

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**ESTUDO AGRONÔMICO, QUÍMICO E BIOLÓGICO DE
Cochlospermum regium (MART. EX. SCHARANK): UMA PLANTA
MEDICINAL DO CERRADO**

MARIELLE CASCAES INÁCIO

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da UNESP – Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de Mestre em
Agronomia (Horticultura)

BOTUCATU - SP

Fevereiro – 2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**ESTUDO AGRONÔMICO, QUÍMICO E BIOLÓGICO DE
Cochlospermum regium (MART. EX. SCHARANK): UMA PLANTA
MEDICINAL DO CERRADO**

MARIELLE CASCAES INÁCIO

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ana Maria Soares Pereira

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da UNESP – Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de Mestre em
Agronomia (Horticultura)

BOTUCATU - SP

Fevereiro – 2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

I35e Inácio, Marielle Cascaes, 1985-
Estudo agrônômico, químico e biológico de *Cochlospermum regium* (Mart.ex.Scharank): uma planta medicinal do Cerrado/
Marielle Cascaes Inácio. - Botucatu, [s.n.], 2010.
xii, 118 f.: il., color., grafs., tabs.

Dissertação (Mestrado)-Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2010
Orientador: Ana Maria Soares Pereira
Inclui bibliografia

1. Cochlospermaceae. 2. Conservação *in vitro*. 3. Atividade antimicrobiana. 4. Algodãozinho-do-campo. 5. Micropropagação. I. Pereira, Ana Maria Soares. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho " (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "ESTUDO AGRONÔMICO, QUÍMICO E BIOLÓGICO DE *Cochlospermum regium* (MART. EX. SCHARANK): UMA PLANTA MEDICINAL DO CERRADO"

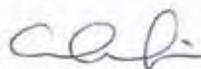
ALUNA: MARIELLE CASCAES INÁCIO

ORIENTADOR: PROFª DRª ANA MARIA SOARES PEREIRA

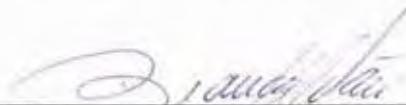
Aprovado pela Comissão Examinadora



PROFª DRª ANA MARIA SOARES PEREIRA



PROFª DRª GIUSEPPINA PACE PEREIRA LIMA



PROFª DRª BIANCA WALÉRIA BERTONI

Data da Realização: 05 de Fevereiro de 2010.

“Apesar dos nossos defeitos, precisamos enxergar que somos pérolas únicas no teatro da vida e entender que não existem pessoas de sucesso e pessoas fracassadas. O que existem são pessoas que lutam pelos seus sonhos ou desistem deles.”

Augusto Cury

AGRADECIMENTOS

A Deus, o sábio dos sábios, por sempre me mostrar o melhor caminho a seguir, por ser o alicerce da minha vida e por nunca me abandonar.

Ao Tiago, meu parceiro, aquele que permaneceu comigo em todos os momentos difíceis desta caminhada e por compartilharmos juntos nossos sonhos.

Ao meu pai, João, pelo amor incondicional e aceitação das minhas escolhas.

Aos meus irmãos, Johnny e Débora, por fazerem parte da minha vida.

A todos os familiares, inclusive os adquiridos durante a minha vida, os de coração, e amigos que acreditaram em mim, que vibraram e sentiram-se orgulhosos com minhas conquistas.

A minha querida orientadora e mãe de coração, Ana Maria Soares Pereira, que me dá suporte não só profissional, mas um carinho especial que me conforta sempre.

A prof^a Dr^a Bianca Waléria Bertoni, pela atenção nunca negada e sempre oferecida com sorriso, pelo suporte neste aprendizado, e pela sua valiosa contribuição como membro da Banca Examinadora.

A querida prof^a Dr^a Giuseppina Pace Pereira Lima por fazer parte da Banca Examinadora e contribuir tão grandiosamente para minha formação e aperfeiçoamento.

Aos meus amigos de laboratório: pelo auxílio e pelas boas horas de alegria.

A Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP), em especial a Prof^a Suselei de Castro França, por me receberem de portas abertas para desenvolver meu projeto de mestrado.

