-se que existe um efeito antiproliferativo em células tumorais humanas de adenocarcinoma de cólon HT-29 e hepatocelular HepG2. Isso é significativo devido ao fato de que os extratos de *A. cearensis* são ricos em cumarinas e possuem alto poder antioxidante (Ferreira *et al.*, 2011). Além disso, também foi demonstrado efeitos antinociceptivos (alívio da dor, inflamação e febre). O teste de toxicidade aguda e a determinação do óleo essencial de *A. cearensis* mostraram que não houve mortalidade em ratos até a concentração de 2000 mg/kg, o que evidencia a relativa segurança do óleo essencial em exposição aguda (De Veras *et al.*, 2023).

2.2. Compostos fenólicos

Os fenóis vegetais são um grupo heterogêneo de metabólitos especializados que incluem quase 10.000 compostos. Os fenólicos são os metabólitos especializados mais amplamente distribuídos que compreendem um grupo funcional hidroxila em um anel aromático (Divekar *et al.*, 2022). Eles são altamente diversos estruturalmente, contendo moléculas simples (vanilina, ácido gálico e ácido cafeico) e polifenóis (estilbenos, flavonoides e polímeros) (Jan *et al.*, 2021). Os principais grupos de compostos fenólicos são as ligninas, taninos, flavonoides, antocianinas e cumarinas (Salam *et al.*, 2023).

A capacidade dos compostos fenólicos de neutralizar radicais livres deve-se à sua habilidade de capturá-los através da transferência do átomo de hidrogênio, transformando-os

posteriormente em uma molécula estável (El Atki *et al.*, 2019). Por outro lado, seu efeito antioxidante deve-se principalmente às suas propriedades redox, que lhes permitem atuar como agentes redutores, sequestradores de oxigênio singlete, quelantes de metais, doadores de hidrogênio e redutores de hemoglobina férrica (Vignesh *et al.*, 2021).

Os metabólitos especializados nas plantas são reconhecidos como a principal fonte de antioxidantes, oferecendo proteção contra os radicais livres reativos e potencialmente combatendo uma variedade de condições de saúde, como câncer, doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, inflamatórias e crônicas (Vignesh *et al.*, 2021). Estudos destacam uma correlação significativa entre a atividade antioxidante e o teor fenólico em várias espécies vegetais, incluindo *Berberis tinctoria*, *Bougainvillea glabra* e *Barleria prionitis* L. (Nasrat; Sakimin; Hakiman, 2022; Ranade; Joshi; Kudale, 2023; Vignesh *et al.*, 2021). Isso ressalta a importância dos fenóis como componentes antioxidantes valiosos encontrados em uma ampla gama de plantas. Uma maior concentração de metabólitos especializados não só contribuiria para uma atividade antioxidante mais eficaz, mas também poderia ter implicações farmacológicas significativas, trazendo benefícios substanciais para a saúde humana (Vignesh *et al.*, 2021).

2.3. Flavonoides

Os flavonoides, um grupo diversificado de compostos fenólicos de baixa massa molecular, são encontrados na forma de fitonutrientes na dieta humana e são onipresentes no reino vegetal (Jan *et al.*, 2021). Mais de 6.000 flavonoides foram identificados. Os membros imediatos da família dos flavonoides incluem flavonas, flavonol, isoflavonas, flavanonas, flavanonol, flavanol e antocianidina (Shahidi; Ambigaipalan, 2015). A estrutura química dos flavonoides geralmente consiste em um esqueleto de 15 carbonos com um anel fenil e um anel heterocíclico. Os flavonoides têm funções vitais na defesa das plantas e nos sistemas de pigmentação (Jan *et al.*, 2021), além de serem bem conhecidos por suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimutagênicas e anticancerígenas e, portanto, tornaram-se um componente importante em aplicações farmacêuticas, nutracêuticas e cosméticas (Shafras; Sabaragamuwa; Suwair, 2024).

2.4. Cumarina

A cumarina (2H-benzopirano-2-ona) é uma classe de compostos fenólicos simples que consiste em uma substância fenólica produzida a partir da fusão de um anel de benzeno e um anel de α -pirona (Jan *et al.*, 2021). Esses compostos são comuns em plantas vasculares, com aproximadamente 1.300 tipos identificados, e desempenham um papel defensivo contra herbívoros e fungos (Shiade *et al.*, 2024). A molécula de cumarina e seus compostos relacionados têm sido avaliados por uma variedade de propriedades farmacológicas, tais como atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, antidiabética e antioxidante (Randelović; Bipat, 2021).

2.5. Biossíntese de compostos fenólicos em plantas

Os compostos fenólicos são produzidos principalmente pela rota do chiquimato, também conhecida como via fenilpropanoides. No entanto, a fonte dos compostos iniciais nas vias sintéticas é, obviamente, o metabolismo primário: a glicólise, a formação de acetil-CoA e a via das pentoses fosfato. O fosfoenolpiruvato, oriundo da glicólise, se condensa com a eritrose-4-fosfato, da via alternativa das pentoses fosfato, dando origem em última instância ao ácido chiquímico, que dá nome à rota. Assim, fenilalanina, tirosina e triptofano são sintetizados na via metabólica primária do chiquimato, sendo a primeira o principal aminoácido aromático produzido. A fenilalanina amônia liase, enzima chave na rota fenilpropanoides, catalisa a transformação da fenilalanina em ácido *trans*-cinâmico, precursor dos demais derivados fenólicos. A rota do chiquimato também é conhecida como via fenilpropanoides, pois os compostos produzidos apresentam a estrutura fenil-propano (C₆C₃). O *p*-cumaroil CoA, um dos derivados do ácido cinâmico, pode se unir ao produto da condensação de três moléculas de ácido malônico, dando origem à estrutura C₆C₃C₆, típica dos flavonoides. Compostos de outras vias, como a via do mevalonato, podem participar da síntese de alguns fenólicos (Kolton *et al.*, 2022; Shiade *et al.*, 2024).

2.6. Antioxidantes

Os antioxidantes inibem ou retardam reações de oxidação indesejadas, atuando como doadores de hidrogênio ou aceptores de radicais livres, gerando radicais mais estáveis e,

assim, prevenindo o estresse oxidativo relacionado com doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, bem como o câncer (Apak, 2019; Munteanu; Apetrei, 2021).

Os antioxidantes são categorizados como enzimáticos ou não enzimáticos com base no seu mecanismo de eliminação. Os antioxidantes enzimáticos decompõem os produtos oxidativos em peróxido de hidrogênio e água na presença de cofatores, enquanto os antioxidantes não enzimáticos funcionam interrompendo a reação em cadeia dos radicais livres (Shafra; Sabaragamuwa; Suwair, 2024). Entre eles, existem vários compostos com diferentes modos e locais de ação e diferentes efeitos finais. Entre os antioxidantes enzimáticos estão enzimas superóxido dismutase (SODs), catalase (CAT), glutational peroxidase (GPx), glutational redutase (GRd), e peroxiredoxina (Prxs) (Flieger *et al.*, 2021). Entre os antioxidantes não enzimáticos estão minerais (Zn, Mn, Fe, Se, Cu), vitaminas (A, C, E), carotenoides (β -caroteno, licopeno, luteína), alcaloides e compostos fenólicos (flavonoides, ácidos fenólicos, cumarinas, ligninas), glutational, tiorredoxina, peroxirredoxinas, ácido úrico e coenzima Q (Munteanu; Apetrei, 2021).

2.7. Atividade antioxidante não enzimática

2.7.1. Teste DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

A atividade de eliminação do radical DPPH é considerada a atividade antioxidante que explora a capacidade do extrato vegetal de doar elétrons/hidrogênio (Prakash *et al.*, 2023). O teste de neutralização DPPH baseia-se na doação de elétrons dos antioxidantes para neutralizar o radical DPPH. A reação é acompanhada pela alteração da cor do DPPH medida em 517 nm e o grau de descoloração indica o potencial eliminador do extrato antioxidante (Munteanu; Apetrei, 2021).

2.7.2. Teste ABTS (2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico))

O teste avalia a capacidade dos antioxidantes de eliminar o cátion radical estável $\text{ABTS}^{\bullet+}$ (2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)). O branqueamento de uma solução pré-formada do cátion radical azul-verde $\text{ABTS}^{\bullet+}$ tem sido amplamente utilizado para avaliar a capacidade antioxidante de misturas complexas e compostos individuais e pode ser

facilmente visualizada seguindo o decaimento da absorbância da amostra em 734 nm (Christodoulou *et al.*, 2022; Gulcin, 2020).

2.7.3. Método do fosfomolibdênio

Este ensaio depende da capacidade de um agente redutor (antioxidante) de converter fosfato-molibdênio (VI) em fosfato-molibdênio (V) que forma uma cor verde estável que é lida espectrofotometricamente à 695 nm (Rajput; Agrawal, 2020; Siddeeg *et al.*, 2021).

2.8. Reguladores de crescimento vegetal

Os reguladores de crescimento vegetal (RCV) são definidos como compostos orgânicos sintéticos que afetam o desenvolvimento ou o metabolismo das plantas superiores em concentrações muito baixas (Yan *et al.*, 2024). Os RCV são classificados em várias classes distintas, como auxinas, citocininas, óxido nítrico, brasinoesteroides, giberelinas, ácido salicílico, ácido abscísico, jasmonato e etileno (Quamruzzaman *et al.*, 2021).

As auxinas são usadas em cultura de tecidos para estimular a formação de calos, raízes e para promover o crescimento e a divisão celular. Por outro lado, as citocininas promovem a divisão celular, o crescimento e o desenvolvimento da planta. Acredita-se que o uso de citocininas influencie a formação de calos, diminuindo as lignificações da parede celular e aumentando assim a iniciação e o desenvolvimento de calos (Dar *et al.*, 2021). Quando combinados, esses hormônios vegetais estimulam o crescimento e a divisão celular, o que afeta a síntese de proteínas, o crescimento do calo e a produção de compostos especializados (Mayerni *et al.*, 2020). Estudos têm mostrado que a combinação de citocininas e auxinas resulta em melhores resultados do que o uso isolado de auxinas ou citocininas (Dar *et al.*, 2021).

O ácido auxínico 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) é um dos compostos mais utilizados para a produção de calos *in vitro*. Ele é altamente eficiente na indução e proliferação de calos, e sua ação pode ser intensificada pela combinação com citocininas (De Oliveira; Sartoratto; Cardoso, 2020). Thidiazuron (N-fenil- N'-1,2,3-tiadiazol-5-ilureia-TDZ) é um composto de fenil ureia substituída que pode atuar como citocinina e auxina quando administrado em uma concentração específica e sob condições específicas (Ali *et al.*, 2022). No caso do arroz, foi demonstrado que a indução de calos bem-sucedida é alcançada usando apenas 2,4-D ou em

combinação com ácido 1-naftaleno acético (ANA) (Binte Mostafiz; Wagiran, 2018). Também foi observada uma produção ideal de calos em explantes de *Aconitum balfourii* quando se utiliza TDZ em combinação com ANA (Gondval; Chaturvedi; Gaur, 2016) .

Além do crescimento do calo, a proporção de citocininas e auxinas pode afetar as vias metabólicas, regulando diretamente a expressão dos genes e a atividade das enzimas dentro das células vegetais. Essas mudanças levam à síntese de metabólitos especializados, portanto, os pesquisadores frequentemente conduzem experimentos de triagem para confirmar a proporção que produz o máximo de produtos fitoquímicos. Essas descobertas reforçam a importância de selecionar a concentração apropriada de RCV para cada sistema de cultura durante o cultivo celular, mesmo dentro do mesmo gênero (Zhang *et al.*, 2024). É fundamental conhecer a concentração adequada de RCV, pois podem aumentar a atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (PAL), levando ao subsequente acúmulo de metabólitos especializados (Sagharyan *et al.*, 2020). PAL é a enzima estratégica que inicia a via de biossíntese dos fenilpropanóides nas plantas, servindo como precursor da síntese de fenilpropanóides, como ligninas, flavonoides e cumarinas (Schuster; Rétey, 1995). Assim, o tratamento com RCV em cultura pode aumentar os níveis de expressão de vários genes responsáveis pela produção de fenóis, flavonoides e atividade antioxidante, levando a uma maior produção de metabólitos especializados (Vrundha; Thomas, 2023).

2.9. Indução de calos

As plantas têm a capacidade de gerar massas celulares desorganizadas, como calos ou tumores, em resposta a estresses como feridas ou infecções por patógenos (Ikeuchi; Sugimoto; Iwase, 2013), para proteger o tecido de danos maiores (Mastuti; Munawarti; Firdiana, 2017). A indução de calos é a formação de uma massa de células indiferenciadas que têm a capacidade de crescer e se tornar uma planta completa. Em algumas técnicas *in vitro*, os tecidos são inicialmente cortados como explantes, resultando em uma resposta à ferida. A atividade bioquímica principal para curar essa ferida é a síntese de compostos fenólicos, que fortalecem a parede celular por meio da indução da via fenilpropanoides. Portanto, a ferida inicia um processo de desenvolvimento complexo, que inclui a desdiferenciação de tecidos em estado quiescente, a indução da divisão celular, a rediferenciação e, finalmente, o retorno à quiescência. Essa série de processos de tratamento de feridas (diferenciação e proliferação do calo) é necessária durante a iniciação de culturas de calos (Bloch, 1952; Mastuti;

Munawarti; Firdiana, 2017). A proliferação de células vegetais em estruturas amorfas, friáveis ou compactas com capacidade regenerativa completa é denominada calo, que se forma sob um tratamento específico de RCV (Nandy *et al.*, 2020).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Localização do experimento

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas (LCTP-UFLA) do Setor de Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia e no Laboratório de Pós-Colheita de frutas e hortaliças do Departamento de Ciência de Alimentos na Universidade Federal de Lavras (UFLA).

3.2. Germinação e obtenção de plântulas *in vitro* de *A. cearensis*

Para a germinação, as sementes foram submersas em água destilada por 10 minutos e depois em ácido sulfúrico por cinco minutos. Posteriormente, as sementes foram colocadas na câmara de fluxo laminar e desinfetadas em etanol 70% por um minuto, seguido de formaldeído a 30% durante 10 minutos. Finalmente as sementes foram enxaguadas três vezes com água destilada estéril.

Após desinfecção em câmara de fluxo laminar, as sementes foram inoculadas em frascos de vidro (7x7x8.9cm) contendo 50 ml de meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), acrescido com 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-Inositol e 2,5 g L⁻¹ do agente gelificante Phytigel®. O pH foi ajustado para 5,8 ± 0,2 antes do processo de autoclavagem a 120°C por 20 minutos. As culturas foram mantidas em sala de crescimento por um período de 30 dias, com temperatura de 25±1°C, sob fotoperíodo de 16 horas e radiação fotossintética ativa de 60µmolm⁻²s⁻¹ obtidas a partir de lâmpadas brancas fluorescentes.

3.3. Indução de calos

Trinta dias após a germinação, as plantas foram seccionadas com um bisturi na câmara de fluxo laminar para obter quatro tipos de explantes: folha, cotilédone, epicótilo e raiz. Os

explantes de cotilédone foram seccionados em aproximadamente 1 cm² de tamanho e a folha em 0.5 cm², enquanto o epicótilo e raiz foram cortados em aproximadamente 1 cm de comprimento. Os segmentos foram inoculados na posição horizontal em tubos contendo 15 ml de meio MS fornecido com 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-Inositol e 2.5 g L⁻¹ do agente gelificante Phytigel[®]. Um meio sem regulador foi empregado como controle, enquanto os tratamentos foram suplementados da seguinte maneira:

Tabela 1. Tratamentos contendo reguladores de crescimento vegetal (RCV) com diferentes concentrações para indução dos calos.

