

Indução de calos friáveis em explantes foliares e segmentos nodais de pau-ferro (*Caesalpinia ferrea*)

Induction of friable callus in leaf explants and nodal segments of ironwood (*Caesalpinia ferrea*)

Daniel da Silva^{1,2*}, Angela Maria Imakawa², Flavio Mauro Souza Bruno³ e Paulo de Tarso Barbosa Sampaio^{2,3}

¹ Rede Bionorte, Escola Superior de Ciências da Saúde (ESA), Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Avenida Carvalho Leal 1777, Cachoeirinha, 69065-001, Manaus, Brasil

² Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, Escola Superior de Tecnologia (EST), Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Avenida Darcy Vargas 1200, Parque Dez de Novembro, 69065-020, Manaus, Brasil

³ Departamento de Silvicultura Tropical, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Avenida André Araújo, Caixa Postal 2936, 69011-970, Manaus, Brasil
(*E-mail: ds.dbb@uea.edu.br)

<http://dx.doi.org/10.19084/RCA17311>

Recebido/received: 2017.12.02

Recebido em versão revista/received in revised form: 2018.03.23

Aceite/accepted: 2018.05.24

RESUMO

Caesalpinia ferrea Mart., é uma espécie arbórea que ocorre na Amazônia, muito utilizada contra bronquites, reumatismo e úlceras gástricas. Estudos recentes revelam que o princípio ativo denominado de “Pau-ferrol A” encontrado em plântulas jovens apresenta atividade contra a topoisomerase II humana. Objetivou-se com este trabalho obter calos friáveis em explantes foliares e segmentos nodais para estudos posteriores em embriogênese somática. Avaliou-se o efeito de diferentes concentrações de 2,4-D e ANA isoladamente ou em combinação com BAP e TDZ na calogênese. Nossos resultados demonstraram que ambos os tipos de explantes selecionados apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) na indução, morfologia e coloração dos calos. A indução máxima de calos (90%) foi obtida a partir de explantes de segmentos nodais cultivados em meio MS suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e 5,0 mg L⁻¹ de TDZ, mantendo os explantes em condição de fotoperíodo de 16 horas por 30 dias com temperatura de 25°C ± 2°C. Os resultados obtidos de calogênese de *C. ferrea* possibilitam estudos futuros na área de embriogênese somática.

Palavras-chave: Cultura de calos, Regeneração, *Caesalpinia ferrea*, Planta medicinal.

ABSTRACT

Caesalpinia ferrea Mart., is a tree species that occurs in the Amazon, widely used against bronchitis, rheumatism and gastric ulcers. Recent studies have shown that the substance called “Pau-ferrol A” found in young seedlings has activity against human topoisomerase II. The objective of this work was to obtain friable callus from leaf explants and nodal segments for further studies on somatic embryogenesis. The effect of different concentrations of 2,4-D and ANA alone or in combination with BAP and TDZ on callogenesis was evaluated. Our results demonstrated that both types of explants selected showed significant differences ($p < 0.05$) in callus induction, morphology and coloring. Maximum callus induction (90%) was obtained from nodal segment explants cultured in MS medium supplemented with 1.0 mg L⁻¹ of 2,4-D and 5.0 mg L⁻¹ of TDZ, maintaining the explants in photoperiod condition of 16 hours for 30 days with a temperature of 25°C ± 2°C. The results obtained from the callogenesis of *C. ferrea* made possible future studies on somatic embryogenesis.

Keywords: Callus culture, Regeneration, *Caesalpinia ferrea*, Medicinal plant.

INTRODUÇÃO

Caesalpinia ferrea Mart. (Fabaceae), popularmente conhecida como “pau-ferro” ou “jucá”, é uma espécie arbórea amplamente utilizada na medicina popular principalmente na região Norte e Nordeste do Brasil (Coelho-Ferreira, 2009; Oliveira *et al.*, 2010). Plântulas jovens de *C. ferrea* possuem um princípio ativo denominado de “Pau-ferrol A” que atua contra a topoisomerase II humana, e inibe o crescimento das células por meio da indução de apoptose, podendo ser utilizado como importante ferramenta no tratamento da leucemia HL60 humana (Nozaki *et al.*, 2007; Ohira *et al.*, 2013). Alguns grupos de pesquisas estão desenvolvendo estudos promissores visando à obtenção de produtos fitoterápicos a serem utilizados em seres humanos (Nakamura *et al.*, 2002; Lima *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2012; Gallão *et al.*, 2013; Lopes *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013; Nawwar *et al.*, 2015; Fernandes *et al.*, 2016).