A todos os funcionários e professores da UNAERP pelo auxílio e por me receberem tão calorosamente.

A UNESP, por me darem a chance de crescer profissionalmente.

A FAPESP, pela bolsa concedida e pelo financiamento do projeto.

A todos que de alguma forma contribuíram para minha formação pessoal e profissional.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	IX
LISTA DE FIGURAS.....	XII
RESUMO.....	01
SUMMARY.....	03
1. INTRODUÇÃO.....	05
2. REVISÃO DE LITERATURA DA ESPÉCIE EM ESTUDO.....	07
2.1 O Gênero <i>Cochlospermum</i>	07
2.2 A espécie <i>Cochlospermum regium</i>	10
2.2.1 Taxonomia e habitat.....	10
2.2.2 Etnobotânica e etnofarmacologia.....	11
2.2.3 Estudos Agronômicos.....	12
2.2.4 Fitoquímica.....	13
2.2.5 Farmacologia.....	14
2.2.6 Atividade antimicrobiana.....	15
2.3 Micropropagação.....	15
2.3.1 Etapas Básicas da Micropropagação.....	17
2.3.2 Reguladores vegetais.....	18
2.4 Conservação em Banco de Germoplasma <i>in vitro</i>	19
CAPÍTULO I. GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE <i>Cochlospermum regium</i> <i>IN VITRO</i>	22
1. Introdução.....	22
2. Objetivos.....	22
2.1 Objetivo geral.....	22
2.2 Objetivos específicos.....	23
3. Material e Métodos.....	23
3.1 Coleta e beneficiamento das sementes.....	23
3.2 Assepsia das sementes.....	24
3.3 Superação da dormência.....	24
3.4 Influência do tamanho das sementes.....	25

SUMÁRIO

	Página
3.5 Condições gerais dos experimentos.....	26
4. Resultados e Discussão.....	26
4.1 Assepsia das sementes.....	26
4.2 Superação da dormência.....	27
4.3 Influência do tamanho das sementes.....	28
5. Conclusão.....	30
CAPÍTULO II: MICROPROPAGAÇÃO DE <i>Cochlospermum regium</i>	31
1. Introdução.....	31
2. Objetivos.....	31
2.1 Objetivo geral.....	31
2.2 Objetivos específicos.....	32
2. Material e Métodos.....	32
2.1 Condições gerais dos experimentos.....	32
2.2 Controle da produção de calos.....	33
2.2.1 Concentração do meio de cultura MS, tipo de explante e carvão ativo.....	33
2.3 Controle da vitrificação.....	34
2.3.1 Agente geleificante, teor de sacarose, vedação das cubetas e tamanho dos frascos	34
2.4 Multiplicação <i>in vitro</i>	37
2.5 Posição da gema.....	38
2.6 Enraizamento <i>in vitro</i>	38
2.7 Aclimatação e Enraizamento <i>ex vitro</i>	39
2.8 Conservação de germoplasma <i>in vitro</i>	39
3. Resultados e Discussão.....	40
3.1 Controle da produção de calos.....	40
3.1.1 Concentração do meio de cultura MS, tipo de explante e carvão ativo.....	40
3.2 Controle da vitrificação.....	43
3.2.1 Agente geleificante, teor de sacarose, vedação das cubetas e tamanho dos frascos	43
3.3 Multiplicação <i>in vitro</i>	55

SUMÁRIO

	Página
3.4 Posição da gema.....	59
3.5 Enraizamento <i>in vitro</i>	60
3.6 Aclimatação e Enraizamento <i>ex vitro</i>	63
3.7 Conservação de germoplasma <i>in vitro</i>	64
4. Conclusões.....	68
CAPÍTULO III. DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS <i>EX VITRO</i>	70
1. Introdução.....	70
2. Objetivos.....	70
2.1 Objetivo Geral.....	70
2.2 Objetivos Específicos.....	70
3. Material e Métodos.....	71
4. Resultados e Discussão.....	71
5. Conclusão.....	76
CAPÍTULO IV. PRODUÇÃO EXTRATOS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE <i>Cochlospermum regium</i>	77
1. Introdução.....	77
2. Objetivos.....	77
2.1 Objetivos Gerais.....	77
2.2 Objetivos Específicos.....	78
3. Material e Métodos.....	78
3.1 Preparo dos extratos.....	78
3.2 Atividade antimicrobiana.....	80
3.3 Atividade citotóxica.....	81
4. Resultados e Discussão.....	82
4.1 Preparo dos extratos.....	82
4.2 Atividade antimicrobiana.....	83
4.3 Atividade citotóxica.....	85
4.3.1 3T3 fibroblasto (células normais).....	85