Tratamento	TDZ (mg L⁻¹)	ANA (mg L⁻¹)	2.4 D (mg L⁻¹)
1	5	1	
2	5		1
3	1	5	
4	1		5
5	1	1	
6	1		1
7		1	5
8		5	1
9		1	1

Notas: As abreviações correspondem a TDZ - thidiazuron, ANA - ácido 1-naftalenacético e 2,4-D - ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

Cada tratamento consistiu de 5 repetições com 3 explantes por repetição, sendo cada explante colocado em um tubo. Os meios foram esterilizados em autoclave a 120 °C por 20 minutos. Durante a fase de estabelecimento e crescimento do calo, o material foi submetido a 30 dias em ausência de luz. Após 30 dias de cultivo, foram registrados a indução do calo (%) e a sua massa fresca (mg).

A indução de calo foi avaliada visualmente conforme a ausência ou presença de calo. Para registrar a massa do calo, os tubos de ensaio com meio foram pesados individualmente, em seguida, os calos foram colocados e transferidos para os tubos de ensaio previamente pesados com meio fresco. Os tubos de ensaio foram pesados novamente e a diferença entre as duas medidas foi registrada como a massa do calo por explante.

Os três tratamentos que apresentaram o maior crescimento de calos nos diferentes tipos de explantes foram selecionados para continuar o cultivo por mais 30 dias em uma sala com temperatura de 25±1°C e fotoperíodo de 16 horas, com o objetivo de avaliar as características morfológicas (cor e textura), os compostos fenólicos e a sua atividade

antioxidante. Além disso, plantas de *A. cearensis* cultivadas in vitro durante 30 dias foram divididas em quatro partes: epicótilo, cotilédone, folha e raiz, para investigar os níveis de compostos fenólicos e a atividade antioxidante de cada uma desses explantes.

3.4. Preparação de extrato de calos e explantes de *A. cearensis* in vitro

Os calos e partes da planta de *A. cearensis* foram macerados com nitrogênio líquido para obter um pó. Em seguida, 200mg desse pó foram pesados em tubos Eppendorf de 2 ml. O extrato foi preparado a partir das amostras em pó usando 350 µl de etanol em diferentes concentrações (100%, 80% e 50%) em um banho a 70-75°C por 20 minutos. Depois, as amostras foram centrifugadas à 4°C, 14.000 RPM por 5 minutos para cada concentração, resultando em aproximadamente 1,05 ml de extrato. Todos os extratos preparados foram armazenados em tubos Eppendorf de 2,0 ml e mantidos na geladeira a -80°C para uso posterior.

3.5. Determinação do teor de fenólicos totais

O teor de fenólicos totais dos extratos foi determinado conforme descrito por Zitha *et al.*, (2022). Em um leitor de microplacas de 96 poços (EZ READ 2000, Biochrom, EUA), foram adicionados 30 µL de extrato, com 150 µL do reagente Folin-Ciocalteu (10%, v/v) e 120 µL de carbonato de sódio (4%, p/v). Todas as medições foram feitas em triplicata. A mistura foi agitada e incubada no escuro por 2 horas. Após a incubação, a absorbância foi medida à 720 nm. Os resultados foram expressos como equivalentes em miligramas de ácido gálico por grama de massa fresca da amostra (mg GAE g⁻¹ MF).

3.6. Determinação do teor total de flavonoides

O teor de flavonoides foi determinado de acordo com Savi *et al.*, (2017) com adaptações. Em um leitor de placas de 96 poços (EZ READ 2000, Biochrom, EUA), foram adicionados 150 µL do extrato com 150 µL de cloreto de alumínio a 2% (p/v). Todas as medições foram realizadas em triplicata. Após 60 minutos no escuro, a absorbância foi

determinada à 415 nm. Os resultados foram expressos como equivalentes em miligramas de quercetina por grama de massa fresca da amostra (mg QE g⁻¹ MF).

3.7. Determinação da atividade antioxidante

3.7.1. Método de eliminação de radicais livres de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

A avaliação da capacidade de eliminação do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) foi realizada conforme o método descrito por Brand-Williams *et al.*, (1995), com algumas adaptações. Uma alíquota de 0,3 ml do extrato de cada amostra foi misturada com 3,7 ml de solução de DPPH em etanol (100%) e armazenada no escuro sob temperatura ambiente por 60 minutos (tempo para as reações atingirem um platô). Posteriormente, a absorbância foi medida à 515 nm utilizando um leitor de microplacas (EZ READ 2000, Biochrom, EUA). Todas as medições foram realizadas em triplicata. A capacidade de eliminar o radical DPPH, expressa em porcentagem, foi calculada em relação ao controle (3,7 ml de solução de DDPH em etanol 100%), conforme a seguinte equação:

$$\% \text{ Redução DPPH} = \frac{\text{Abs controle} - \text{Abs amostra}}{\text{Abs controle}} \times 100$$

3.7.2. Método de eliminação de radicais livres 2,2'-Azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)

A avaliação da capacidade de eliminação do radical livre 2,2'-Azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS) foi conduzida de acordo com o método descrito por Re *et al.*, (1999), com adaptações. O cátion radical ABTS (ABTS^{•+}) foi gerado pela reação entre uma solução de ABTS 7 mM e uma solução de persulfato de potássio 2,45 mM em proporções iguais, deixando-as reagir por 12 horas no escuro à temperatura ambiente. A solução de ABTS foi diluída em etanol (100%) até atingir uma absorbância de 0,706 a 734 nm. Utilizando um leitor de microplacas de 96 poços (EZ READ 2000, Biochrom, EUA), 30 uL do extrato de cada amostra foi misturado com 270 uL do reagente ABTS. Após 6 minutos, a absorbância foi medida a 734 nm com o leitor de microplacas (EZ READ 2000, Biochrom, EUA). Todas as medições foram realizadas em triplicata. A capacidade de eliminação do

radical ABTS, expressa em porcentagem, foi calculada em relação ao controle (solução ABTS diluída em etanol (70%)), conforme a seguinte equação:

$$\% \text{ Redução ABTS} = \frac{\text{Abs controle} - \text{Abs amostra}}{\text{Abs controle}} \times 100$$

3.7.3. Método do Fosfomolibdênio

A atividade antioxidante das diferentes amostras foi avaliada pelo método de produção do complexo verde de fosfomolibdênio, conforme o método descrito por Rafiquzzaman *et al.*, (2016), com algumas modificações. Os reagentes utilizados para o teste de fosfomolibdênio compreendem uma solução estoque contendo ácido sulfúrico 0,6 M, fosfato de sódio 28 mM e molibdato de amônio 4 mM, que foi armazenada no escuro.

Em tubos de ensaio, foram adicionados 0,5 mL do extrato da amostra e 1,5 mL da solução estoque de fosfomolibdênio. Um branco foi preparado com 1,5 mL da solução reagente e 0,5 mL do solvente utilizado na amostra (etanol 100%). Os tubos foram selados e incubados a 95°C por 90 minutos em banho-maria. Após a incubação, as amostras foram resfriadas à temperatura ambiente, e a absorbância de cada uma foi medida à 695 nm. Utilizou-se ácido ascórbico como padrão de referência. A atividade antioxidante foi expressa como equivalentes em miligramas de ácido ascórbico por grama de massa fresca (mg AAE g⁻¹ MF).

3.8. Quantificação de cumarina utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

3.8.1. Procedimento de extração

Amostras de calos em pó (2 g) foram colocadas em tubos Eppendorf de 5 mL e extraídas com 5 mL de uma solução de metanol/água (80:20 v/v) por sonicação simples (500 W, 40 kHz) durante 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, os extratos foram centrifugados a 6.500 rpm por 10 minutos. As soluções amostrais foram filtradas com um filtro de seringa de 0,22 µm e as amostras filtradas foram coletadas e armazenadas a -80 °C até seu posterior uso.

3.8.2. Preparação de soluções padrão

Uma solução estoque padrão de cumarina (Sigma®) com uma concentração de 10 mg L⁻¹ foi preparada separadamente usando metanol/água (80:20 v/v). A partir desta solução estoque, foram preparadas seis concentrações de 0,125, 0,5, 1, 3, 5 e 10 mg L⁻¹. A cumarina foi expressa em microgramas por grama de massa fresca da amostra (µg g⁻¹ MF), correlacionando a área do analito com a curva de calibração do padrão. A solução foi armazenada à 4 °C antes do uso.

3.8.3. Análise HPLC-DAD

Os extratos foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência com detetor de arranjo de fotodiodos (HPLC-DAD) (Shimadzu, Japao). A separação cromatográfica foi realizada em coluna Wondasil™ C18 de fase reversa (5 µm, 200 mm × 4,6 mm, Shimadzu, Japão). Foram utilizadas duas fases móveis: fase móvel A (água com 1% v/v de ácido fórmico) e fase móvel B (acetonitrila), em gradiente com fluxo de 1,0 ml/min: 0–20 min: 10% B; 20–45 min: 90% B. O volume da injeção foi de 20 µL. Após cada injeção, a coluna foi equilibrada por 15 minutos. Para a análise quantitativa, foi utilizado o comprimento de onda de maior intensidade (278 nm). Além disso, os espectros UV/Vis entre 235 e 600 nm foram registrados para verificar a identidade dos picos do padrão e a pureza dos picos.

3.9. Análise Estatística

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado. Os resultados foram apresentados como valores médios e erros padrão de cinco repetições para massa fresca do calo, quatro repetições biológicas (extratos) para fenólicos totais, flavonoides totais e atividade antioxidante (DPPH, ABTS, Fosfomolibdênio) e três repetições para cumarina. Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e homogeneidade pelo teste de Levene. Os dados que não apresentaram normalidade foram transformados a raiz quadrada. A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para determinar se os grupos diferiam significativamente, e as médias dos tratamentos foram

comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância ($p < 0,05$). Foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson entre os ensaios de TPC, CTF, DPPH, ABTS e Fosfomolibdênio. Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando o software R 4.2.3.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Indução do calo

Estudos relativos à *A. cearensis* sobre o efeito da combinação dos reguladores de crescimento vegetal (RCV) TDZ-ANA e TDZ-2,4-D nas respostas da cultura, indução e crescimento de calos, teor de fenólicos totais (TPC) e flavonoides totais (CTF) e atividade antioxidante não existem na literatura científica. Uma combinação de auxinas e citocininas no meio de cultura é normalmente necessária para a indução de calos, mas as concentrações relativas de RCV dependem da espécie, do tecido vegetal e de outras condições de cultura *in vitro* (Valenzuela-Atondo *et al.*, 2020).

A formação de calos de *A. cearensis* foi influenciada pelo tipo de explante (folha, cotilédone, epicótilo e raiz) e pelos RCV. Após 30 dias da inoculação dos explantes, observou-se que o percentual de formação foi de 80% a 100% para cotilédone, 40% a 80% para epicótilo, 70% a 100% para folha e de 20% a 100% para raiz (Tabela 2). Os RCV foram fundamentais para a indução dos calos, visto que nenhuma formação foi observada no tratamento controle (MS sem RCV). Cotilédone e folha se destacaram com os maiores percentuais de formação de calos, a despeito da combinação de RCV utilizada. No caso da raiz, o único tratamento que induziu 100% da formação de calos foi 5 mg L⁻¹ TDZ + 1 mg L⁻¹ ANA (5T+1A), enquanto indução de 70 a 80% foi observada em outros quatro tratamentos. Indução máxima de 80% foi observada para o epicótilo, em quatro dos dez tratamentos.

Tabela 2. Porcentagem de indução de calos em explantes de *A. cearensis*, utilizando diversas combinações de reguladores de crescimento após um mês de cultivo *in vitro* (Continua)

Reguladores de crescimento (mg L ⁻¹)			Indução de calos por tipos de explante (%)			
TDZ	ANA	2,4 D	Cotilédone	Epicótilo	Folha	Raiz
0	0	0	0	0	0	0
5	1	0	100	80	100	100
5	0	1	100	50	100	70

Tabela 2. Porcentagem de indução de calos em explantes de *A. cearensis*, utilizando diversas combinações de reguladores de crescimento após um mês de cultivo in vitro
(Conclusão)

Reguladores de crescimento (mg L ⁻¹)			Indução de calos por tipos de explante (%)			
TDZ	ANA	2,4 D	Cotilédone	Epicótilo	Folha	Raiz
1	5	0	100	80	100	70
1	0	5	100	50	80	30
1	1	0	100	80	100	80
1	0	1	100	80	100	80
0	1	5	80	40	80	20
0	5	1	100	0	70	0
0	1	1	80	0	80	0

Notas: As abreviações correspondem a TDZ - thidiazuron, ANA - ácido 1-naftalenacético e 2,4-D - ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

As auxinas ANA e 2,4-D combinadas, respectivamente, nas concentrações 5mg + 1mg e 1mg + 1mg, não induziram a formação de calos em epicótilo e raiz. No entanto, a combinação de 1 mg L⁻¹ ANA + 5 mg L⁻¹ 2,4-D induziu a formação de calos em ambos explantes, embora em baixo percentual, 40 e 20%, respectivamente. Esses resultados reforçam os de Dar *et al.*, (2021), que observaram que a combinação de 2,4-D e ANA reduziu a incidência de iniciação de calos nas raízes de *Atropa acuminata* Royle ex Lindl..

As diferenças observadas na indução de calos em diferentes explantes de *A. cearensis* pode estar relacionada com a concentração de fitohormônios presentes em cada tecido. Cada explante tem um comportamento diferente quando se adiciona um regulador de crescimento externo, o que afeta sua capacidade de desenvolver calos. A indução de calos a partir de explantes varia significativamente devido à diferença na combinação de reguladores de crescimento dentro da mesma espécie (Prakash *et al.*, 2023). Os hormônios endógenos desempenham um papel importante na desdiferenciação de explantes de plantas para formar calos, e os reguladores de crescimento exógenos devem ser racionalmente otimizados para que os níveis de hormônios endógenos e exógenos atinjam um equilíbrio dinâmico moderado para promover a formação de calos (Tang *et al.*, 2022).

Enquanto que em *A. cearensis* os melhores explantes para induzir calos foram cotilédones e folhas, em outras espécies os resultados podem ser diferentes. Em *Lycium barbarum* L., o explante que mostrou maior calogênese foi o hipocótilo (Karakas, 2020). Na

espécie *Nepeta binaloudensis* Jamzad, os explantes foliares apresentaram maior indução de calos (Sagharyan *et al.*, 2020). Em *Paeonia lactiflora* Pall., o explante ideal foi o cotilédone (Duan *et al.*, 2022).

Em *A. cearensis*, os explantes de raiz e epicótilo estavam em uma etapa intermediária de desenvolvimento, ou seja, suas células já estavam diferenciadas, o que torna mais difícil a desdiferenciação celular. Em contraste, os explantes de folha e cotilédone estavam na etapa inicial de desenvolvimento, o que aumentou a proliferação de calos. Duan *et al.*, (2022) afirmam que essa diferença ocorre porque os explantes em estágio inicial de crescimento e desenvolvimento têm células meristemáticas mais ativas.