O uso desta espécie vem aumentando de maneira significativa nos últimos anos, o que levou à exploração indiscriminada de todos os indivíduos adultos em idade de reprodução, além de causar a erosão genética, reduzindo as populações nativas e comprometendo a sua regeneração natural (Benedito *et al.*, 2012). Estudos indicam que a propagação de *C. ferrea* é viável por sementes (Scalon *et al.*, 2011), por micropropagação (Silva *et al.*, 2018) e por mudas em condições *ex vitro* (Lenhard *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2013). Entretanto, a baixa produção de sementes aliada à elevada dormência tegumentar de *C. ferrea* (Coelho *et al.*, 2010), tem limitado a produção de mudas visando a reposição das populações naturais e os plantios *ex situ*, sendo necessário e urgente o emprego de técnicas de reprodução, a exemplo da cultura *in vitro*, que é uma das principais ferramentas da biotecnologia vegetal que explora a totipotência da natureza das células vegetais (Bhojwani e Dantu, 2013a), possibilitando a reprodução *in vitro* de genótipos superiores (George *et al.*, 2008; Loyola-Vargas e Ochoa-Alejo, 2012). Desse modo, diversas partes da planta como gemas, meristemas apicais, embriões, segmentos de caule e raízes podem ser cultivadas *in vitro* em meio nutritivo apropriado em ambiente asséptico (George *et al.*, 2008).

A cultura de calos *in vitro* é considerada uma técnica eficiente para obtenção de embriões

somáticos, possibilitando elevadas taxas de multiplicação que resultam em embriões que se desenvolvem em plantas completas (Haslam e Yeung, 2011; Bhojwani e Dantu, 2013b; Isah, 2016). A organogênese indireta de *C. ferrea* pode constituir uma alternativa importante para multiplicação em larga escala de genótipos selecionados para desenvolvimento de fitofármacos (Ali *et al.*, 2016).

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes concentrações das auxinas 2,4-D e ANA e sua interação com as citocininas TDZ e BAP na indução de calos, em explantes foliares e segmentos nodais de *C. ferrea*, visando a embriogênese somática e/ou suspensão celular.

MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos experimentais foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV) pertencente à Escola Superior de Tecnologia (EST) da Universidade do Estado do Amazonas (UEA). Foram utilizados como explantes segmentos nodais e folhas cotiledonares que foram excisados de plântulas micropropagadas e cultivadas em meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962) sem a adição de reguladores de crescimento (Silva, 2015). Os segmentos nodais foram seccionados em fragmentos de 1 cm e as folhas em 1 cm², sendo que nos explantes foliares foram feitos pequenos cortes para aumentar o contato com o regulador de crescimento.

Os explantes foram inoculados em frascos de vidro de 250 ml, contendo 40 ml de meio de cultura MS, suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, solidificado com 7 g L⁻¹ de ágar e acrescido com diferentes concentrações das auxinas: ácido 1-naftaleno-acético (ANA) e 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), isoladamente ou em combinação com citocininas: 6-benzilaminopurina (BAP) e tidiazuron (TDZ) (Quadro 1). O pH do meio foi ajustado para 6,0 antes da autoclavagem a 120°C por 20 minutos.

As culturas foram mantidas no escuro por 7 dias em sala de crescimento, com temperatura de 25°C±2°C, e então foram incubadas sob um fotoperíodo de 16 horas por 30 dias com intensidade luminosa de 52 μmol.m⁻².s⁻¹, provenientes de duas lâmpadas fluorescentes brancas frias (GE.85W). Após 30 dias de cultivo, os explantes foram

avaliados quanto à taxa de indução (%) e natureza dos calos (cor e textura).

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado composto por seis repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída por 5 unidades experimentais (n=30). Os dados foram submetidos à análise de variância e para a comparação das médias dos tratamentos foi aplicado o teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o software ASSISTAT versão 7.7.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados (Quadro 1) mostram que os explantes de *C. ferrea* cultivados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D e ANA, isoladas ou em combinação com BAP e TDZ apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) na indução, morfologia e coloração dos calos em explantes foliares e segmentos nodais. A iniciação de calos foi alcançada a partir dos explantes dentro de 25-30 dias de inoculação.