SUMÁRIO

	Página
4.3.2 B16 – melanoma murino.....	85
5. Conclusão.....	86
CAPÍTULO V. IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE <i>Cochlospermum regium</i>	87
1. Introdução.....	87
2. Objetivos.....	87
2.1 Objetivo Geral.....	88
2.2 Objetivos Específicos.....	88
3. Material e Métodos.....	88
3.1 Descrição geral dos experimentos.....	88
3.2 Teste histoquímico.....	88
3.3 Composição do óleo essencial de folhas de <i>C. regium</i>	89
4. Resultados e Discussão.....	89
4.1 Teste histoquímico.....	89
4.2 Composição do óleo essencial de folhas de <i>C. regium</i>	91
5. Conclusão.....	93
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Distribuição, classificação, utilização popular e uso farmacológico de espécies do gênero <i>Cochlospermum</i>	09
Tabela 2: Região brasileira onde se utiliza <i>C. regium</i> como medicinal, órgão utilizado, formas de uso e indicação terapêutica.....	12
Tabela 3: Locais de coleta de frutos e/ou sementes de <i>C. regium</i> , com respectiva latitude, longitude e altitude, UNAERP, Ribeirão Preto-SP, 2009.....	24
Tabela 4: Porcentagem de germinação, IVG, porcentagem de contaminação exógena e endógena 40 dias após montagem do experimento, UNAERP, Ribeirão Preto-SP, 2009.....	28
Tabela 5: Médias de comprimento altura e largura de semente de <i>C. regium</i> . UNAERP, Ribeirão Preto-SP, 2009.....	30
Tabela 6: Efeito do tamanho da semente no IVG, porcentagem de germinação, de contaminação exógena e endógena, UNAERP, Ribeirão Preto-SP, 2009.....	30
Tabela 7: Influência do meio MS, MS/4 e das gemas apical (GA), cotiledonar (GC) e do hipocótilo (HC) na porcentagem e incidência de calos, porcentagem de brotação e número de gemas por explante, UNAERP, Ribeirão Preto-SP, 2009.....	42
Tabela 8: Porcentagem de brotação, número de gemas por explante, porcentagem e incidência de calos e altura dos brotos de explantes em função da ausência e presença do carvão ativo no meio de cultura avaliado em 28 dias, UNAERP, Ribeirão Preto-SP, 2009.....	43
Tabela 9: Efeito da adição de sacarose no meio de cultura na porcentagem de brotação, número de gemas obtidas por explante, porcentagem de vitrificação e altura de brotos, UNAERP, Ribeirão Preto-SP, 2009.....	45
Tabela 10: Efeito da adição de sacarose no meio de cultura na porcentagem de brotação, número de gemas obtidas por explante, porcentagem e intensidade de vitrificação, altura de brotos e % de sobrevivência dos explantes, UNAERP, Ribeirão Preto-SP, 2009.....	48