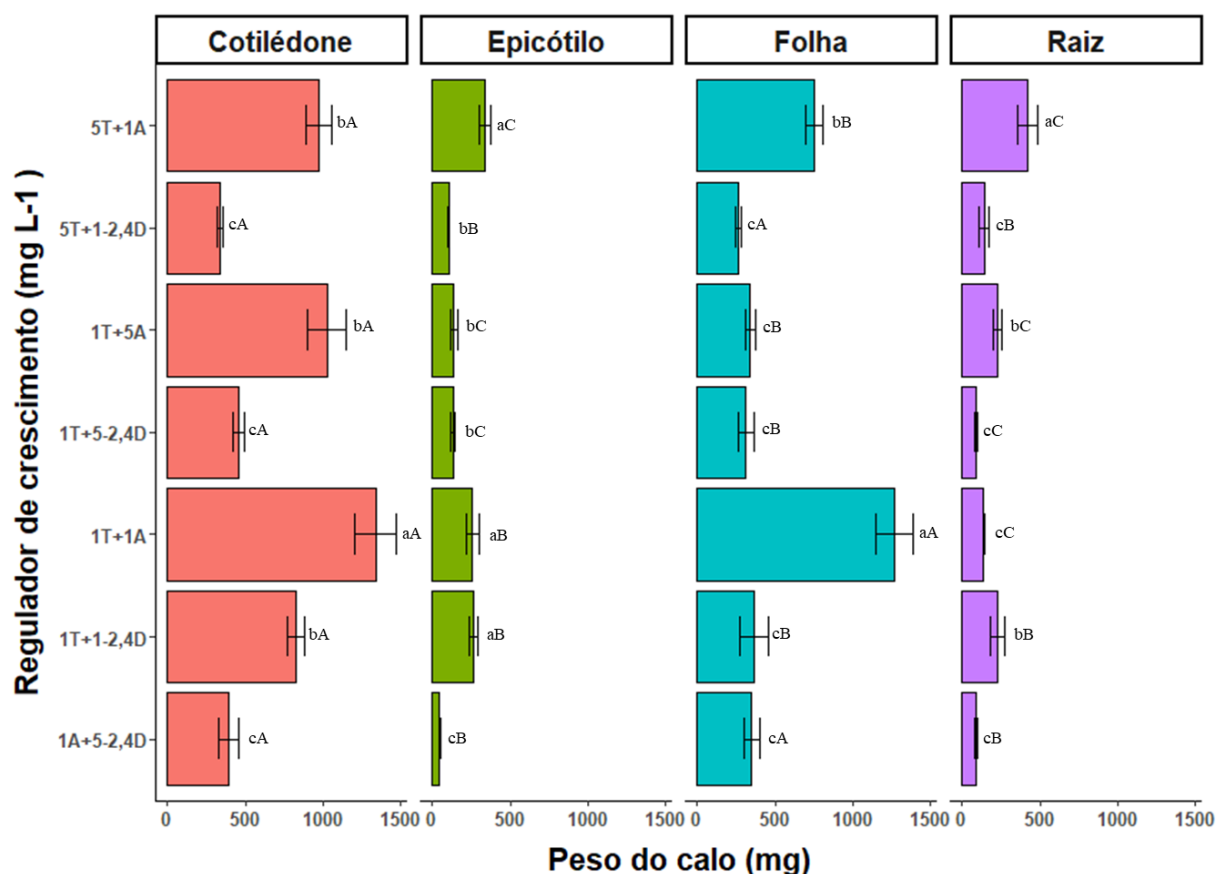
A divergência na resposta de explantes da mesma espécie vegetal ao mesmo tratamento hormonal provavelmente se deve ao potencial bioquímico e fisiológico particular dos diferentes tecidos. Normalmente, vários parâmetros estão envolvidos na formação de calos, como o tipo de explante, o estado fisiológico de crescimento do explante, o meio utilizado, a concentração e natureza dos RCV, o genótipo da planta e as condições de promoção do crescimento *in vitro* (Ahmad *et al.*, 2019; Guo *et al.*, 2021).

4.2. Crescimento do calo

A capacidade de desenvolvimento de calos foi determinada medindo-se a massa fresca do calo após 30 dias de inoculação. Avaliou-se a massa do calo em sete tratamentos, excluindo-se o controle que não apresentou formação de calo e os tratamentos 1 mg L⁻¹ ANA + 1 mg L⁻¹ 2,4-D (1A+1-2,4D) e 5 mg L⁻¹ ANA+ 1 mg L⁻¹ 2,4-D (5A+1-2.4D), pois nesses tratamentos não houve formação de calo na metade dos explantes.

Foram observadas diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre os explantes e as diferentes combinações de RCV quanto à massa fresca do calo induzido (Figura 1). Para cotilédone e folha, a maior massa fresca dos calos ($p \leq 0,05$) foi registrada na presença de 1 mg L⁻¹ TDZ + 1 mg L⁻¹ ANA (1T+1A), 1340±133 mg e 1266±118 mg, respectivamente. No epicótilo os tratamentos que apresentaram a melhor resposta para o crescimento do calo foram 5T+1A (5 mg L⁻¹ TDZ + 1 mg L⁻¹ ANA), 1T+1A e 1T+1-2,4D (1 mg L⁻¹ TDZ + 1 mg L⁻¹ 2,4-D) (Figura 1). Na raiz o tratamento que teve uma maior massa fresco do calo foi 1T+1A com 421±65mg respectivamente. Os três tratamentos mencionados (5T+1A, 1T+1A, 1T+1-2,4D) foram os que obtiveram maior proliferação de calos nos diferentes explantes, razão pela qual se continuou com o cultivo de calos com esses tratamentos para as avaliações seguintes.

Figura 1. Efeito da combinação dos reguladores de crescimento 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), TDZ (thidiazuron) e ANA (ácido 1-naftalenacético) na massa fresca do calo de folha, cotilédone, epicótilo e raiz de *A. cearensis*, após 4 semanas de cultivo.



Notas: As abreviações dos reguladores de crescimento correspondem a: 5T+1A (5 mg L⁻¹ TDZ + 1 mg L⁻¹ ANA), 5T+1-2,4D (5 mg L⁻¹ TDZ + 1 mg L⁻¹ 2,4-D), 1T+5A (1 mg L⁻¹ TDZ + 5 mg L⁻¹ ANA), 1T+5-2,4D (1 mg L⁻¹ TDZ + 5 mg L⁻¹ 2,4-D), 1T+1A (1 mg L⁻¹ TDZ + 1 mg L⁻¹ ANA), 1T+1-2,4D (1 mg L⁻¹ TDZ + 1 mg L⁻¹ 2,4-D), 1T+1-2,4D (1 mg L⁻¹ TDZ + 1 mg L⁻¹ 2,4-D). Os dados são expressos como média ± erro padrão (barras). Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os diferentes RCV para cada parte da planta (calo), e letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre as partes da planta (calo) dentro do mesmo tratamento com RCV, de acordo com o teste de Scott Knott ($p \leq 0,05$).

De modo geral, as combinações de TDZ+ANA e TDZ+2,4-D foram eficazes para induzir e promover o crescimento de calos nos quatro explantes avaliados. No entanto, observou-se um maior desenvolvimento nos calos de cotilédone e folha, já que apresentaram os valores de massa fresca mais altos. Isso pode estar relacionado com a formação e indução do calo: em folha e cotilédone, o calo se formou ao redor de todo o explante, enquanto na raiz e no epicótilo a maior parte do calo se formou apenas nas extremidades do explante, resultando em menor massa.

Um resultado semelhante foi observado na espécie *Solanum torvum* SW, onde a capacidade de formação de calos foi maior em culturas de folhas, seguidas de explantes de cotilédone e hipocótilo (Malothu; Marka; Nanna, 2023). De maneira similar, na espécie *Randia echinocarpa*, a maior biomassa de calos foi alcançada utilizando uma proporção de 1:1 auxina:citocinina (Valenzuela-Atondo *et al.*, 2020). Esses resultados destacam a eficácia das combinações de RCV, como a combinação de TDZ e 2,4-D, que favorece a indução e regeneração de calos de maneira mais eficiente do que a combinação de BA (6-bencilaminopurina) e 2,4-D, e mais eficaz do que o uso de citocinina ou auxina isoladamente (Chung; Ouyang, 2021). Além disso, a suplementação apropriada de ANA e TDZ demonstrou um efeito de reforço mútuo na proliferação de calos na espécie *Clivia miniata* Regel, atingindo uma taxa de proliferação de 217,52%, que pode ser mantida por mais de um ano (Li *et al.*, 2022). Esses achados sublinham a importância de otimizar as combinações de RCV para maximizar a formação e o desenvolvimento de calos.

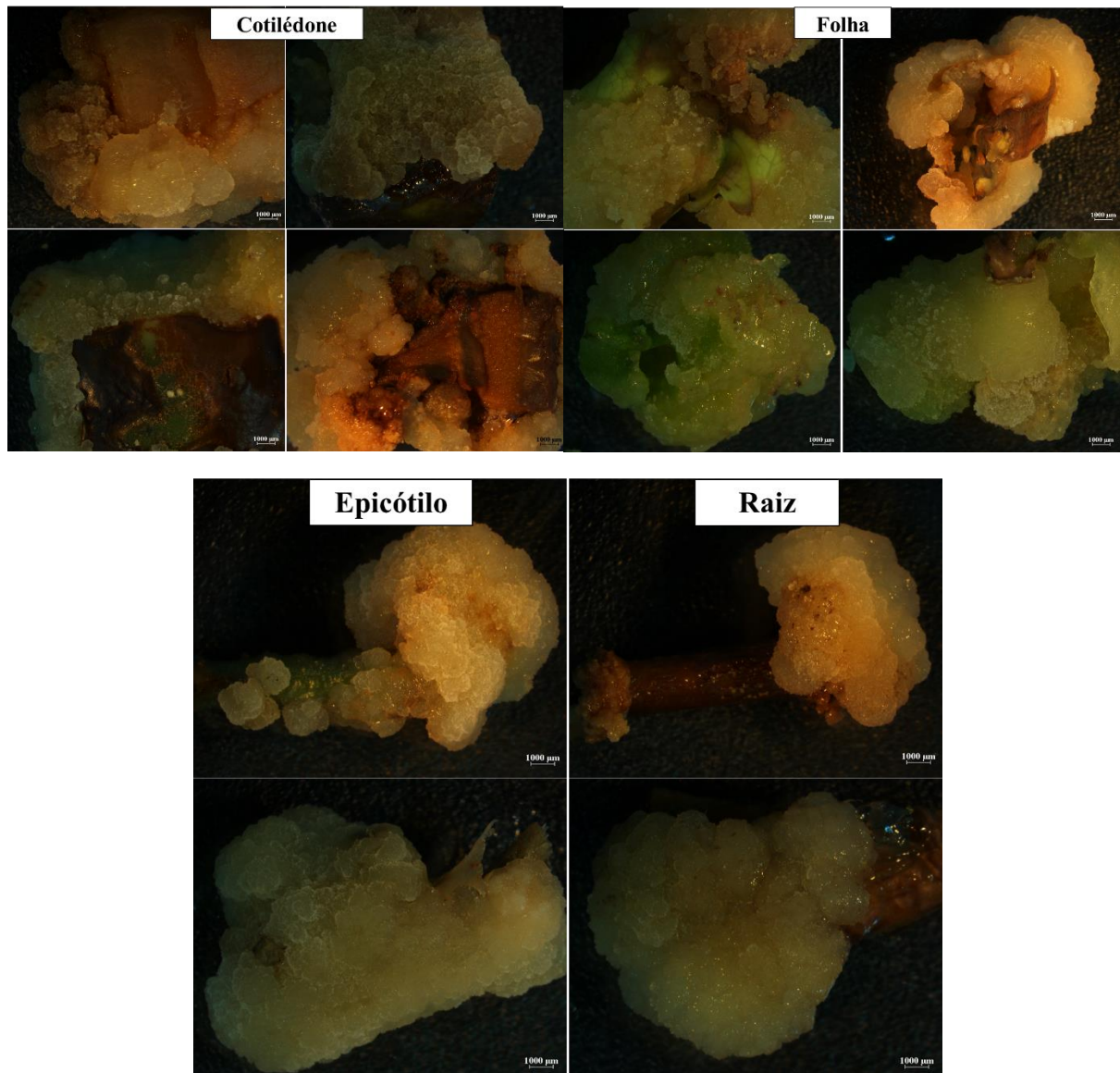
4.3. Características morfológicas do calo

Após a indução dos calos em ausência de luz, aqueles tratados com as combinações 5T+1A, 1T+1A e 1T+1-2.4D foram transferidos para uma sala de crescimento por um período de 30 dias, com temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ e um fotoperíodo de 16 horas de luz. No processo de cultivo in vitro de plantas, a luz pode influenciar na indução de calos, no crescimento celular e na produção de metabólitos especializados vegetais (Li *et al.*, 2022). Esse aumento nos metabólitos especializados pode estar associado ao metabolismo fotomixotrópico, onde a planta utiliza a luz e compostos orgânicos (como açúcares) como fonte de energia. Como consequência, isso pode influenciar na produção de ATP, que por sua vez ativa a via do ácido chiquímico, onde ocorre a síntese de vários metabólitos especializados (Ossipov *et al.*, 2022; Shi *et al.*, 2020) Nasrat; Sakimin; Hakiman (2022) relataram um aumento nos teores de fenólicos totais (TPC) e flavonoides (TFC) em calos induzidos de *Bougainvillea glabra* Choisy sob fotoperíodo, respectivamente.

Após 30 dias na sala de crescimento, avaliou-se a coloração dos calos. Observou-se que os calos de cotilédone e folha apresentavam uma variedade de cores entre amarelo, verde amarelado e marrom, enquanto no cotilédone começou a ser observada oxidação. Por outro lado, os calos de epicótilo e raiz não apresentaram variações de cor, mostrando uma coloração amarela uniforme. Neste estudo, os calos de diferentes explantes mostraram cores distintas

(Imagem 1). Na folha e cotilédone, a cor verde amarelada pode estar associada aos pigmentos dos explantes, já que quando os explantes estavam oxidando ou em estado senescente, os calos apresentavam apenas as cores amarelo e marrom. Em contraste, na raiz e epicótilo, como o calo se formou principalmente na parte extrema dos explantes, sua cor se uniformizou, não apresentando coloração verde amarelada, apenas amarela. Além disso, a variação de cor pode ser atribuída à concentração de reguladores de crescimento vegetal específicos no meio (Mosoh *et al.*, 2024). Por outro lado, o fenômeno de oxidação nos calos deve-se ao acúmulo de compostos fenólicos presentes nas plantas, o que é considerado um fenômeno interferente em estudos de cultivo de tecidos (Kim *et al.*, 2024). Os achados do presente estudo mostraram que a morfologia do calo varia de acordo com o explante.

Imagem 1. Aspecto visual de calos de cotilédone, folha e epicótilo e raiz de *A. cearensis* após 60 dias de cultivo in vitro



Neste estudo, todos os tipos de explantes formaram calos compactos durante o cultivo in vitro. Calos compactos são compostos por células densamente agrupadas e difíceis de separar (Wahyuni *et al.*, 2021). Além disso, são usados para fins de organogênese (Patel *et al.*, 2022). Na espécie *Solanum tuberosum*, os calos compactos produziram maior teor fenólico e maior capacidade antioxidante em comparação com calos friáveis, como resposta rápida ao estresse por deficiência de Fe (Boamponsem; Leung, 2017). Sugere-se que os calos compactos podem ser mais eficientes na utilização de compostos fenólicos para se adaptar à exposição inicial ao estresse e no desenvolvimento de uma melhor eficiência no uso do ferro a longo prazo.

4.4. Compostos fenólicos e atividade antioxidante em explantes e calos de *A. cearensis*.

A espécie *A. cearensis* cultivada in vitro começou a germinar entre 3 e 7 dias. Essa espécie não apresenta uma germinação uniforme devido à presença de tecido esclerenquimático, o que dificulta a rápida absorção de água (Loureiro *et al.*, 2013). Seu crescimento foi rápido; aos 30 dias de cultivo in vitro, obteve-se uma planta com todas as suas partes bem desenvolvidas. Ressalta-se que aos 30 dias a planta já havia atingido a altura máxima do frasco e iniciado o processo de senescência. Assim, aos 30 dias partes de folha, cotilédone, epicótilo e raiz foram coletadas com o objetivo de avaliar TPC e CTF, bem como a atividade antioxidante pelos métodos DPPH, ABTS e Fosfomolibdênio, visando-se a avaliação da planta cultivada in vitro, antes da indução de calos. A parte da planta de *A. cearensis* com maior ($p \leq 0,05$) quantidade de TPC e CTF foi a folha, seguida pelo epicótilo, raiz e cotilédone (Tabela 3). O explante que apresentou maior atividade antioxidante pelos métodos DPPH e fosfomolibdênio foi a raiz e pelo método ABTS, o epicótilo.