A concentração de 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D associado com 5,0 mg L⁻¹ de TDZ no meio MS induziu a maior porcentagem (90%) de calos friáveis em explantes de segmentos nodais. Enquanto que a concentração de 5,0 mg L⁻¹ de ANA em combinação com 5,0 mg L⁻¹ de BAP promoveu a maior porcentagem (44,67%) de calos friáveis em explantes foliares (Quadro 1). Estes resultados evidenciam que o uso de auxinas associada à citocinina estimulam a formação de calo nos explantes de segmentos nodais e foliares desta espécie. As respostas às concentrações de auxinas e citocininas foram associadas à fase de desenvolvimento dos explantes, indicando que a resposta morfo genética de um tecido *in vitro* depende da interação destas classes de reguladores (Ślesak *et al.*, 2017).

Alguns estudos caracterizam os calos embriogênicos pela coloração. Aspectos translúcido-brancos ou amarelados dos calos são considerados friáveis e com potencial para formarem embriões somáticos (Singh *et al.*, 2015). Neste estudo foram observados que os calos originados de explantes foliares e segmentos nodais na interação de

Quadro 1 - Efeito de diferentes concentrações de auxinas e citocininas na indução de calos friáveis em explantes foliares e segmentos nodais de *Caesalpinia ferrea* Mart.

Reguladores de crescimento vegetal	Concentração (mg L ⁻¹)	Folhas		Segmentos nodais	
		Indução de	Cor e	Indução de	Cor e
		Calos (%)	Textura	calos (%)	textura
Controle	0,0	0,0 b	---	0,0 f	---
	1,0	0,0 b	---	10 ef	Verde claro, friável
	3,0	0,0 b	---	26 de	Verde claro, friável
2,4 D	5,0	0,0 b	---	43,33 bc	Branco, friável
	1,0	0,0 b	---	0,0 f	---
	3,0	0,0 b	---	0,0 f	---
ANA	5,0	0,0 b	---	40 cd	Verde escuro, compacto
	1,0 + 3,0	0,0 c	---	80 ab	Verde escuro, compacto
	3,0 + 5,0	26,67 a	Verde branco, friável	26,67 de	Marrom, compacto
2,4 D + TDZ	5,0 + 3,0	3,33 b	Verde branco, friável	43,33 cd	Translúcida, úmido
	1,0 + 5,0	26,67 a	Marrom, compacto	90 a	Verde claro, friável
ANA + BAP	3,0 + 3,0	0,0 b	---	86,67 a	Marrom, compacto
	5,0 + 5,0	44,67 a	Verde claro, friável	46,67 bc	Verde escuro, compacto
ANA + TDZ	1,0 + 3,0	0,0 b	---	71,42 ab	Verde escuro, compacto
	3,0 + 5,0	40 a	Verde claro, friável	80 ab	Verde claro, friável

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente, entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Duncan.

auxinas e citocininas apresentaram coloração heterogênea, podendo identificar áreas de cores translúcidas, marrom-escuro e verdes claros ou escuros (Quadro 1 e Figura 1).

Essas grandes diferenças na indução de calos podem ser explicadas quando os explantes foram mantidos nas fases escura e clara. O crescimento de tecidos vegetais organizados *in vitro* geralmente é inibido pela luz. Entretanto, as divisões celulares do explante e o crescimento de calo podem ser inibidos pela presença de luz (George *et al.*, 2008). No entanto, alguns explantes necessitam ser cultivados em condições escuras, a fim de aumentar a eficiência do calo e reduzir a secreção de compostos fenólicos, que geralmente afetam os explantes que sobrevivem (Tan *et al.*, 2010).

O efeito da interação de auxinas e citocininas associado à presença ou ausência de luz na cultura de calos de espécies medicinais da família Fabaceae têm sido relatado na literatura. Em estudos realizados com *Stryphnodendron adstringens* a presença de 2,4-D no meio de cultivo favorece a indução de calos na presença e ausência de luz, porém, quando os meios foram suplementados com baixas concentrações de BAP, na ausência de luz produziram calos com maiores rendimentos (Castro *et al.*, 2009). Werner *et al.*, (2009) observaram que os explantes de foliólolos juvenis de *Caesalpinia echinata* cultivados com baixa concentração de 2,4-D (5 e 20 mg L⁻¹) e foliólolos jovens tratados com altas concentrações de 2,4-D (50 e 100 mg L⁻¹) geraram calos sem diferenças significativas entre luz e escuro.