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 11: Efeito do Phytigel [®] nos parâmetros porcentagem de brotação, número de gemas por explantes, porcentagem de vitrificação e altura dos brotos de explantes de <i>C. regium</i> , UNAERP, Ribeirão Preto-SP, 2009.....	50
Tabela 12: Efeito da vedação das cubetas na porcentagem de brotação, número de gemas/explante, porcentagem de vitrificação, altura dos brotos e porcentagem de explantes necrosados, UNAERP, Ribeirão Preto-SP, 2009.....	52
Tabela 13: Efeito da vedação das cubetas e do frasco na porcentagem de brotação, número de gemas/explante, porcentagem e intensidade de vitrificação, altura dos brotos porcentagem de sobrevivência e de contaminação exógena, UNAERP, Ribeirão Preto-SP, 2010.....	54
Tabela 14: Influência dos reguladores de crescimento BAP, cinetina e zeatina na porcentagem de brotação, número de gemas obtidas por broto, número brotação por explante, porcentagem e incidência de calos, porcentagem de vitrificação e altura dos brotos, UNAERP, Ribeirão Preto – SP, 2009.....	58
Tabela 15: Efeito da posição das gemas apical, lateral 1, 2 e 3 na porcentagem de brotação, número de gemas obtidos por explante, porcentagem e incidência de calos, altura dos brotos e porcentagem de sobrevivência aos 30 e 60 dias, UNAERP, Ribeirão Preto – SP, 2009.....	59
Tabela 16: Efeito da adição de IBA no desenvolvimento vegetativo de explantes de <i>C. regium in vitro</i> , UNAERP, Ribeirão Preto – SP, 2009.....	62
Tabela 17: Efeito do manitol, sorbitol e pantotenato de cálcio sobre crescimento mínimo em explantes de <i>C. regium</i> mantidos <i>in vitro</i> em 25°C, UNAERP, Ribeirão Preto – SP, 2009.....	66
Tabela 18: Efeito do manitol, sorbitol e pantotenato de cálcio sobre crescimento mínimo em explantes de <i>C. regium</i> mantidos <i>in vitro</i> em 15°C, UNAERP, Ribeirão Preto – SP, 2009.....	68

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 19: Medidas de altura da parte aérea (APA), quantidade de folhas (QF), comprimento de raiz (CR) e diâmetro da raiz ($\emptyset R$), número de raiz fasciculada (NRF), peso fresco e seco de parte aérea (PFPA e PSPA) e raiz (PFR e PSR), porcentagem de biomassa da parte aérea (%BPA) e raiz (%BR) e porcentagem de plantas com raiz maior que parte aérea (%RMPA), UNAERP, Ribeirão Preto-SP, 2009.....	75
Tabela 20: Dados relacionados à produção e rendimento dos extratos vegetais de <i>Cochlospermum regium</i> , UNAERP, Ribeirão Preto – SP, 2009.....	83
Tabela 21: Atividade antibacteriana de extrato bruto (mg mL^{-1}) de 3 genótipos de raiz de <i>C. regium</i> e de parte aérea UNAERP, Ribeirão Preto – SP, 2009.....	84
Tabela 22: Atividade antifúngica de extrato bruto de 3 genótipos de raiz de <i>C. regium</i> e de parte aérea UNAERP, Ribeirão Preto – SP, 2009.....	84
Tabela 23: Porcentagem de inibição celular de melanoma murino (B16) e fibroblasto (3T3) dos extratos aquosos brutos de <i>C. regium</i> , UNAERP, Ribeirão Preto – SP, 2009.....	86
Tabela 24: Testes histoquímicos em folhas de <i>C. regium</i> , FCA/UNESP, Botucatu – SP, 2008.....	90
Tabela 25: Composição do óleo essencial de folhas de <i>C. regium</i> , FCA/UNESP, Botucatu – SP, 2008.....	92

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Planta de <i>Cochlospermum regium</i>	11
Figura 2: Tamanhos de sementes de <i>C. regium</i> separados visualmente.....	25
Figura 3: Incidência de calos em explantes de <i>C. regium</i>	33
Figura 4: Vedação das cubetas utilizadas nos tratamentos V2 a V6.....	36
Figura 5: Posições de gemas de plantas de <i>C. regium</i> utilizadas.....	38
Figura 6: Explantes de <i>C. regium</i> vitrificados (A) e com presença de possíveis antocianinas nas folhas (B).....	46
Figura 7: Calos formados em explantes de <i>C. regium</i> com adição de BAP no meio de cultura.....	56
Figura 8: Porcentagem de brotação de <i>C. regium</i> em função da concentração de BAP, cinetina e zeatina <i>in vitro</i>	57
Figura 9: Número de gemas obtidas por broto de <i>C. regium</i> em função da concentração de BAP, cinetina e zeatina <i>in vitro</i>	57
Figura 10: Brotações múltiplas estimulado pela adição de 2µM de IBA no meio de cultura...61	
Figura 11: Raízes de <i>C. regium</i> formadas <i>ex vitro</i>	64
Figura 12: Tipo de plântulas referente a relação tamanho parte aérea/raiz.....	72
Figura 13: Distribuição geográfica da espécie <i>C. regium</i>	74
Figura 14: Rebrotas de <i>C. regium</i> sob parte aérea aparentemente morta.....	74
Figura 15: Extrato de raiz de <i>C. regium</i> apresentando duas fases após centrifugação.....	79
Figura 16: Testes histoquímicos em folhas de <i>C. regium</i>	91