Tabela 3. Compostos fenólicos e atividade antioxidante de diferentes partes da planta in vitro de *A. cearensis* com 30 dias de idade.

Explante	TPC (mg GAE g ⁻¹ MF)	CTF (mg QE g ⁻¹ MF)	DPPH (%)	ABTS (%)	Fosfomolibdênio (mg AAE g ⁻¹ MF)
Folha	6,38±0,48 a	3,71±0,06 a	9,63±0,77 c	30,05±1,68 c	0,67±0,06 d
Cotilédone	1,65±0,15 c	0,20±0,02 d	17,44±0,7 b	57,63±5,42 b	1,49±0,13 c
Epicótilo	2,51±0,21 b	1,10±0,06 b	16,25±0,7 b	86,81±4,63 a	2,27±0,14 b
Raiz	2,39±0,07 b	0,46±0,01 c	25,02±1,1 a	46,04±4,41 b	3,01±0,18 a

Nota: As abreviações correspondem a TPC - teor fenólico total, CTF - teor total de flavonoides, DPPH - 2,2-difenil-1-picrilhidrazil, ABTS - 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolína-6-sulfônico), GAE - ácido gálico, QE - quercetina, AAE - ácido ascórbico e MF - massa fresca. Os valores médios ± erro

padrão seguidos de letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

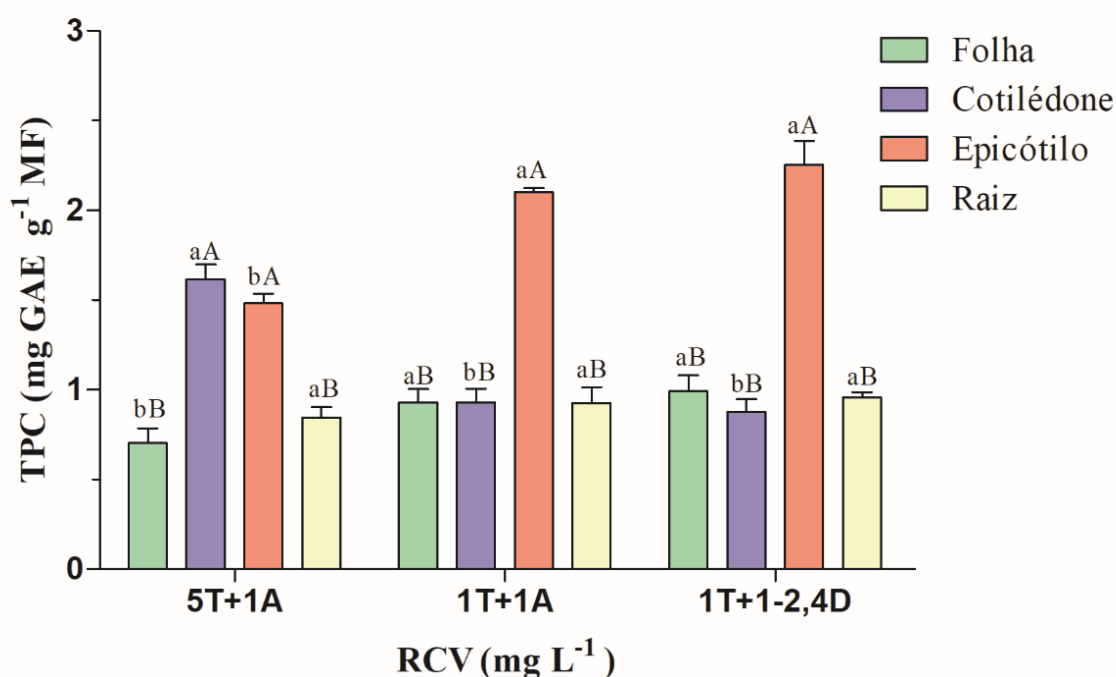
Os tecidos de uma planta respondem de maneira diferenciada aos estressores ambientais, resultando em perfis metabólicos distintos, especialmente em relação aos compostos fenólicos (Ranade; Joshi; Kudale, 2023). Kołton *et al.*, (2022), observaram uma expressão aumentada em folhas jovens em comparação com as totalmente expandidas, evidenciando a regulação desses compostos durante as fases de desenvolvimento. Além disso, a atividade antioxidante também varia entre as diferentes partes da planta. Na espécie *Labisia pumila* var. *alata*, as folhas apresentaram maior capacidade antioxidante em comparação com o caule e as raízes (Najhah *et al.*, 2021). O qual está relacionado com os resultados de *A. cearenses* que cada parte da planta mostrou um comportamento diferente, de pronto porque tinham diferentes estados de desenvolvimento.

As partes mais utilizadas de *A. cearensis*, tanto para pesquisa quanto na medicina popular, são a casca do caule, semente e folha. Os estudos são realizados em plantas jovens e adultas cultivadas em casa de vegetação ou em estado selvagem (Araujo *et al.*, 2021; Canuto; Silveira; Bezerra, 2010). Porém não há pesquisas sobre o teor de compostos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante de *A. cearensis* *in vitro*. Além disso, os estudos encontrados têm focado em analisar separadamente as partes desta planta. Em folhas e casca de caule de árvores adultas e jovens de *A. cearensis*, observou-se uma alta atividade antioxidante medida pelo teste de DPPH, com mais de 80% de redução de radicais livres, valor 3,6 vezes maior à maior média observada neste estudo (17,44% em cotilédone) (Tabela 3). Essa atividade antioxidante pode estar relacionada principalmente ao seu teor de compostos fenólicos, incluindo os flavonoides (Araujo *et al.*, 2021; Dos Santos *et al.*, 2016). É interessante notar que, embora os extratos de diferentes partes das plantas de *A. cearensis* apresentem o mesmo perfil qualitativo, podem haver diferenças quantitativas substanciais. Provavelmente, as diferenças no teor desses metabólitos especializados podem ser devidas às diferentes condições de crescimento e estágios de desenvolvimento das plantas (Vasconcelos *et al.*, 2019).

Dada a elevada importância medicinal da espécie *A. cearenses* avalia-se o efeito do tipo de explante e dos RCV para produzir compostos fenólicos em calos. Os resultados obtidos demonstraram que a produção de TPC foi significativamente maior ($p \leq 0.05$) no calo formado pelo explante de epicótilo nos tratamentos 1T+1A e 1T+1-2,4D, com $2,09 \pm 0,02$ e $2,25 \pm 0,13$ (mg GAE g⁻¹ MF), respectivamente, em comparação com o tratamento 5T+1A.

Embora no tratamento 5T+1A os explantes de cotilédone ($1,61 \pm 0,08$ mg GAE g^{-1} MF) e epicótilo ($1,47 \pm 0,06$ mg GAE g^{-1} MF) tenham mostrado níveis semelhantes de TPC, o calo de epicótilo nos tratamentos 1T+1A e 1T+1-2,4D alcançou o valor máximo em compostos fenólicos entre todos os tratamentos e tipos de calos, superando em aproximadamente 0,50 mg GAE g^{-1} MF o tratamento 5T+1A (cotilédone e epicótilo). Esses resultados indicam que o calo de epicótilo foi a parte da planta que apresentou o maior teor de compostos fenólicos nos tratamentos mencionados (Figura 2).

Figura 2. Influência dos reguladores de crescimento vegetal (RCV) e calos de *A. cearensis* no teor fenólico total (TPC).

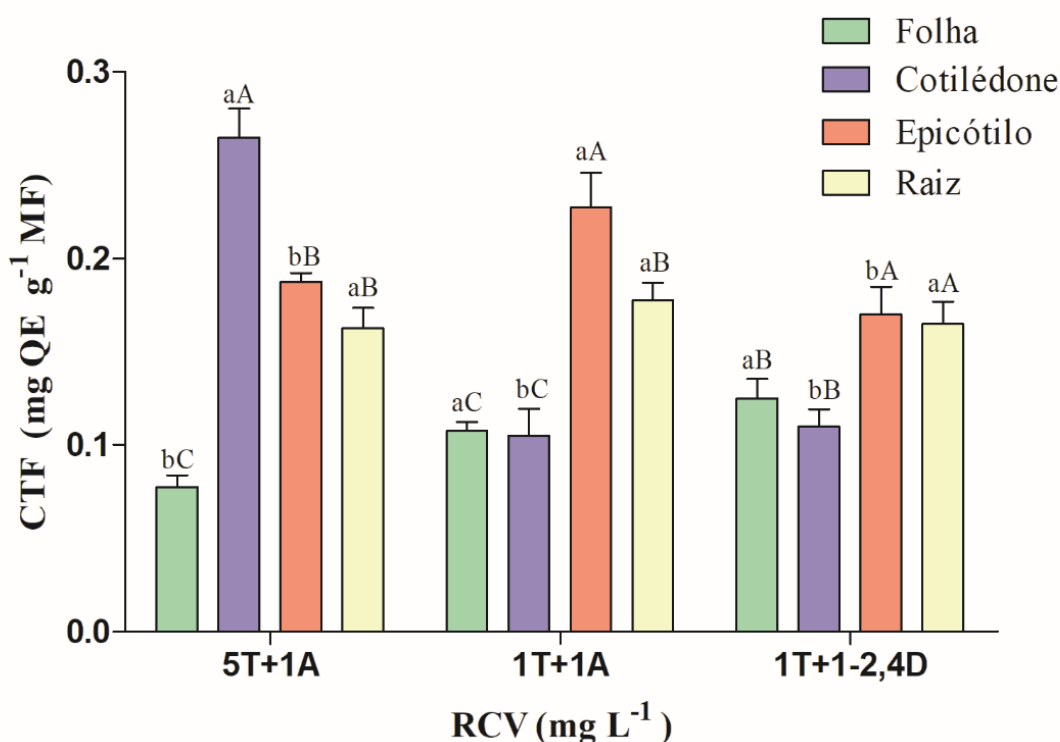


Nota: As abreviações correspondem a GAE - ácido gálico, MF - massa fresca, TDZ - thidiazuron, ANA - ácido 1-naftalenacético, 2,4-D - ácido 2,4-diclorofenoxiacético, 5T+1A - 5 mg L^{-1} TDZ + 1 mg L^{-1} ANA, 1T+1A - 1 mg L^{-1} TDZ + 1 mg L^{-1} ANA e 1T+1-2,4D - 1 mg L^{-1} TDZ + 1 mg L^{-1} 2,4-D. Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão (barras). Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre tratamentos dentro de cada parte da planta, e letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre partes da planta dentro de cada tratamento, de acordo com o teste de Scott Knott ($p \leq 0,05$).

No que se refere ao CTF, no tratamento 5T+1A, o calo de cotilédone apresentou o valor máximo ($0,26 \pm 0,02$ mg QE g^{-1} MF) em comparação com os calos de epicótilo ($0,19 \pm 0,01$ mg QE g^{-1} MF), raiz ($0,16 \pm 0,01$ mg QE g^{-1} MF) e folha ($0,08 \pm 0,01$ mg QE g^{-1} MF) (Figura 3). Por outro lado, no tratamento 1T+1A, o calo de epicótilo apresentou os níveis mais altos de CTF ($0,19 \pm 0,01$ mg QE g^{-1} MF), enquanto no tratamento 1T+1-2,4D, tanto o calo de epicótilo quanto a raiz alcançaram os valores mais elevados, com $0,17 \pm 0,01$ mg QE g^{-1} MF e $0,16 \pm 0,01$ mg QE g^{-1} MF, respectivamente. No tratamento 5T+1A, o calo da folha

mostrou menos CTF em comparação com os calos de 1T+1A e 1T+1-2,4D, enquanto com o cotilédone ocorreu o oposto: o tratamento 5T+1A mostrou o maior CTF em comparação com as outras combinações de RCV. Além disso, o epicótilo demonstrou uma maior quantidade de CTF no tratamento 1T+1A, enquanto a raiz, assim como no TPC, não manifestaram nenhuma interação com os RCV aplicados.

Figura 3. Influência dos reguladores de crescimento vegetal (RCV) e calos de *A. cearensis* no teor total de flavonoides (CTF)



Nota: As abreviações correspondem a QE - quercetina, MF – massa fresca, TDZ - thidiazuron, ANA - ácido 1-naftalenacético, 2,4-D - ácido 2,4-diclorofenoxiacético, 5T+1A - 5 mg L⁻¹ TDZ + 1 mg L⁻¹ ANA, 1T+1A - 1 mg L⁻¹ TDZ + 1 mg L⁻¹ ANA e 1T+1-2,4D - 1 mg L⁻¹ TDZ + 1 mg L⁻¹ 2,4-D. Os dados são expressos como média ± erro padrão (barras). Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre tratamentos dentro de cada parte da planta, e letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre partes da planta dentro de cada tratamento, de acordo com o teste de Scott Knott ($p \leq 0,05$).

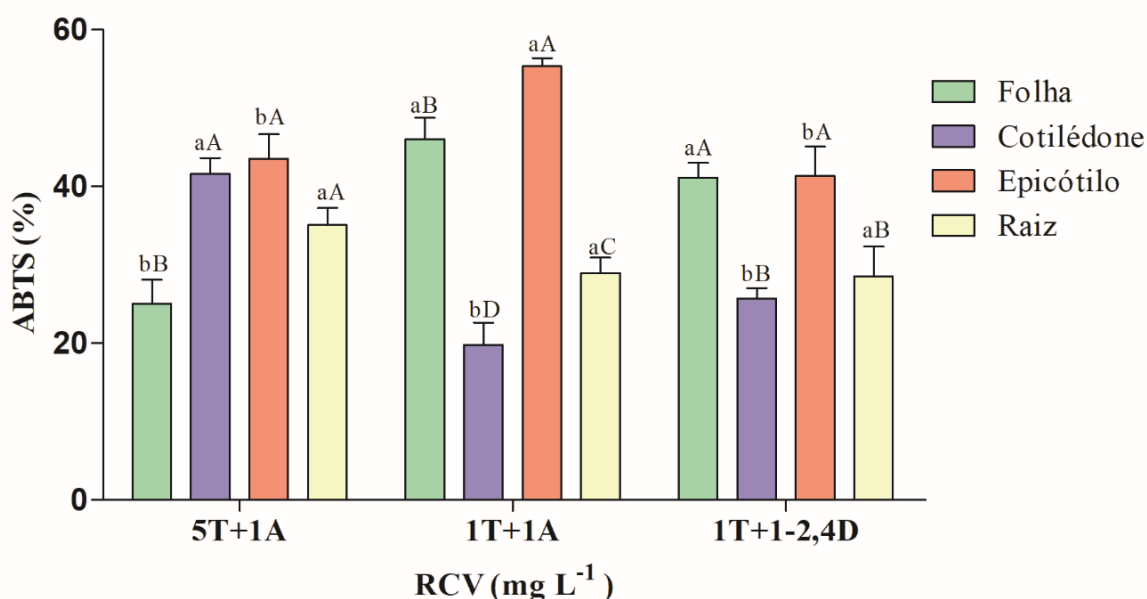
Os RCV e a origem do explante de diferentes órgãos podem afetar não apenas a divisão e o crescimento celular, mas também a produção de metabólitos especializados em culturas de tecidos (Grąbkowska *et al.*, 2016; Valenzuela-Atondo *et al.*, 2020). Neste estudo, a concentração equilibrada de RCV (1 mg L⁻¹ TDZ + 1 mg L⁻¹ ANA e 1 mg L⁻¹ TDZ + 1 mg L⁻¹ 2,4D) não apresentou diferenças no TPC para cada tipo de calo testado (folha, cotilédone, epicótilo e raiz), enquanto o tratamento com maior concentração de TDZ (5 mg L⁻¹ de TDZ + 1 mg L⁻¹ de ANA) influenciou a concentração de TPC nos explantes. Observou-se uma

diminuição significativa no TPC nos calos de folha e epicótilo no tratamento 5T+1A em comparação com o tratamento 1T+1A e 1T+1-2.4D. No entanto, ocorreu o oposto com o cotilédone no tratamento 5T+1A os níveis de TPC aumentaram em relação aos outros tratamentos. Por último, a raiz não apresentou nenhum efeito nos diferentes tratamentos ($P > 0,05$) de RCV. O comportamento do CTF entre os tipos de calos e RCV assemelhou-se ao do TPC, sugerindo que os flavonoides, como um grupo de compostos fenólicos, exibiram um comportamento paralelo. No entanto, houve variação na resposta do epicótilo entre os tratamentos, ao contrário do observado no TPC.