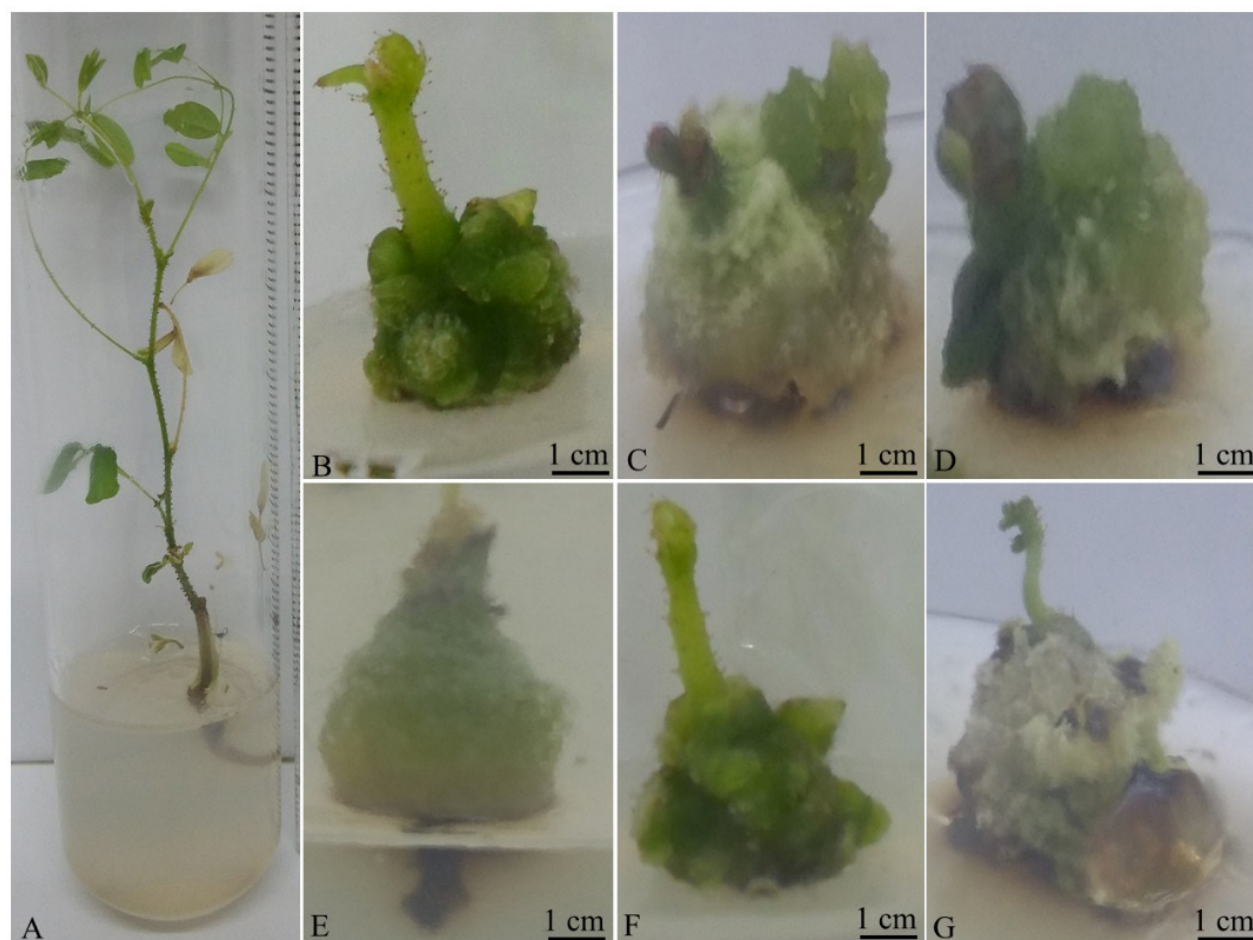


Figura 1 - Plântula de *Caesalpinia ferrea* Mart. cultivada *in vitro* como fonte de explantes utilizadas para a indução de calos friáveis (A). Segmentos nodais com formação de calos cultivados em meio MS suplementado com 2,4 D (B), ANA (C), 2,4-D e BAP (D), 2,4-D e TDZ (E), ANA e BAP (F) e ANA e TDZ (G), mantidos a 25°C±2°C sob fotoperíodo de 16 horas por 30 dias.