ESTUDO AGRONÔMICO, QUÍMICO E BIOLÓGICO DE *Cochlospermum regium* (MART. EX. SCHARANK): UMA PLANTA MEDICINAL DO CERRADO

Autora: Eng^a. Agr^a. Marielle Cascaes Inácio

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Maria Soares Pereira

RESUMO

Cochlospermum regium é uma espécie medicinal do Cerrado utilizada na medicina popular para infecções. Por ser a raiz o órgão utilizado nas preparações fitoterápicas, quando a droga vegetal é preparada, de modo geral, não há uma ação conservacionista que garanta a continuidade do indivíduo, comprometendo assim a sobrevivência desta espécie. Desta forma, este trabalho teve como objetivo fazer um estudo sobre aspectos agronômicos, químicos e biológicos da espécie visando ampliar os conhecimentos gerais sobre *C. regium* para que no futuro seja possível o desenvolvimento de um medicamento fitoterápico a partir desta espécie. Foram desenvolvidos experimentos de germinação *in vitro*, protocolos de micropropagação, conservação de germoplasma *in vitro*, avaliação da atividade antimicrobiana e anti-tumoral e avaliação do perfil fitoquímico da planta. Para determinação das melhores condições de germinação *in vitro* foram avaliados diferentes métodos de assepsia e tempos de imersão em ácido sulfúrico para superação da dormência das sementes. No desenvolvimento do protocolo de micropropagação foram avaliados o controle da produção de calos e vitrificação nos explantes de *C. regium*; o efeito das citocininas BAP, cinetina e zeatina na multiplicação dos explantes e da auxina IBA no enraizamento *in vitro*; a posição da gema em relação a brotação e; o efeito de agentes de estresse osmótico no crescimento mínimo de explantes de *C. regium*. A atividade antibacteriana foi determinada através do método de microdiluição em caldo. A citotoxicidade foi avaliada em células de fibroblasto e melanoma. O perfil químico da espécie foi determinado por testes histoquímicos anatômicos e pela identificação dos componentes do óleo essencial, ambos avaliados em folhas. Durante o estabelecimento do protocolo de micropropagação ocorreu vitrificação e produção de calos nos explantes, que foram controlados com aumento do teor de sacarose e adição de carvão ativo, respectivamente, no meio de cultura. As citocininas nas condições avaliadas não promoveram efeito na

multiplicação dos explantes, assim como o IBA não produziu raízes *in vitro*. A melhor posição de gema para multiplicação foi a apical. Para Conservação em Banco de Germoplasma *in vitro*, o sorbitol juntamente com pantotenato de cálcio produziram maior taxa de sobrevivência dos explantes em 25°C e o manitol adicionado ao pantotenato em 15°C. Nas condições avaliadas, os extratos não apresentaram atividade antibacteriana, mostraram baixa citotoxicidade para células normais e de melanoma murino. Os estudos histoquímicos revelaram a presença de todos os grupos de metabólitos secundários e o óleo essencial teve como seu componente majoritário o β -Copaen-4-alfa-ol. Assim, é possível concluir que a micropropagação da espécie *C. regium* é viável e mais estudos relacionados a química e genética juntamente com atividade antimicrobiana da espécie devem ser realizados a fim de encontrar os genótipos promissores para conservação e com alto potencial antimicrobiano.

PALAVRAS-CHAVE: micropropagação, conservação *in vitro*, atividade antimicrobiana, algodãozinho-do-campo, Cochlospermaceae.