Em concentrações baixas (1 mg L^{-1}) e médias (5 mg L^{-1}) de TDZ no cultivo de calos, pode-se observar um maior acúmulo de TPC e TFC em comparação com concentrações mais elevadas, onde a quantidade de TPC e TFC pode diminuir. Isso ocorre porque o TDZ em concentrações elevadas estimula a produção de etileno e suprime a produção de metabólitos especializados (AHMAD *et al.*, 2019; KHAN *et al.*, 2016). No entanto, essa afirmação não é aplicável a todos os explantes ou espécies vegetais. Neste estudo, é possível que a concentração de 5 mg L^{-1} de TDZ tenha sido muito alta para o calo de epicótilo e folha, o que poderia ter resultado em uma diminuição dos compostos fenólicos. Por outro lado, o calo do cotilédone necessitava de uma concentração mais alta (5 mg L^{-1}) de TDZ para aumentar o TPC. Portanto, as concentrações de RCV influenciaram no teor de TPC nos diferentes calos de *A. cearensis*. Na espécie *Ipomoea turbinata* Lagasca e Segura, foi observado que, em uma concentração de 5 mg L^{-1} de TDZ, os calos derivados das folhas apresentaram níveis mais altos de TPC e TFC em comparação com os calos derivados do caule e da raiz (AHMAD *et al.*, 2019).

Em quanto a atividade antioxidante ABTS, o calo de epicótilo no tratamento 1T+1A ($55,31 \pm 1,01\%$) mostrou uma maior capacidade antioxidante em comparação com os tratamentos 5T+1A ($43,56 \pm 3,10\%$) e 1T+1-2,4D ($41,38 \pm 3,71\%$). O calo de cotilédone no tratamento 5T+1A ($41,61 \pm 2,05\%$) registrou um maior percentual de redução em relação aos tratamentos 1T+1A ($19,83 \pm 2,77\%$) e 1T+1-2,4D ($25,70 \pm 1,30\%$). No calo de folha, o tratamento mais eficaz para inibir o radical ABTS foi 1T+1A ($46,06 \pm 2,70\%$), enquanto o calo de raiz não apresentou diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os tratamentos (Figura 4).

Figura 4. Influência dos reguladores de crescimento vegetal (RCV) e calos de *A. cearensis* no ABTS (2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)).

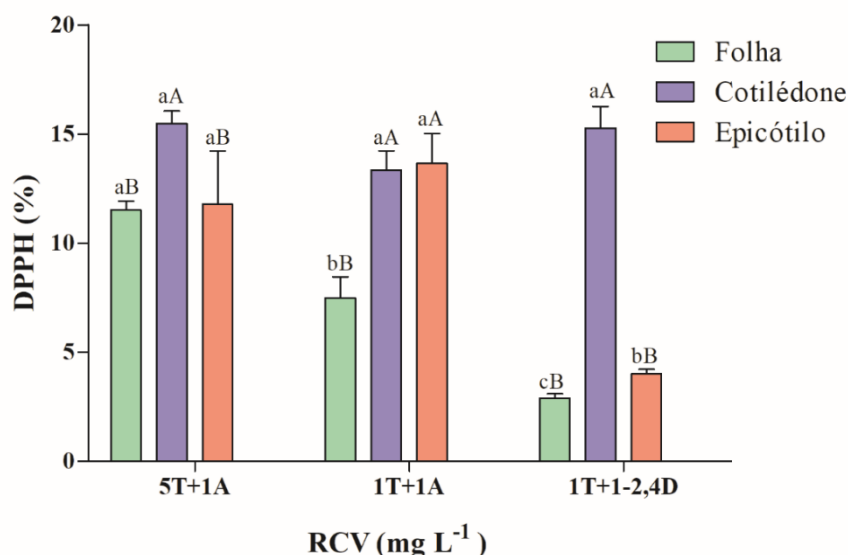


Nota: As abreviações correspondem a TDZ - thidiazuron, ANA - ácido 1-naftalenacético, 2,4-D - ácido 2,4-diclorofenoxiacético, 5T+1A - 5 mg L⁻¹ TDZ + 1 mg L⁻¹ ANA, 1T+1A - 1 mg L⁻¹ TDZ + 1 mg L⁻¹ ANA e 1T+1-2,4D - 1 mg L⁻¹ TDZ + 1 mg L⁻¹ 2,4-D. Os dados são expressos como média ± erro padrão (barras). Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre tratamentos dentro de cada parte da planta, e letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre partes da planta dentro de cada tratamento, de acordo com o teste de Scott Knott ($p \leq 0,05$).

No tratamento 5T+1A, o calo de epicótilo, cotilédone e raiz superaram em quase duas vezes a folha, no tratamento 1T+1A o calo de epicótilo supero quase três vezes aos calos de cotilédone. Por outro lado, no tratamento 1T+1-2,4D, os calos de folha e epicótilo apresentaram uma capacidade antioxidante maior em relação ao cotilédone e raiz. Esses resultados sugerem que os tratamentos aplicados influenciaram na capacidade antioxidante dos diferentes explantes de calos, e cada um respondeu de maneira distinta conforme o tratamento. No entanto, o calo de epicótilo foi o explante com a maior capacidade antioxidante em relação ao radical ABTS entre todos os tratamentos de RCV e tipos de calos avaliados.

Com o método DPPH, observou-se que, independentemente do explante e dos diferentes tratamentos com RCV, a capacidade antioxidante dos extratos de calos (cotilédone, folha, epicótilo) foi baixa. Nos calos de raiz, a eliminação dos radicais DPPH foi nula. A máxima capacidade antioxidante, medida pelo método DPPH foi observada no cotilédone, especificamente nos tratamentos 5T+1A ($15.48 \pm 0.57\%$) e 1T+1-2,4D ($15.27 \pm 0.98\%$) (Figura 5).

Figura 5. Influência dos reguladores de crescimento vegetal (RCV) e calos de *A. cearensis* no DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil).



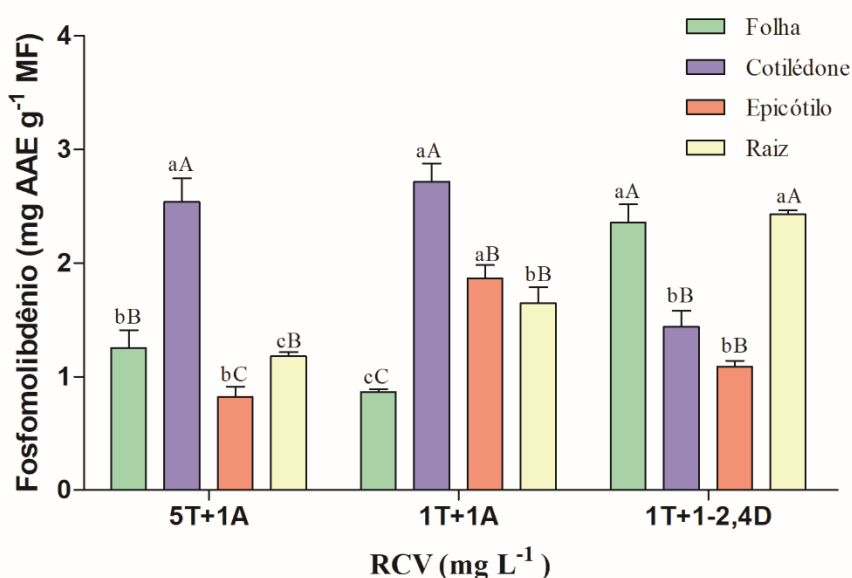
Nota: As abreviações correspondem a TDZ - thidiazuron, ANA - ácido 1-naftalenacético, 2,4-D - ácido 2,4-diclorofenoxiacético, 5T+1A - 5 mg L⁻¹ TDZ + 1 mg L⁻¹ ANA, 1T+1A - 1 mg L⁻¹ TDZ + 1 mg L⁻¹ ANA e 1T+1-2,4D - 1 mg L⁻¹ TDZ + 1 mg L⁻¹ 2,4-D. Os dados são expressos como média ± erro padrão (barras). Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre tratamentos dentro de cada parte da planta, e letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre partes da planta dentro de cada tratamento, de acordo com o teste de Scott Knott ($p \leq 0,05$).

Neste estudo, em calos de epicótilo, cotilédone, folha e raiz suplementados com combinações de RCV, a atividade antioxidante medida pelo método DPPH foi relativamente menor em comparação com o método ABTS. Essas diferenças na capacidade dos extratos para eliminar os radicais ABTS/DPPH ou outras propriedades antioxidantes não avaliadas podem estar relacionadas com a natureza da composição dos extratos; porque diferentes solventes dissolvem diferentes moléculas bioativas devido a diferenças em sua polaridade, e isso também pode depender da capacidade dos compostos antioxidantes para perder hidrogênio e da conformação estrutural desses componentes (Lfitat *et al.*, 2021). Além disso, diferentes ensaios de atividade eliminadora de radicais livres apresentam resultados variáveis no mesmo solvente de extração, portanto, mais de um método de atividade antioxidante deve ser utilizado para comparar o modo de ação dos compostos (Shalaby; Shanab, 2013). Com o método DPPH, observou-se que, independentemente do explante e dos diferentes tratamentos com RCV, a capacidade antioxidante dos extratos de calos (cotilédone, folha, epicótilo) foi baixa. Nos calos de raiz, a eliminação dos radicais DPPH foi nula. A máxima capacidade antioxidante, medida pelo método DPPH foi observada no cotilédone, especificamente nos tratamentos 5T+1A ($15.48 \pm 0.569\%$) e 1T+1-2,4D ($15.27 \pm 0.976\%$) (Figura 5).

Na cultura de suspensão de calos de *Paris polyphylla* Smith, não foi encontrada uma diferença apreciável na atividade antioxidante no ensaio de DPPH, mas a atividade antioxidante máxima foi registrada no ensaio ABTS (Rawat *et al.*, 2023), o que está em linha com nossos resultados. As diferenças na atividade antioxidante foram resultado das diferentes técnicas utilizadas, já que cada uma possui um mecanismo de reação diferente: o DPPH elimina os radicais livres e o ABTS reduz os cátions radicais sintéticos (Yaowachai; Luecha; Taratima, 2023). No entanto, é difícil fazer uma comparação direta entre os métodos, pois variam em diferentes aspectos (Gulcin, 2020).

O ensaio de fosfomolibdênio é empregado para medir a capacidade de um extrato de neutralizar um radical livre por meio da transferência de elétrons (Arulvendhan; Saravana; Rajaganesh, 2024; El Atki *et al.*, 2019). Utilizando este método, o cotilédone no tratamento 5T+1A ($2,53 \pm 0,21$ mg EAG mg EAG g⁻¹ MF) e 1T+1A ($2,71 \pm 0,16$ mg EAG g⁻¹ MF) mostrou a maior capacidade antioxidante ($p \leq 0.05$) em comparação com os calos de epicótilo, raiz e folha (Figura 6). No entanto, no tratamento 1T+1-2,4D, os calos dos explantes de folha ($2,35 \pm 0,16$ mg EAG g⁻¹ MF) e raiz ($2,42 \pm 0,03$ mg EAG g⁻¹ MF) demonstraram ter a maior capacidade de redução do radical fosfomolibdênio. Mesmo assim, neste ensaio, o cotilédone foi o que apresentou a maior ($p \leq 0,05$) capacidade antioxidante entre todos os tratamentos e explantes. Este resultado sugere uma importante propriedade de doação de elétrons dos extratos dos calos de *A. cearensis* e, portanto, uma grande capacidade antioxidante.

Figura 6. Influência dos reguladores de crescimento vegetal (RCV) e calos de *A. cearensis* no fosfomolibdênio.



Nota: As abreviações correspondem a AAE - ácido ascórbico, MF - massa fresca, TDZ - thidiazuron, ANA - ácido 1-naftalenacético, 2,4-D - ácido 2,4-diclorofenoxiacético, 5T+1A (5 mg L⁻¹ TDZ + 1 mg L⁻¹ ANA), 1T+1A (1 mg L⁻¹ TDZ + 1 mg L⁻¹ ANA) e 1T+1-2,4D (1 mg L⁻¹ TDZ + 1 mg

L⁻¹ 2,4-D). Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão (barras). Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre tratamentos dentro de cada parte da planta, e letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre partes da planta dentro de cada tratamento, de acordo com o teste de Scott Knott ($p \leq 0,05$).

Os teores de fenólicos totais e flavonoides nos calos de folha e raiz foram inferiores aos observados nos respectivos explantes, a despeito do tratamento utilizado (Tabela 4A e 4D)). Porém, esse comportamento não foi observado de forma sistemática em cotilédone e epicótilo, variando em função da combinação do RCV (Tabela 4B e 4C). Em cotilédone, o tratamento 5T+1A se destacou com as maiores médias de TPC e CTF, embora o TPC desse tratamento não tenha se diferido daquele observado no explante. TPC e CTF do explante foi sempre superior ao dos calos de cotilédone sob os tratamentos 1T+1A e 1T+1-2,4D. Já no epicótilo, os calos 5T+1A apresentaram menor TPC, em comparação a explante e calos sob os tratamentos 1T+1A e 1T+1-2,4D, que não diferiram entre si. Ainda no epicótilo, maior CTF foi observado no explante, seguido de 1T+1A.

Os maiores TPC e CTF observados nas folhas, em comparação aos seus calos, não se refletiram, de forma geral, em maior atividade antioxidante (Tabela 4A). Pelo contrário, os calos de folhas induzidos por duas das três combinações de RCV (1T+1A e 1T+1-2,4D) apresentaram maior atividade antioxidante (ABTS e fosfomolibdênio) à do explante. Nos calos de cotilédone, a atividade antioxidante pelo método de fosfomolibdênio no tratamento 1T+1A foi superior à do explante; entretanto, no epicótilo e na raiz, a atividade antioxidante (ABTS e fosfomolibdênio) foi maior no explante do que no calo. No método DPPH, os calos de raiz não exibiram nenhuma atividade antioxidante em todos os tratamentos, o que levou à exclusão desses dados da Tabela 4D.