A formação de calos de *C. ferrea* obtidos neste estudo é atribuída à adição exógena da combinação de reguladores de crescimento ao meio de cultura que estimulou a proliferação celular devido os explantes de segmentos nodais apresentarem capacidade para a indução da calogênese. Alguns autores relatam resultados semelhantes em espécies da família Fabaceae. Fonseca *et al.* (2014) constataram que a interação de 10µM BAP e 2,0 µM de ANA estimularam a formação de calos em *Eriythina velutina*. Da mesma forma, foi observado por Rady e Nazif (1997), que a combinação de 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D com 2,0 mg L⁻¹ de BAP estimulou significativamente a produção de calos obtidos de hipocótilos de *Cassia acutifolia*. Rodrigues *et al.* (2017), em estudo realizado com *Poincianella pyramidalis*, constataram que o uso de 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D associado a 2,0 mg L⁻¹ de Picloram foi eficiente na indução de calos independentemente do tipo de explante utilizado.

CONCLUSÕES

É possível promover o estabelecimento *in vitro* de *Caesalpinia ferrea* Mart. pela formação de calos friáveis a partir de segmentos nodais.

Os explantes foliares na ausência e presença de luz associada ao uso de reguladores de crescimento induziram baixa porcentagem de calos friáveis.

A formação de calos pode ser obtida em meio MS suplementado com 1,0 mg L⁻¹ 2,4-D + 5,0 mg L⁻¹ TDZ.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pela concessão de bolsa de doutorado ao primeiro autor. Os autores agradecem ao apoio financeiro recebido da Fundação de Apoio Institucional Muraki. Ao Dr. Luiz Augusto Gomes de Souza do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) pela identificação e obtenção das sementes de *Caesalpinia ferrea* Martius.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ali, M.; Isah T. & Dipti, M.A. (2016) – Climber Plants: Medicinal Importance and Conservation Strategies. *In: Shahzad, A.; Sharma, S.; Saeed, A. & Siddiqui.* (Eds.) – *Biotechnological strategies for the conservation of medicinal and ornamental climbers*. Cham, Springer, p. 101-138.
- Benedito, C.P.; Coelho, M.F.B.; Guimarães, I.P, Amaral Junior, V.P.; Maia, S.S.S. & Batista, P.F. (2012) – Emergência e crescimento inicial de plântulas de *Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. var. *ferrea* em diferentes substratos. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, vol. 7, n. 3, p. 508-513. <http://dx.doi.org/10.5039/agraria.v7i3a1836>
- Bhojwani, S.S. & Dantu, P.K. (2013a) – Tissue and Cell Culture. *In: Bhojwani, S.S. & Dantu, P.K.* (Eds.) – *Plant Tissue Culture: An Introductory Text*. New Delhi, Springer, p. 39-50.
- Bhojwani, S.S. & Dantu, P.K. (2013b) – Conservation of Phytodiversity. *In: Thorpe, T.A. & Yeung, E.C.* (Eds.) – *Plant Tissue Culture: An Introductory Text*. New Delhi, Springer, p. 287-298.
- Castro, A.H.F.; Paiva, R.; Alvarenga, A.A. & Vitor, S.M.M. (2009) – Calogênese e teores de fenóis e taninos totais em barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville]. *Ciência e Agrotecnologia*, vol. 33, n. 2, p. 85-390. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542009000200004>
- Coelho-Ferreira M. (2009) – Medicinal knowledge and plant utilization in an Amazonian coastal community of Marudá, Pará State (Brazil). *Journal of Ethnopharmacology*, vol, 126, n. 1, p. 159-175. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.07.016>
- Coelho, M.F.B.; Maia, S.S.S.; Oliveira, A.K. & Diogenes, F.E.P. (2010) – Superação da dormência tegumentar em sementes de *Caesalpinia ferrea* Mart ex Tul. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, vol. 4. n. 4, p.74-79. <http://dx.doi.org/10.5039/agraria.v5i1a570>