CHEMICAL, BIOLOGICAL AND AGRONOMIC STUDY OF *Cochlospermum regium* (MART. EX. SCHARANK): A MEDICINAL PLANT OF THE CERRADO. Botucatu, 2010. 130p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Horticultura) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: Marielle Cascaes Inácio

Adviser: Ana Maria Soares Pereira

SUMMARY

Cochlospermum regium is a medicinal species from Cerrado popularly used against infections. Being the *C. regium* root the plant organ commonly used for preparing phytotherapeutic formulations and considering that there is not a conservationist action that guarantee the preservation of individuals allowing the survival of this species a study on the chemical, biological and agronomic aspects of that species was carried out to expand the general knowledge about *C. regium* so that in the future the development of a phytotherapeutic from this specie may be viable. Experiments of *in vitro* germination, micropropagation protocols, germplasm *in vitro* conservation, evaluation of antimicrobial and antitumor activities and evaluation of the phytochemical profile of the plant were performed. To determine the best conditions for *in vitro* germination different methods of asepsis and time of immersion in sulfuric acid to the break dormancy of seeds were evaluated. For the development of *C. regium* micropropagation protocol callus proliferation, explants vitrification as well the effect of the cytokinins BAP, kinetin and zeatin in plant multiplication and of the auxin IBA on *in vitro* rooting were investigated. Also, the position of the bud and the effects of osmotic stress agents on minimal growing of *C. regium* plantlets were evaluated. The antibacterial activity of *C. regium* extract was determined by the broth microdilution method and the cytotoxicity was evaluated in fibroblast and melanoma cells. The chemical profile of the species was determined by anatomical and histochemical tests and by the identification of the essential oil components. During the development of the micropropagation protocol was observed vitrification and callus proliferation on the explants, what was controled with the increase of sucrose concentration and the addition of activated charcoal in the culture medium. The cytokinins in the evaluated concentrations did not affect plant multiplication and the

concentration of IBA used did not induce *in vitro* rooting. The apical bud position was considered the best for multiplication . For the *in vitro* conservation in germoplasm bank, the addition of sorbitol and calcium pantothenate promoted superior survival rates of plantlets at 25°C and mannitol added to pantothenate at 15°C. In the evaluated conditions, *C. regium* extracts did not show antibacterial activity, but presented low cytotoxicity for normal cells and also for murine melanoma. Histochemical studies revealed the presence of all the groups of secondary metabolites and Copaen-4- alpha-ol was the major component found in the essential oil. Obtained results indicate that the micropropagation of *C. regium* is viable though further studies on the chemistry and genetics of that species as well investigations on its antimicrobial activity should be conducted in order to find promising genotypes with validated antimicrobial potential for conservation in germplasm banks.

Keywords: micropropagation, *in vitro* conservation, antimicrobial activity, algodãozinho-do-campo, Cochlospermaceae.

1. INTRODUÇÃO

A espécie *Cochlospermum regium* é uma espécie medicinal endêmica do Cerrado muito utilizada pela população como método alternativo para tratamento de infecções, principalmente do sistema reprodutor feminino.

Estudos farmacológicos, químicos e agrônômicos desta espécie são escassos. Sabe-se que o órgão principal utilizado pela população nas preparações fitoterápicas é a raiz. Plantas medicinais cujo sistema radicular é utilizado na preparação de medicamentos e remédios são mais vulneráveis a erosão genética e a extinção, isto porque de modo geral durante a coleta destes materiais não são tomadas medidas conservacionistas para evitar o declínio populacional da espécie.

Algumas medidas de conservação da espécie ocorrem naturalmente como a dormência das suas sementes que esperam pela época chuvosa para germinar e também a plasticidade que a mesma apresenta quanto a floração. Quando acontecem, na época da seca, as tão comuns queimadas nas áreas de Cerrado, a espécie, já sem os ramos, apresenta sua floração na altura do solo, através do xilopódio, de onde saem os ramos. Estas características garantem a sobrevivência e a adaptação da espécie aos problemas climáticos e causados pelo homem.