Tabela 4. TPC, CTF e atividade antioxidante (DPPH, ABTS e fosfomolibdênio) em explantes e calos de *A. cearensis* submetidos a diferentes combinações de reguladores de crescimento vegetal. A: Explantes de folha e calos de folha. B: Explantes de cotilédone e calos de cotilédone. C: Explantes de epicótilo e calos de epicótilo. D: Explantes de raiz e calos de raiz. (Continua)

A	Explante		Calos da folha	
	Folha	5T+1A (mg L ⁻¹)	1T+1A (mg L ⁻¹)	1T+1-2,4D (mg L ⁻¹)
TPC (mg GAE g ⁻¹ MF)	6,38 $\pm$ 0,48 a	0,70 $\pm$ 0,08 c	0,93 $\pm$ 0,07 b	0,99 $\pm$ 0,08 b
CTF (mg QE g ⁻¹ MF)	3,71 $\pm$ 0,06 a	0,08 $\pm$ 0,01 c	0,11 $\pm$ 0,01 b	0,10 $\pm$ 0,01 c
DPPH (%)	9,63 $\pm$ 0,77 a	11,51 $\pm$ 0,41 a	7,48 $\pm$ 0,96 b	2,89 $\pm$ 0,19 c
ABTS (%)	30,05 $\pm$ 1,68 b	25,07 $\pm$ 3,05 b	46,06 $\pm$ 2,70 a	41,13 $\pm$ 1,85 a

Tabela 4. TPC, CTF e atividade antioxidante (DPPH, ABTS e fosfomolibdênio) em explantes e calos de *A. cearensis* submetidos a diferentes combinações de reguladores de crescimento vegetal. A: Explantes de folha e calos de folha. B: Explantes de cotilédono e calos de cotilédono. C: Explantes de epicótilo e calos de epicótilo. D: Explantes de raiz e calos de raiz. (Conclusão)

A	Explante		Calos da folha	
	Folha	5T+1A (mg L ⁻¹)	1T+1A (mg L ⁻¹)	1T+1-2,4D (mg L ⁻¹)
Fosfomolibdênio (mg AAE g ⁻¹ MF)	0,67±0,06 c	1,25±0,15 b	0,86±0,03 c	2,35±0,16 a
B	Explante		Calos de cotilédono	
	Cotilédono	5T+1A (mg L ⁻¹)	1T+1A (mg L ⁻¹)	1T+1-2,4D (mg L ⁻¹)
TPC (mg GAE g ⁻¹ MF)	1,65±0,15 a	1,61±0,08 a	0,93±0,07 b	0,87±0,07 b
CTF (mg QE g ⁻¹ MF)	0,20±0,01 b	0,26±0,02 a	0,10±0,01 c	0,11±0,01 c
DPPH (%)	17,44±0,74 a	15,48±0,57 a	13,32±0,89 a	15,27±0,98 a
ABTS (%)	57,63±4,11 a	41,61±2,05 b	19,83±2,77 c	25,70±1,30 c
Fosfomolibdênio (mg AAE g ⁻¹ MF)	1,49±0,13 b	2,53±0,21 a	2,71±0,16 a	1,44±0,14 b
C	Explante		Calos do epicótilo	
	Epicótilo	5T+1A (mg L ⁻¹)	1T+1A (mg L ⁻¹)	1T+1-2,4D (mg L ⁻¹)
TPC (mg GAE g ⁻¹ MF)	2,51±0,21 a	1,47±0,06 b	2,09±0,02 a	2,25±0,13 a
CTF (mg QE g ⁻¹ MF)	1,10±0,03 a	0,19±0,01 c	0,22±0,01 b	0,17±0,01 c
DPPH (%)	16,25±0,73 a	11,78±2,43 a	13,65±1,36 a	4,00±0,21 b
ABTS (%)	86,81±4,63 a	43,56±3,10 c	55,31±1,01 b	41,38±3,71 c
Fosfomolibdênio (mg AAE g ⁻¹ MF)	2,27±0,14 a	0,82±0,09 c	1,86±0,11 b	1,08±0,05 c
D	Explante		Calos da raiz	
	Raiz	5T+1A (mg L ⁻¹)	1T+1A (mg L ⁻¹)	1T+1-2,4D (mg L ⁻¹)
TPC (mg GAE g ⁻¹ MF)	2,39±0,07 a	0,85±0,05 b	0,93±0,08 b	0,96±0,02 b
CTF (mg QE g ⁻¹ MF)	0,46±0,01 a	0,16±0,01 b	0,18±0,01 b	0,16±0,01 b
ABTS (%)	46,04±1,49 a	35,06±0,45 b	28,98±1,91 b	28,57±3,79 b
Fosfomolibdênio (mg AAE g ⁻¹ MF)	3,01±0,18 a	1,17±0,04 d	1,64±0,14 c	2,42±0,03 b

Nota: As abreviações correspondem a TPC - teor fenólico total, CTF - teor total de flavonoides, DPPH - 2,2-difenil-1-picrilhidrazil, ABTS - 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolína-6-sulfônico), GAE - ácido gálico, QE - quercetina, AAE - ácido ascórbico, MF - massa fresca, TDZ - thidiazuron, ANA -

ácido 1-naftalenacético, 2,4-D - ácido 2,4-diclorofenoxiacético, 5T+1A - 5 mg L⁻¹ TDZ + 1 mg L⁻¹ ANA, 1T+1A - 1 mg L⁻¹ TDZ + 1 mg L⁻¹ ANA e 1T+1-2,4D - 1 mg L⁻¹ TDZ + 1 mg L⁻¹ 2,4-D. Os valores médios $\pm$ erro padrão seguidos de letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Correlações distintas entre TPC, CTF e atividade antioxidante de calos e suas matrizes têm sido reportadas na literatura (Mahendra *et al.*, 2020; Najhah *et al.*, 2021; Nasrat; Sakimin; Hakiman, 2022; Prakash *et al.*, 2023; Ranade; Joshi; Kudale, 2023) Essa observação sugere que os níveis de TPC, CTF e a atividade antioxidante variam de acordo com a espécie vegetal e a parte da planta utilizada. É importante considerar que as culturas de calos são sistemas complexos e que a interação de fatores genéticos, epigenéticos, hormonais e ambientais no processo de cultivo de tecidos pode levar a variações na produção de metabólitos especializados (Ranade; Joshi; Kudale, 2023).

Os extratos dos calos (folha, cotilédone, epicótilo e raiz) de *A. cearensis*, embora em proporções diferentes, contêm os mesmos compostos que a planta mãe, evidenciando que esses calos têm a capacidade de sintetizar esses compostos bioativos a partir da planta mãe. Este fato foi corroborado em diversas pesquisas com outras espécies (Najhah *et al.*, 2021; Ranade; Joshi; Kudale, 2023; Valenzuela-Atondo *et al.*, 2020). Essa produção de compostos fenólicos em calos é de grande importância, visto que estudos evidenciaram a ampla utilização dos compostos encontrados em *A. cearensis* no tratamento de várias doenças. Seus extratos demonstram uma variedade de atividades biológicas, incluindo atividades antimicrobiana, antinociceptiva, anti-inflamatória, antioxidante, neuroprotetora e miorrelaxante. Algumas dessas atividades são atribuídas às cumarinas e aos compostos fenólicos, que são os principais constituintes dos extratos de *A. cearensis* (Canuto; Silveira; Bezerra, 2010; Silva *et al.*, 2020; Silveira *et al.*, 2022).

4.5. Análise de correlação entre variáveis

Para determinar a correlação entre os diferentes compostos fenólicos (TFC e CTF) e a atividade antioxidante (DPPH, ABTS e fosfomolibdênio) foi adotado o teste de Pearson. Essa análise foi conduzida separadamente para cada tipo de calo (folha, cotilédone, epicótilo e raiz), enquanto as partes da planta foram analisadas em conjunto. Essa abordagem foi adotada devido ao comportamento variado de cada explante com os tratamentos de RCV aplicados.

Na planta de *A. cearensis* e nos calos de folha e cotilédone, foi observada uma alta ($p \leq 0,05$) correlação entre os compostos fenólicos e pelo menos um dos três métodos

antioxidantes avaliados. No entanto, o método antioxidante variou para cada explante. O CTF nos explantes de *A. cearensis* correlacionou-se negativamente com o fosfomolibdênio ($r = -0,70$; $p \leq 0,05$) (Tabela 5). Por outro lado, nos calos de folha, observou-se uma correlação negativa e altamente significativa entre CTF ($r = -0,87$; $p \leq 0,05$) e DPPH e uma correlação positiva entre CTF ($r = 0,84$; $p \leq 0,05$) e fosfomolibdênio (Tabela 5). Enquanto isso, os calos de cotilédono revelaram uma correlação positiva altamente significativa entre TFC ($r = 0,79$; $p \leq 0,05$), CTF ($r = 0,85$; $p \leq 0,05$) e ABTS (Tabela 5). No entanto, nos calos de epicótilo e raiz, não foi observada uma forte correlação ($P > 0,05$) entre os compostos fenólicos e a atividade antioxidante (Tabela 5).

Tabela 5. Correlação de Pearson entre as variáveis TPC, CTF, DPPH, ABTS e Fosfomolibdênio em explantes e calos de *A. cearensis*. (Continua)

Partes da planta (Folha, cotilédono, epicótilo y raiz) de <i>A. cearensis</i>	TPC	CTF	DPPH	ABTS
CTF	0,97*			
DPPH	-0,59	-0,68		
ABTS	-0,60	-0,51	0,10	
Fosfomolibdênio	-0,64	-0,70*	0,38	0,68
Calo derivado da folha	TPC	CTF	DPPH	ABTS
CTF	0,58			
DPPH	-0,60*	-0,87*		
ABTS	0,58	0,55	-0,56	
Fosfomolibdênio	0,39	0,84	-0,69	0,12
Calo derivado do cotilédono	TPC	CTF	DPPH	ABTS
CTF	0,87*			
DPPH	0,37	0,25		
ABTS	0,79*	0,85*	0,55	
Fosfomolibdênio	0,42	0,33	-0,13	0,16
Calo derivado do epicótilo	TPC	CTF	DPPH	ABTS
CTF	0,07			
DPPH	-0,40	0,66		
ABTS	0,13	0,59	0,33	
Fosfomolibdênio	0,49	0,57	0,35	0,67

Tabela 5. Correlação de Pearson entre as variáveis TPC, CTF, DPPH, ABTS e Fosfomolibdênio em explantes e calos de *A. cearensis*. (Conclusão)

Calo derivado da raiz	TPC	CTF	ABTS
CTF	0,60		
ABTS	-0,36	0,12	
Fosfomolibdênio	0,37	0,02	-0,39

*Os valores de correlação são significativos em $p < 0,05$. As abreviações correspondem a TPC- teor fenólico total, CTF- teor total de flavonoides, DPPH- 2,2-difenil-1-picrilhidrazil, ABTS- 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)

As diferenças nas correlações observadas entre os diferentes ensaios antioxidantes podem ser explicadas pelas diversas respostas dos compostos fenólicos a diferentes mecanismos de reação antioxidante, bem como pela variabilidade nos produtos gerados por esses processos (Lfitat *et al.*, 2021). Além disso, essas diferenças podem ser atribuídas às várias moléculas bioativas presentes em cada extrato e às concentrações de cada componente (Dalli *et al.*, 2021; Ranade; Joshi; Kudale, 2023).

Outra explicação é que a atividade antioxidante varia conforme o material vegetal (Koufan *et al.*, 2020). Isso concorda com as descobertas de Dib *et al.*, (2015), que encontraram que a capacidade eliminadora de DPPH varia significativamente conforme o cultivar, a parte da planta utilizada (folha, semente, calos) e o momento da colheita. Em seu estudo, as sementes mostraram a atividade eliminadora de DPPH mais baixa. Em *A. cearensis* tanto nos explantes como nos calos, também se observa uma grande variabilidade entre os compostos fenólicos e cada atividade antioxidante avaliada.

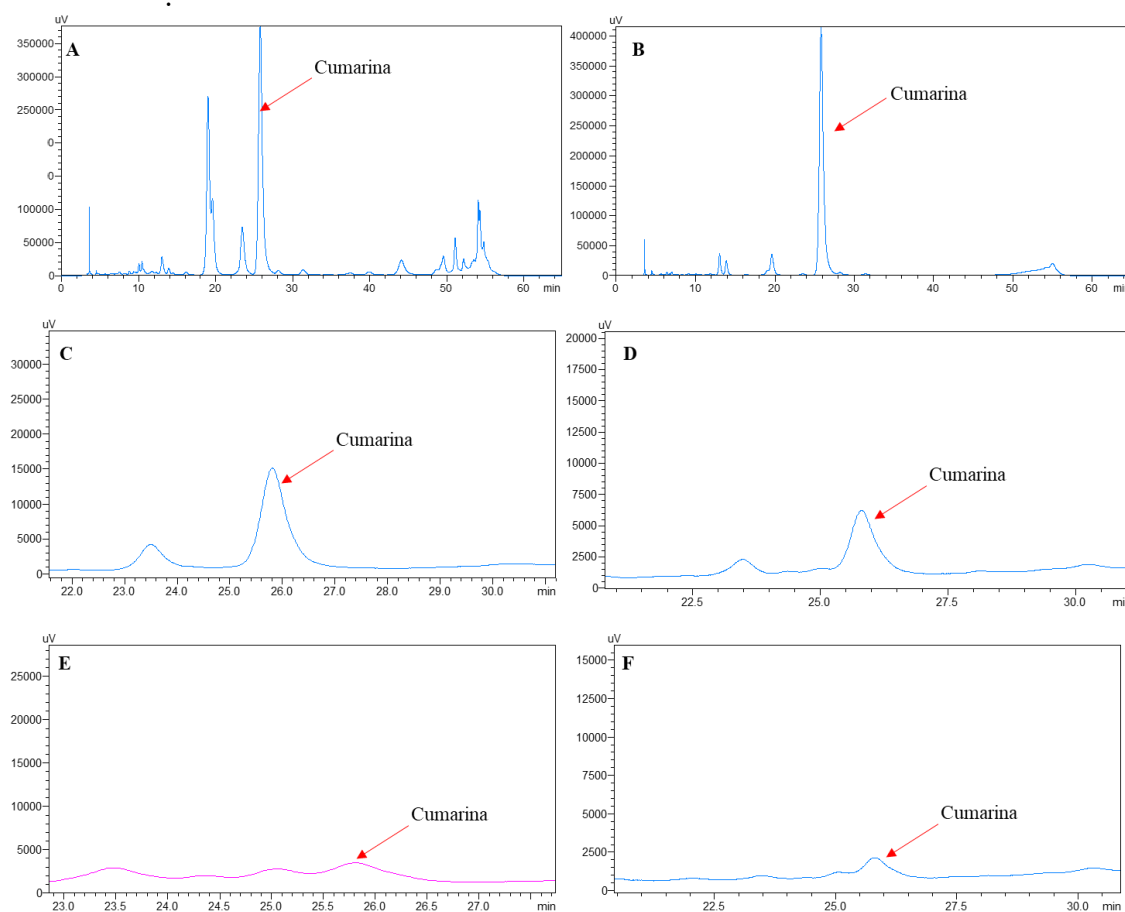
Em alguns casos, a quantidade de compostos fenólicos não está relacionada com a atividade antioxidante, como foi observado nos calos de epicótilo e raiz de *A. cearensis*. Algo similar ocorreu com *Argania spinosa* (L.), nas folhas não houve relação entre TPC e atividade antioxidante, ao contrário do que foi registrado nas sementes e calos (Koufan *et al.*, 2020). De maneira semelhante, nos extratos de *T. polium*, foi observada uma correlação fraca entre a atividade antioxidante medida pelo método de fosfomolibdênio e o teor de fenóis, o que sugere que essa capacidade não é determinada apenas pelos polifenóis presentes nos extratos (El Atki *et al.*, 2019). Essa situação pode ser explicada pelo fato de que a atividade antioxidante depende da qualidade dos compostos fenólicos e não apenas da quantidade. Além disso, essa variabilidade pode ser atribuída à presença de outros fitoquímicos, além dos polifenóis, e a um possível efeito sinérgico entre eles (Azizi *et al.*, 2021). Neste estudo, foram

utilizados três testes para avaliar a atividade antioxidante, mas cada um variou de acordo com o tipo de calo. Portanto, para obter uma compreensão completa do mecanismo de ação dos diferentes compostos fenólicos, é necessário avaliar vários testes de antioxidantes, já que cada um tem um mecanismo de ação diferente.