- Fernandes, C.P.M.; Machad, C.; Lopes, T.V.; Cunha Filho, N.; Bretanha, P.R.; Schons, S.; Félix, S.R. & Nobre, M.O. (2016) – Repellent Action of *Carapa guianensis* and *Caesalpinia ferrea* for flies species of Calliphoridae family. *Ciência Rural*, vol. 46, n. 5, p. 867-870. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20150727>
- Fonseca, P.T.; Nepomuceno, C.F.; Alvim, B.F.M. & Santana, J.R.F. (2014). Resposta morfogênica de embriões zigóticos de *Erythrina velutina* Willd: (Leguminosae) cultivados *in vitro*. *Revista Ceres*, vol. 61, n. 5, p. 605-611. <http://dx.doi.org/10.1590/0034-737X201461050002>
- Gallão, M.I; Normando, L.O.; Vieira, Í.G.P.; Mendes, F.N.P.; Ricardo, N.M.P.S. & De Brito, E.S. (2013) – Morphological, chemical and rheological properties of the main seed polysaccharide from *Caesalpinia ferrea* Mart. *Industrial Crops and Products*, vol. 47, p. 58-62. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.02.035>
- George, E.F.; Hall, M.A. & Klerk, G.J. (2008) – Plant Tissue Culture Procedure – Background. In: George, E.F.; Hall, M.A. & Klerk, G.J. (Eds.) – *Plant Propagation by Tissue Culture*. Dordrecht, Springer, p. 1–28.
- Haslam, T.M. & Yeung, E.C. (2011) – Zygotic Embryo Culture: An Overview. In: Thorpe, T. & Yeung, E. (Eds.) – *Plant Embryo Culture. Methods in Molecular Biology*. New Delhi, Humana Press, p. 3–15.
- Isah, T. (2016) – Induction of somatic embryogenesis in woody plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, vol.38, n. 5, art. 118. <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2134-6>
- Lenhard, N.R.; Neto, V.B.P.; Scalon, S.P.Q. & Alvarenga, A.A. (2013) – Crescimento de mudas de pau-ferro sob diferentes níveis de sombreamento. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, vol. 43, n. 2, p. 178-186. <http://dx.doi.org/10.1590/S1983-40632013000200012>
- Lima, S.M.A.; Araújo, L.C.C.; Sitônio, M.M.; Freitas, A.C.C. & Moura, S.L.; Correia, M.T.S.; Malta, D.J.N. & Gonçalves-Silva, T. (2011) – Anti-inflammatory and analgesic potential of *Caesalpinia ferrea*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, vol. 22, n. 1, p. 169-175. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000197>
- Lopes, N.; Faccin-Galhardi, L.C.; Espada, S.F, Pacheco, A.C.; Ricardo, N.M.P.S.; Linhares, R.E.C. & Nozawa, C. (2013) – Sulfated polysaccharide of *Caesalpinia ferrea* inhibits herpes simplex virus and poliovirus. *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 60, p. 93-99. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.05.015>
- Loyola-Vargas, V.M. & Ochoa-Alejo, N. (2012) – An Introduction to Plant Cell Culture: The Future Ahead. In: Loyola-Vargas, V.M. & Ochoa-Alejo, N. (Eds.) – *Plant Cell Culture Protocols*. New Delhi, Humana Press, p. 1-8.
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962) – A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, vol. 15, n. 3, p. 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Nakamura, E.S.; Kurosaki, F.; Arisawa, M.; Shimada, Y.; Hayashi, K.I.; Nozaki, H.; Asami, T.; Yoshida, S. & Fujioka, S. (2002) – Cancer chemopreventive effects of constituents of *Caesalpinia ferrea* and related compounds. *Cancer Letters*, vol. 177, n. 2, p. 119-124. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(01\)00708-X](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(01)00708-X)
- Nawwar, M.A.; Hussein, S.A.; El-Mousallami, A.M.; Hashim, A. N. Mousa, M. A.; Hetta, M. H.; Hamed, M. A.; Werner, V.; Becker, A.; Haertel, B. & Lindequist, U. (2015) – Phenolics from *Caesalpinia ferrea* Mart.: Antioxidant, cytotoxic and hypolipidemic activity. *Pharmazie*, vol. 70, n. 8, p. 553-558. <https://doi.org/10.1691/ph.2015.5526>
- Nozaki, H.; Hayashi, K.I.; Kido, M.; Kakumoto, K.; Ikeda, S.; Matsuura, N.; Tani, H.; Takaoka, D.; Inuma, M. & Akao, Y. (2007) – Pauferrol A, a novel chalcone trimer with a cyclobutane ring from *Caesalpinia ferrea* mart exhibiting DNA topoisomerase II inhibition and apoptosis-inducing activity. *Tetrahedron Letters*, vol. 48, n. 47, p. 8290-8292. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2007.09.130>
- Ohira, S.; Takaya, K.; Mitsui, T.; Kido, M.; Kakumoto, K.; Hayashi, K.I.; Kuboki, A.; Tani, H.; Ikeda, S.; Inuma, M.; Akao, Y. & Nozaki, H. (2013) – New chalcone dimers from *Caesalpinia ferrea* Mart act as potent inhibitors of DNA topoisomerase II. *Tetrahedron Letters*, vol. 54, n. 37, p. 5052-5055. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2013.07.028>
- Oliveira, F.C.S, Barros, R.F.M. & Moita Neto, J.M. (2010) – Plantas medicinais utilizadas em comunidades rurais de Oeiras, semiárido piauiense. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, vol. 12, n. 3, p. 282-301. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722010000300006>
- Pereira, L.D.P.; Silva, R.O.; Bringel, P.H.D.S.F.; Silva, K.E.S.; Assreuy, A.M.S. & Pereira, M.G. (2012) – Polysaccharide fractions of *Caesalpinia ferrea* pods: Potential anti-inflammatory usage. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 139, n. 2, p. 642-648. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.12.012>