Desta forma, ao considerar que *Cochlospermum regium* é uma espécie medicinal intensamente utilizada pela população que habita o Cerrado e está exposta a erosão genética, este trabalho objetivou determinar um método alternativo para conservar a espécie e

multiplicá-la, através da propagação *in vitro*, ou micropropagação; determinar, através de atividades biológicas, alguns possíveis efeitos medicinais da espécie e fazer uma prévia caracterização fitoquímica de modo a contribuir com dados que possam ser utilizados no futuro para o desenvolvimento de fitoterápicos com esta espécie.

2. REVISÃO DE LITERATURA DA ESPÉCIE EM ESTUDO

2.1 O Gênero *Cochlospermum*

A família Cochlospermaceae é composta de 15 espécies subdivididas em dois gêneros: *Cochlospermum* e *Amourexia*. O gênero *Cochlospermum* integra 11 espécies, com distribuição em todo território mundial. Dentre as 11 espécies, 6 apresentam importância medicinal, e relatos sobre a sua utilização na medicina popular e/ou atividade farmacológica comprovada pela ciência estão disponíveis na literatura (Tabela 1).

Existe, ainda, confusão e discordância entre os taxonomistas sobre a família Cochlospermaceae. Muitos classificam algumas espécies do gênero *Cochlospermum* como sendo da família Bixaceae (SOUZA e LORENZI, 2008). Classificações mais antigas também apresentam controvérsias. A Flora Brasiliensis que foi produzida entre 1840-1906 apresenta o gênero *Cochlospermum* como sendo da família Bixaceae (FLORA BRASILIENSIS, 2009); já a Flora Neotropica Monograph, de 1981, destaca algumas espécies do gênero como sendo Cochlospermaceae, inclusive *C. regium* e *C. vitifolium* que ocorrem no Brasil (POPPENDIECK, 1981). Devido a este fato, é comum encontrar em herbários exsiccatas da mesma espécie classificadas como sendo de famílias diferentes. Das espécies existentes no Brasil, a *Cochlospermum regium* ocorre nas áreas de Cerrado, a *C. vitifolium* na região de semi-árido e a *C. orinocense* na Amazônia.

Dentre as espécies que são utilizadas como medicinais, destacam-se: *C. vitifolium*, *C. angolense*, *C. planchonii* e *C. tinctorium*, que mesmo estando separadas geograficamente apresentam uma mesma utilização popular para icterícia. Segundo Poppendieck (1981) este uso pode ter sido descoberto pela coloração amarela do suco das raízes, que é sugestiva, ou pela difusão de conhecimento transmitido pela migração de pessoas de uma área para outra, tais como escravos africanos.

Tabela 1: Distribuição, classificação, utilização popular e uso farmacológico de espécies do gênero *Cochlospermum*