4.6. Quantificação de cumarina utilizando HPLC

No presente estudo, por meio de análise de HPLC, encontrou-se cumarina em diferentes concentrações tanto na planta quanto nos calos, com um tempo de retenção de aproximadamente 25,25 minutos (Figura 7).

Figura 6. A cromatografia de HPLC mostra o pico de cumarina (tempo de retenção ~ 25,25) da folha (A), epicótilo (B), calo do cotilédone (1T+1-2,4D) (C), calo da raiz (1T+1-2,4D) (D), calo do epicótilo (1T+1-2,4D) (E) e calo da folha (1T+1-2,4D) (F) de A.



Em plantas de *A. cearensis* cultivadas in vitro com 30 dias de idade, observou-se que o epicótilo ($1516,73 \pm 4,10 \mu\text{g g}^{-1}$ MF) apresentou a maior quantidade de cumarina ($p \leq 0,05$), seguida do cotilédone ($1427,56 \pm 17,75 \mu\text{g g}^{-1}$ MF), folha ($1299,93 \pm 36,70 \mu\text{g g}^{-1}$ MF) e raiz ($152,75 \pm 3,16 \mu\text{g g}^{-1}$ MF) (Tabela 6). Em relação aos calos de *A. cearensis*, observou-se que o

calo de cotilédone formado pelo tratamento 1T+1A exibiu a maior concentração de cumarina, registrando $31,88 \pm 0,10 \mu\text{g g}^{-1}$ MF, em comparação com todos os tratamentos de RCV e calos dos explantes folha, epicótilo e raiz. Nas folhas, a concentração mais elevada de cumarina foi evidenciada no tratamento 1T+1A, com $4,48 \pm 0,09 \mu\text{g g}^{-1}$ MF. No epicótilo, o tratamento 5T+1A apresentou o valor mais alto, alcançando $1,82 \pm 0,01 \mu\text{g g}^{-1}$ MF, enquanto na raiz, a maior quantidade de cumarina foi observada no tratamento 1T+1-2,4D, com $15,75 \pm 0,25 \mu\text{g g}^{-1}$ MF (Tabela 6).

Tabela 6. Cumarina em explantes e calos de *A. cearensis* submetidos a diferentes combinações de reguladores de crescimento

Cumarina ($\mu\text{g g}^{-1}$ MF) em calos y explantes de <i>A. cearenses</i>			
Explantes			
Folha	Cotilédone	Epicótilo	Raiz
1299,93 $\pm$ 36,70 c	1427,56 $\pm$ 17,75 b	1516,73 $\pm$ 4,10 a	152,75 $\pm$ 3,16 d
Calos de folha			
5T+1A (mg L⁻¹)	1T+1A (mg L⁻¹)	1T+1-24D (mg L⁻¹)	
0,43 $\pm$ 0,01 c	4,48 $\pm$ 0,09 a	1,40 $\pm$ 0,02 b	
Calos de cotilédone			
5T+1A (mg L⁻¹)	1T+1A (mg L⁻¹)	1T+1-24D (mg L⁻¹)	
4,11 $\pm$ 0,02 c	31,88 $\pm$ 0,10 a	21,12 $\pm$ 0,13 b	
Calos do epicótilo			
5T+1A (mg L⁻¹)	1T+1A (mg L⁻¹)	1T+1-24D (mg L⁻¹)	
1,82 $\pm$ 0,01 a	0,64 $\pm$ 0,01 c	1,31 $\pm$ 0,02 b	
Calos da raiz			
5T+1A (mg L⁻¹)	1T+1A (mg L⁻¹)	1T+1-24D (mg L⁻¹)	
9,36 $\pm$ 0,09 b	9,29 $\pm$ 0,04 b	15,75 $\pm$ 0,25 a	

Nota: As abreviações correspondem a MF - massa fresca, TDZ - thidiazuron, ANA - ácido 1-naftalenacético, 2,4-D - ácido 2,4-diclorofenoxiacético, 5T+1A - 5 mg L⁻¹ TDZ + 1 mg L⁻¹ ANA, 1T+1A - 1 mg L⁻¹ TDZ + 1 mg L⁻¹ ANA e 1T+1-2,4D - 1 mg L⁻¹ TDZ + 1 mg L⁻¹ 2,4-D. Os valores médios $\pm$ erro padrão seguidos de letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Embora os compostos fenólicos sejam sintetizados em todas as partes da planta, seus teores em vários órgãos mudam durante o crescimento e desenvolvimento da planta (Chepel; Lisun; Skrypnik, 2020). Em investigações anteriores sobre *A. cearensis*, encontrou-se cumarina em extratos de sementes (Monteiro *et al.*, 2017), casca do tronco (Canuto; Silveira;

Bezerra, 2010), plântulas de 7 meses (De Araújo *et al.*, 2022) e partes aéreas de plantas cultivadas *in vitro* (Vasconcelos *et al.*, 2019). No entanto, não se havia investigado previamente a distribuição de cumarina em uma planta *in vitro*, separando e analisando cada uma de suas partes para determinar a produção específica em cada seção.

Os resultados revelam que todas as partes da planta e os calos de *A. cearensis* contêm cumarina, o que é significativo devido às múltiplas propriedades farmacológicas desta substância. Especificamente, observou-se que a cumarina possui ações anti-inflamatórias, antioxidantes, antibacterianas, antivirais, antitrombóticas, antimutagênicas e anti-hipertensivas (Oliveira *et al.*, 2020b).

Numerosos estudos descreveram as propriedades farmacológicas da cumarina isolada de *A. cearensis* em vários sistemas biológicos, que vão desde efeitos antimicrobianos até anti-inflamatórios. Em particular, a cumarina isolada desta espécie mostrou uma alta toxicidade para os promastigotas de *Leishmania chagasi* (Monteiro *et al.*, 2017), exerceu atividade anti-inflamatória em células microgлияis ativadas por lipopolissacarídeos (De Araújo *et al.*, 2022) e também reduziu o estresse oxidativo, a inflamação e a morte neuronal induzida pela excitotoxicidade do glutamato, eventos centrais na maioria das neuropatologias, incluindo a doença de Alzheimer e a doença de Parkinson (Silva *et al.*, 2020).

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, o presente estudo conclui que o tipo de explante e as combinações de reguladores de crescimento vegetal (TDZ + ANA e TDZ + 2,4-D) desempenham um papel crucial na indução de calos, na produção de compostos fenólicos e na atividade antioxidante em *A. cearensis*. Todos os tipos de explantes (folha, cotilédono, epicótilo e raiz) foram capazes de induzir calos, mas com variações na massa e produção de compostos fenólicos.

Apesar da presença de compostos fenólicos e da atividade antioxidante, não foi encontrada uma correlação consistente entre eles. Alguns compostos antioxidantes se correlacionaram apenas com métodos específicos de avaliação de atividade antioxidante, sugerindo que os componentes responsáveis por essa atividade ainda não estão claramente identificados. Portanto, investigações adicionais são necessárias para identificar os compostos antioxidantes presentes nos extratos vegetais, como vitaminas e carotenóides, e para aplicar outros métodos de avaliação da atividade antioxidante, a fim de esclarecer melhor os resultados obtidos.

No entanto, o estudo é muito importante, pois os calos de *A. cearensis* têm o potencial de produzir compostos fenólicos e apresentam atividade antioxidante que pode ser útil para a indústria farmacêutica. Além disso, é possível isolar compostos fenólicos de interesse, como a cumarina, para sua produção em larga escala. Medidas adicionais, como a adição de elicitores, podem ser adotadas para aumentar a produção desses compostos.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, A. *et al.* Development of a rich fraction in phenolic compounds with high antioxidant and antimicrobial activity in *Amburana cearensis* seeds extracts. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 11, n. 41, p. 648–655, 3 nov. 2017.
- AHMAD, W. *et al.* Thidiazuron-induced efficient biosynthesis of phenolic compounds in callus culture of *Ipomoea turbinata* Lagasca and Segura. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 55, n. 6, p. 710–719, 1 dez. 2019.
- ALI, H. M. *et al.* The multipotent thidiazuron: A mechanistic overview of its roles in callogenesis and other plant cultures in vitro. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 69, n. 6, p. 2624–2640, 1 dez. 2022.
- ALMEIDA, J. *et al.* *Amburana cearensis* – Uma revisão química e farmacológica. **Scientia Plena**, v. 6, n. 11, 2010.
- APAK, R. Current issues in antioxidant measurement. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 33, p. 9187–9202, 12 jun. 2019.
- ARAUJO, J. R. *et al.* Antioxidant and in vitro cytogenotoxic properties of *Amburana cearensis* (Allemão) A.C.Sm. leaf extract. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 1, p. 104–112, 2021.
- ARAUJO, M.; DANTAS, B. Umburana-de-cheiro *Amburana cearensis* (Allemão) A.C.Sm. **Informativo Abrates**, v. 29, n. 1, 2018.
- ARULVENDHAN, V.; SARAVANA, P.; RAJAGANESH, R. Molecular identification and phytochemical analysis and bioactivity assessment of *Catharanthus roseus* leaf extract: exploring antioxidant potential and antimicrobial activities. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2024.
- AZIZI, S. *et al.* Quantification of secondary metabolites and the evaluation of the in vitro antioxidant activity of the *Argan tree* of eastern Morocco. **Materials Today: Proceedings**, v. 45, p. 7314–7320, 2021.
- BINTE MOSTAFIZ, S.; WAGIRAN, A. Efficient callus induction and regeneration in selected *Indica Rice*. **Agronomy**, v. 8, n. 5, p. 77, 21 maio 2018.
- BLOCH, R. Wound healing in higher plants. II. **The Botanical Review**, v. 18, n. 10, p. 655–679, dez. 1952.
- BOAMPONSEM, G. A.; LEUNG, D. W. M. Use of compact and friable callus cultures to study adaptive morphological and biochemical responses of potato (*Solanum tuberosum*) to iron supply. **Scientia Horticulturae**, v. 219, p. 161–172, 17 maio 2017.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1 jan. 1995.

BRAVO, J. A. *et al.* Bioactive phenolic glycosides from *Amburana cearensis*. **Phytochemistry**, v. 50, n. 1, p. 71–74, 15 jan. 1999.

CANUTO, K. M.; SILVEIRA, E. R.; BEZERRA, A. M. E. Estudo fitoquímico de espécimens cultivados de cumaru (*Amburana cearensis* A. C. Smith). **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 662–666, 2010.

CARVALHO, P. Espécies Arbóreas Brasileiras. **Embrapa florestas**, v. 3, n. 978-85-7383-429-1, 2008.

CHEPEL, V.; LISUN, V.; SKRYPNIK, L. Changes in the content of some groups of phenolic compounds and biological activity of extracts of various parts of heather (*Calluna vulgaris* (L.) Hull) at different growth stages. **Plants**, v. 9, n. 926, p. 1–19, 2020.

CHRISTODOULOU, M. C. *et al.* Spectrophotometric methods for measurement of antioxidant activity in food and pharmaceuticals. **Antioxidants**, v. 11, n. 11, p. 2213, 8 nov. 2022.

CHUNG, H. H.; OUYANG, H. Y. Use of thidiazuron for high-frequency callus induction and organogenesis of wild strawberry (*Fragaria vesca*). **Plants**, v. 10, n. 1, p. 67, 30 dez. 2021.

COSTA, T. A. C. *et al.* Phytochemical profile of seed extracts of plants typical of the Brazilian semiarid and their potential application in brackish water desalination. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 9, p. 1694–1703, 1 set. 2016.

DALLI, M. *et al.* Evaluation of the in vitro antioxidant activity of different extracts of *Nigella sativa* L. seeds, and the quantification of their bioactive compounds. **Materials Today: Proceedings**, v. 45, p. 7259–7263, 2021.

DAR, S. A. *et al.* Effect of plant growth regulators on in vitro induction and maintenance of callus from leaf and root explants of *Atropa acuminata* Royal ex Lindl. **Biotechnology Reports**, v. 32, p. e00688, 1 dez. 2021.

DE ARAÚJO, A. B. *et al.* Antineuroinflammatory effect of *Amburana cearensis* and its molecules coumarin and amburoside A by inhibiting the MAPK signaling pathway in LPS-activated BV-2 microglial cells. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2022, 2022.

DE OLIVEIRA, M. E. B. S.; SARTORATTO, A.; CARDOSO, J. C. In Vitro calli production resulted in different profiles of plant-derived medicinal compounds in *Phyllanthus amarus*. **Molecules**, v. 25, n. 24, p. 5895, 12 dez. 2020.

DE VERAS, B. O. *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory activities of essential oil of the leaves of *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Smith. from the semi-arid region of Northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 317, p. 116858, 5 dez. 2023.

DIB, S. *et al.* *Argania spinosa* var. *mutica* and var. *apiculata*: Variation of fatty-acid composition, phenolic content, and antioxidant and α -amylase-inhibitory activities among varieties, Organs, and development stages. **Chemistry & Biodiversity**, v. 12, p. 1322–1337, 2015.

DIVEKAR, P. A. *et al.* Plant Secondary Metabolites as Defense Tools against Herbivores for Sustainable Crop Protection. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 5, p. 2690, 1 mar. 2022.

DOS SANTOS, L. *et al.* Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos presentes na *Amburana cearensis*. **Orbital: The Electronic Journal of Chemistry**, v. 8, n. 1, p. 44–49, 2016.

DOS SANTOS, P. H. A. *et al.* Partial characterization and antimicrobial activity of peptides from *Amburana cearensis* seeds against phytopathogenic fungi and yeasts. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 32, n. 3, p. 597–603, 27 nov. 2010.

DUAN, S. *et al.* Optimization of callus induction and proliferation of *Paeonia lactiflora* Pall. and Agrobacterium-mediated genetic transformation. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 996690, 16 dez. 2022.

EL ATKI, Y. *et al.* Total phenolic and flavonoid contents and antioxidant activities of extracts from *Teucrium polium* growing wild in Morocco. **Materials Today: Proceedings**, v. 13, p. 777–783, 1 jan. 2019.

FARIAS, D. F. *et al.* Water extracts of Brazilian leguminous seeds as rich sources of larvicidal compounds against *Aedes aegypti* L. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 82, n. 3, p. 585–594, 2010.

FERREIRA, P. M. P. *et al.* Study of the antiproliferative potential of seed extracts from Northeastern Brazilian plants. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 83, n. 3, p. 1045–1058, 2011.

FLIEGER, J. *et al.* Antioxidants: Classification, natural sources, activity/capacity measurements, and usefulness for the synthesis of nanoparticles. **Materials**, v. 14, n. 15, p. 4135, 25 jul. 2021.

GONDVAL, M.; CHATURVEDI, P.; GAUR, A. K. Thidiazuron-induced high frequency establishment of callus cultures and plantlet regeneration in *Aconitum balfourii* Stapf.: An endangered medicinal herb of North-West Himalayas. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 15, p. 251–255, 2016.

GOUVEIA, B. B. *et al.* Effect of ovarian tissue transportation in *Amburana cearensis* extract on the morphology and apoptosis of goat preantral follicles. **Anim. Reprod**, v. 12, n. 2, p. 316–323, 2015.

GOUVEIA, B. B. *et al.* *Amburana cearensis* leaf extract protects against cisplatin-induced ovarian damage through regulation of p-PTEN and p-Akt proteins in mice. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 25, n. 6, p. 683, 1 jun. 2022.