- Rady, M.R. & Nazif, N.M. (1997) – Response of explant type to proliferation and anthraquinones accumulation in *Cassia acutifolia*. *Fitoterapia*, vol. 68, n. 4, p. 349-354.
- Rodrigues, C.F.; Fernandes, D.C. & Ponte, L.F.A. (2017) – Indução in vitro de calos através de explantes extraídos de plântulas da catingueira (*Poincianella pyramidalis* Tul.). *Essentia*, vol. 18, n. 1, p. 24-32.
- Santos, L.W.; Coelho, M.D.F.B. & Azevedo, R.A.B. (2013) – Qualidade de mudas de pau-ferro produzidas em diferentes substratos e condições de luz. *Pesquisa Florestal Brasileira*, vol. 33, n. 74. p. 151-158. <https://doi.org/10.4336/2013.pfb.33.74.344>
- Scalon, S.P.Q.; Teodósio, T.K.C.; Novelino, J.O.; Kissmann, C. & Souza, L. H. (2011) – Germinação e crescimento de *Caesalpinia ferrea* Mart. Ex Tull. em diferentes substratos. *Revista Árvore*, vol. 35, n. 3, p. 633-639. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-67622011000400007>
- Silva, D.; Imakawa, A.M.; Bruno, F.M.S.; Costa, S.S. & Sampaio, P.T.B. (2018) – In vitro propagation and seedling acclimatization of *Caesalpinia ferrea* Mart., a valuable medicinal plant in the Amazon (Fabaceae). *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Naturais*, vol. 13, n. 1, p. 57-65.
- Singh, R.; Rai, M.K. & Kumari, N. (2015) – Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Sapindus mukorossi* Gaertn. from leaf-derived callus induced with 6-benzylaminopurine. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 177, n. 2, p. 498-510. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1758-0>
- Ślesak, H.; Dziejczak, K.; Kwolek, D.; Cygan, M.; Mizia, P.; Olejniczak, P. & Joachimiak, A.J. (2017) – Female versus male: *Rumex thyrsiflorus* Fingerh. under in vitro conditions. Does sex influence in vitro morphogenesis? *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, vol. 129, n. 3, p. 521-532. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1197-4>
- Tan, S.H.; Musa, R.; Ariff, A. & Maziah, M. (2010) – Effect of plant growth regulators on callus, cell suspension and cell line selection for flavonoid production from pegaga (*Centella asiatica* L. Urban). *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, vol. 6, n. 4, p. 284-299. <https://doi.org/10.3844/ajbbsp.2010.284.299>
- Werner, E.T.; Cuzzuol, G.R.F.; Pessotti, K.V.; Lopes, F.P. & Roger, J.A. (2009) – Controle da calogênese do pau-brasil in vitro. *Revista Árvore*, vol. 33, n. 4, p. 987-996. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-67622009000600001>
- Zhang, E.H.; Wang, R.F.; Guo, S.Z. & Liu, B. (2013) – An update on antitumor activity of naturally occurring chalcones. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2013, art. 815621. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/815621>