GRĄBKOWSKA, R. *et al.* Callus cultures of *Harpagophytum procumbens* (Burch.) DC. ex Meisn.; production of secondary metabolites and antioxidant activity. **South African Journal of Botany**, v. 103, p. 41–48, 2016.

GULCIN, İ. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. **Archives of Toxicology**, v. 94, n. 3, p. 651–715, 16 mar. 2020.

GUO, G. *et al.* Explant, medium, and plant growth regulator (PGR) affect induction and proliferation of callus in *Abies koreana*. **Forests**, v. 12, n. 10, p. 1388, 11 out. 2021.

IBRAHIM, M. Role of endogenous and exogenous hormones in bioactive compound production in medicinal plants via in vitro culture technique. Plant hormones: recent advances, new perspectives and applications. p. 131–144, 05 abr 2022.

IKEUCHI, M.; SUGIMOTO, K.; IWASE, A. Plant Callus: Mechanisms of induction and repression. **The Plant Cell**, v. 25, n. 9, p. 3159–3173, 28 out. 2013.

JAN, R. *et al.* Plant secondary metabolite biosynthesis and transcriptional regulation in response to biotic and abiotic stress conditions. **Agronomy**, v. 11, n. 5, p. 968, 13 maio 2021.

JAPIASSÚ, A. *et al.* Fenologia de quatro espécies arbóreas da Caatinga no Semiárido paraibano. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 11, n. 4, p. 34–43, 2016.

KARAKAS, F. P. Efficient plant regeneration and callus induction from nodal and hypocotyl explants of goji berry (*Lycium barbarum* L.) and comparison of phenolic profiles in calli formed under different combinations of plant growth regulators. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 146, p. 384–391, 1 jan. 2020.

KHAN, T. *et al.* Differential effects of thidiazuron on production of anticancer phenolic compounds in callus cultures of *Fagonia indica*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 179, n. 1, p. 46–58, 1 abr. 2016.

KIM, J. H. *et al.* In vitro callus induction and growth for medicinal use of an endangered Korean native plant, *Glochidion chodoense* C. S. Lee & H. T. **Im. Rhizosphere**, v. 29, p. 100863, 1 mar. 2024.

KOŁTON, A. *et al.* Biosynthesis regulation of folates and phenols in plants. **Scientia Horticulturae**, v. 291, p. 110561, 2022.

KOUFAN, M. *et al.* Determination of antioxidant activity, total phenolics and fatty acids in essential oils and other extracts from callus culture, seeds and leaves of *Argania spinosa* (L.) Skeels. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 141, p. 217–227, 2020.

LFITAT, A. *et al.* Comparative assessment of total phenolics content and in vitro antioxidant capacity variations of macerated leaf extracts of *Olea europaea* L. and *Argania spinosa* (L.) Skeels. **Materials Today: Proceedings**, v. 45, p. 7271–7277, 2021.

LI, H. Y. *et al.* Highly effective organogenesis and somatic embryogenesis of *Clivia*. **Scientia Horticulturae**, v. 306, p. 111443, 15 dez. 2022.

LOUREIRO, M. B. *et al.* Aspectos morfoanatômicos e fisiológicos de sementes e plântulas de *Amburana cearensis* (Fr. All.) A.C. Smith (Leguminosae - Papilionoideae). **Revista Árvore**, v. 37, n. 4, p. 679–689, jul. 2013.

MACEDO, J. G. F. *et al.* Analysis of the variability of therapeutic indications of medicinal species in the Northeast of Brazil: Comparative study. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, 23 abr. 2018.

MACÊDO, M. J. F. *et al.* Fabaceae medicinal flora with therapeutic potential in Savanna areas in the Chapada do Araripe, Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 28, n. 6, p. 738–750, 1 nov. 2018.

MAHENDRA, C. *et al.* Biopotentiality of leaf and leaf derived callus extracts of *Salacia macroserpa* Wight. — An endangered medicinal plant of Western Ghats. **Industrial Crops and Products**, v. 143, p. 111921, 1 jan. 2020.

MAIA, A.; MARINHO, L.; NELSON, D. Certificação da amburana no envelhecimento da cachaça. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 12, 2020.

MALOTHU, G. S.; MARKA, R.; NANNA, R. S. Effect of plant growth regulators on callus induction in *Solanum torvum* SW: A medicinal plant. **Vegetos**, p. 1–7, 8 set. 2023.

MAMDOUH, D.; SMETANSKA, I. Optimization of Callus and Cell Suspension Cultures of *Lycium schweinfurthii* for Improved Production of Phenolics, Flavonoids, and Antioxidant Activity. **Horticulturae**, v. 8, n. 5, p. 394, 1 maio 2022.

MASTUTI, R.; MUNAWARTI, A.; FIRDIANA, E. R. The combination effect of auxin and cytokinin on in vitro callus formation of *Physalis angulata* L. - A medicinal plant. **AIP Conference Proceedings**, v. 1908, n. 1, p. 34, 29 nov. 2017.

MAYERNI, R. *et al.* Effect of auxin (2,4-D) and cytokinin (BAP) in callus induction of local patchouli plants (*Pogostemon cablin* Benth.). **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 583, n. 1, 13 out. 2020.

MELO, C.; SOUZA, P. O.; DAMASCENO, E. Atividade farmacológica da planta *Amburana cearensis* (imburana) frente a estudo etnofarmacológico em Monte Azul-MG. **Revista Brasileira de Pesquisa em Ciências da Saúde**, v. 1, n. 2, p. 31–34, 30 set. 2014.

MONTEIRO, R. M. *et al.* Antileishmanial activity of coumarin from *Amburana cearensis* seeds. **Open Access Library Journal**, v. 4, n. 11, p. 1–10, 1 nov. 2017.

MOSOH, D. A. *et al.* Optimizing callus induction and indirect organogenesis in non-dormant corm explants of *Gloriosa superba* (L.) via media priming. **Frontiers in Horticulture**, v. 3, p. 1378098, 18 mar. 2024.

MUNTEANU, I. G.; APETREI, C. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 7, 1 abr. 2021.
MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473–497, 1962.

NAJHAH, M. Y. *et al.* Shoot multiplication and callus induction of *Labisia pumila* var. *alata* as influenced by different plant growth regulators treatments and its polyphenolic activities compared with the wild plant. **Molecules**, v. 26, n. 11, p. 3229, 27 maio 2021.

NANDY, S. *et al.* *Hemidesmus indicus* L. Br.: critical assessment of in vitro biotechnological advancements and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 20, p. 8517–8548, 1 out. 2020.

NASRAT, M. N.; SAKIMIN, S. Z.; HAKIMAN, M. Phytochemicals and antioxidant activities of conventionally propagated nodal segment and in vitro-induced callus of *Bougainvillea glabra* Choisy using different solvents. **Horticulturae**, v. 8, n. 8, p. 712, 8 ago. 2022.

OCHOA-VILLARREAL, M. *et al.* Plant cell culture strategies for the production of natural products. **BMB Reports**, v. 49, n. 3, p. 149–158, 3 mar. 2016.

OLIVEIRA, M. *et al.* Serine protease inhibition and modulatory-antibiotic activity of the proteic extract and fractions from *Amburana cearensis*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 135, p. 110946, 1 jan. 2020a.

OLIVEIRA, M. T. A. *et al.* UPLC–MS–QTOF analysis and antifungal activity of Cumaru (*Amburana cearensis*). 3 **Biotech**, v. 10, n. 12, p. 1–17, 1 dez. 2020b.

OSSIPOV, V. *et al.* The regulating effect of light on the content of flavan-3-ols and derivatives of hydroxybenzoic acids in the callus culture of the tea plant, *Camellia sinensis* L. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 101, p. 104383, 1 abr. 2022.

PATEL, P. *et al.* Phyto-factories of anti-cancer compounds: A tissue culture perspective. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 11, n. 1, p. 1–21, 1 dez. 2022.

PRAKASH, S. *et al.* Exploring biotechnological approaches on in vitro callus induction and evaluation of biomedical properties of *Cleome gynandra* L. **Process Biochemistry**, v. 134, p. 316–328, 1 nov. 2023.

QUAMRUZZAMAN, M. *et al.* Improving performance of salt-grown crops by exogenous application of plant growth Regulators. **Biomolecules**, v. 11, n. 6, p. 788, 24 maio 2021.

RAFIQUZZAMAN, S. M. *et al.* Phytochemical composition and antioxidant activity of Edible red alga *Hypnea musciformis* from Bangladesh. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 40, n. 5, p. 1074–1083, 1 out. 2016.

RAJPUT, S.; AGRAWAL, V. Micropropagation of *Atropa acuminata* Royle ex Lindl. (a critically endangered medicinal herb) through root callus and evaluation of genetic fidelity, enzymatic and non-enzymatic antioxidant activity of regenerants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 42, n. 11, p. 1–17, 1 nov. 2020.

RANADE, R.; JOSHI, N.; KUDALE, S. Comparative secondary metabolite expression in callus cultures and mother plant in *Barleria prionitis* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 155, n. 3, p. 653–663, 1 dez. 2023.

RANĐELOVIĆ, S.; BIPAT, R. A Review of coumarins and coumarin-related compounds for their potential antidiabetic effect. **Clinical Medicine Insights: Endocrinology and Diabetes**, v. 14, 14 set. 2021.

RAWAT, J. M. *et al.* In vitro production of steroidal saponin, total phenols and antioxidant activity in callus suspension culture of *Paris polyphylla* Smith: an important Himalayan medicinal plant. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, p. 1225612, 10 ago. 2023.

RE, R. *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9–10, p. 1231–1237, 1 maio 1999.

SAGHARYAN, M. *et al.* Optimization of callus induction with enhancing production of phenolic compounds production and antioxidants activity in callus cultures of *Nepeta binaloudensis* Jamzad (Lamiaceae). **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 18, n. 4, p. e2621, 1 set. 2020.

SALAM, U. *et al.* Plant Metabolomics: An overview of the role of primary and secondary metabolites against different environmental stress factors. **Life**, v. 13, n. 3, 1 mar. 2023.

SANTIAGO, W. D. *et al.* Physicochemical profile and determination of volatile compounds in cachaça stored in new oak (*Quercus sp.*), amburana (*Amburana cearensis*), jatoba (*Hymenaea caribouril*), balsam (*Myroxylon peruiferum*) and peroba (*Paratecoma peroba*) casks by SPME-GC–MS. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 122, n. 4, p. 624–634, 1 out. 2016.

SAVI, P. DO R. S. *et al.* Análise de flavonoides totais presentes em algumas frutas e hortaliças convencionais e orgânicas mais consumidas na região Sul do Brasil. **DEMETRA: Alimentação, Nutrição & Saúde**, v. 12, n. 1, p. 275–287, 4 mar. 2017.

SCHUSTER, B.; RÉTEY, J. The mechanism of action of phenylalanine ammonia-lyase: The role of prosthetic dehydroalanine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 18, p. 8433, 8 ago. 1995.

SELEME, E. P. *et al.* A Taxonomic review and a new species of the south American woody genus *Amburana* (Leguminosae, Papilionoideae). **Phytotaxa**, v. 212, n. 4, p. 249–263, 2015.

SHAFRAS, M.; SABARAGAMUWA, R.; SUWAIR, M. Role of dietary antioxidants in diabetes: An overview. **Food Chemistry Advances**, v. 4, p. 100666, 1 jun. 2024.

SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 820–897, 1 out. 2015.

SHALABY, E.; SHANAB, S. M. M. Antioxidant compounds, assays of determination and mode of action. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 7, n. 10, p. 528–539, 2013.

SHARMA, M. *et al.* Enhancement of secondary metabolites in cultured plant cells through stress stimulus. **American Journal of Plant Physiology**, v. 6, n. 2, p. 50–71, 2011.

SHASMITA *et al.* Recent advances in tissue culture and secondary metabolite production in *Hypericum perforatum* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 154, n. 1, p. 13–28, 1 jul. 2023.

SHI, J. *et al.* Integrated metabolomic and transcriptomic strategies to understand the effects of dark stress on tea callus flavonoid biosynthesis. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 155, p. 549–559, 1 out. 2020.

SHIADE, S. R. G. *et al.* Plant metabolites and signaling pathways in response to biotic and abiotic stresses: Exploring bio stimulant applications. **Plant Stress**, v. 12, p. 100454, 1 jun. 2024.

SIDDEEG, A. *et al.* Mode of action and determination of antioxidant activity in the dietary sources: An overview. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 3, p. 1633–1644, 1 mar. 2021.

SILVA, J. H. *et al.* *Amburana cearensis*: Pharmacological and neuroprotective effects of its compounds. **Molecules**, v. 25, n. 15, p. 3394, 27 jul. 2020.

SILVEIRA, Z. DE S. *et al.* Phytochemistry and biological activities of *Amburana cearensis* (Allemão) ACSm. **Molecules**, v. 27, n. 2, 1 jan. 2022.

TANG, Q. *et al.* An Optimized protocol for indirect organogenesis from root explants of *Agapanthus praecox* subsp. *orientalis* ‘Big Blue’. **Horticulturae**, v. 8, n. 8, p. 715, 9 ago. 2022.

VALENZUELA-ATONDO, D. A. *et al.* Antioxidant activity of in vitro plantlets and callus cultures of *Randia echinocarpa*, a medicinal plant from northwestern Mexico. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 56, n. 4, p. 440–446, 1 ago. 2020.

VASCONCELOS, J. N. C. *et al.* Stimulation of 6-benzylaminopurine and meta-topolin-induced in vitro shoot organogenesis and production of flavonoids of *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Smith). **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 22, p. 101408, 1 nov. 2019.

VIGNESH, A. *et al.* Nutritional assessment, antioxidant, anti-inflammatory and antidiabetic potential of traditionally used wild plant, *Berberis tinctoria* Lesch. **Trends in Phytochemical Research**, v. 2, n. 2, p. 71, 1 jun. 2021.

VRUNDHA, C. P.; THOMAS, T. D. Indirect shoot regeneration from root explants, assessment of clonal fidelity of regenerated plants using SCoT primers and antioxidant analysis in *Thottea siliquosa* (Lamk.) Ding Hou. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 155, p. 255–266, 2023.

WAHYUNI, D. K. *et al.* Growth, secondary metabolite production, and in vitro antiparasitic activity of *Sonchus arvensis* L. callus under dolomite [CaMg(CO₃)₂] treatment. **PLOS ONE**, v. 16, n. 8, p. e0254804, 1 ago. 2021.

YAN, H. *et al.* Exploration and development of artificially synthesized plant growth regulators. **Advanced Agrochem**, v. 3, n. 1, p. 47–56, 1 mar. 2024.

YAOWACHAI, W.; LUECHA, P.; TARATIMA, W. In vitro callus induction and evaluation of antioxidant activity of *Rhinacanthus nasutus* (L.) Kurz. **Biology Methods and Protocols**, v. 8, n. 1, 10 jan. 2023.

YAZDANIAN, E. *et al.* Elicitation effects on some secondary metabolites and antioxidant activity in callus cultures of *Allium jesdianum* Boiss. & Buhse.: Methyl jasmonate and putrescine. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 194, n. 2, p. 601–619, 1 fev. 2022.

ZHANG, K. X. *et al.* Cell culture of *Euphorbia fischeriana* and enhancement of terpenoid accumulation through MeJA elicitation. **Industrial Crops and Products**, v. 207, p. 117781, 1 jan. 2024.

ZITHA, E. Z. M. *et al.* Changes in the bioactive compounds and antioxidant activity in red-fleshed dragon fruit during its development. **Scientia Horticulturae**, v. 291, p. 110611, 3 jan. 2022.