Espécie	Continente	Distribuição	Classifi- cação	Órgão utilizado/Useo na medicina popular	Órgão utilizado/Useo farmacológico comprovado	Referências
<i>C. vitifolium</i> (Willdenow) Sprengel	América	México até o Brasil/Bolívia	Árvore	Casca/Fígado, icterícia, rins, úlceras, hipertensão, hepatite, diabetes	Casca/Hepatite, antiinflamatório, analgésico, diabetes, síndrome metabólica, colesterol	Deharo et al., 2004; Salgado-Sánchez et al., 2007; Ortiz-Andrade et al., 2009.
<i>C. regium</i> (Mart Ex. Shranck) Pilger	América	Brasil e Bolívia	Arbusto	Raiz/colesterol, feridas, laxante, depurativo do sangue, inflamação da pele, de útero, ovário, próstata, dores de cabeça	Raiz/gastrite, analgésico, antibacteriano; Óleo essencial de folhas/antibacteriano	Nunes et al., 2003; Rodrigues et al., 2005; Ritto, 1996; Castro, 2000; Oliveira et al., 1996; Honda et al., 2007.
<i>C. orinocense</i> (Kunth) Steudel	América	Amazônia e Norte da América do Sul	Árvore	*	*	*
<i>C. tetraporum</i> Hallier	América	Sul da Bolívia e Norte da Argentina	Árvore	*	*	*
<i>C. angolense</i> Welwitsch Ex. Oliver	África	Angola	Árvore	Raiz/Malária, icterícia	Raiz/ <i>Plasmodium falciparum</i> (malária)	Presber et al., 1992.
<i>C. planchonii</i> Hooker F. ex A. Richard	África	Senegal até Camarões	Arbusto, subarbusto	Raiz/Icterícia, verminoses, hepatite, Esquistossoma, dores nas costas, diarreias, infecções do trato urinário; Folhas+raiz/ malária, febres; Raiz/doenças sexualmente transmissíveis	Raiz/antibacteriana, antifúngica, antileveduricida, icterícia hepática, <i>Plasmodium falciparum</i> (malária). Óleo essencial da raiz/antibacteriana	Doughari et al., 2008; Blench, 2007; Aliyu et al., 1995; Vonthron- Sénécheau et al., 2003; Benoit-Vical et al., 2003; Ouattara et al., 2007.
<i>C. intermedium</i> Mildbraed	África	República Centro- Africana	Arbusto, subarbusto	*	*	*
<i>C. tinctorium</i> Perrottet Ex A. Richard	África	Senegal até Uganda	Arbusto, subarbusto	Raiz/malária, icterícia,	Raiz/Úlcera, hepatite, <i>Plasmodium falciparum</i> (malária), antibacteriano	Nergard et al., 2005; Etuk et al., 2009; Benoit et al., 2005; Traoré et al., 2006; Tijani et al., 2009
<i>C. wittei</i> W. Robyns	África	Congo	Arbusto, subarbusto	*	*	*
<i>C. religiosum</i> (Linnaeus) Alston	Ásia	Índia até Sudeste da Ásia	Árvore	Casca/aplica-se em área com osso fraturado	*	Bapuji e Ratnam, 2009
<i>C. gillivraei</i> Bentham	Austrália	Norte e Austrália Occidental	Árvore	*	*	*

* Não foram encontradas literatura a respeito

Fonte: adaptado de Poppendieck, 1981.

2.2 A espécie *Cochlospermum regium*

2.2.1 Taxonomia e habitat

Domínio: Eucariota

Reino: Plantae

Filo: Magnoliophyta Cronquist, Takht. & W. Zimm. ex Reveal

Classe: Magnoliopsida Brongn.

Subclasse: Dilleniidae Takht. ex Reveal & Takht.

Ordem: Violales Lindl.

Família: Cochlospermaceae Planch.

Gênero: *Cochlospermum* Kunth

Nome botânico: *Cochlospermum regium* (MISSOURI BOTANICAL GARDEN, 2009).

Cochlospermum regium é uma espécie endêmica do Cerrado conhecida popularmente por algodãozinho-do-campo ou algodãozinho-do-Cerrado (Figura 1). Geralmente é encontrada em locais modificados pelo homem, como estradas, ferrovias, entre outras. Uma característica única da espécie *C. regium*, dentre as espécies do gênero, é a sua plasticidade em relação à floração. As flores aparecem no topo da parte aérea anual, que geralmente está desfolhada na época. Quando o ramo do ano é destruído, pelos incêndios, por exemplo, que são bastante frequentes nos Cerrados, as flores nascem ao nível do solo a partir do xilopódio, de onde também saem os ramos. Esta característica colabora para que a espécie se adapte as intempéries da natureza e as ações antrópicas (POPPENDIECK, 1981).



Figura 1: Planta de *Cochlospermum regium*. (A) No habitat natural. (B) Detalhes da flor.

2.2.2 Etnobotânica e etnofarmacologia

A espécie *Cochlospermum regium* é intensamente utilizada na medicina popular e suas raízes são comercializadas por raizeiros em todo bioma do Cerrado. Nunes et al. (2003) fizeram um levantamento de espécies comercializadas por raizeiros nos anos de 1992 e 2002, e dentre estas espécies (32), verificaram que o *C. regium* foi a 5^a e 6^a mais citada pelos comerciantes. Dentre suas inúmeras utilizações pela medicina popular, dá-se importância principalmente à utilização contra infecções de ovário e do sistema reprodutor feminino (Tabela 2).

Tabela 2: Região brasileira onde se utiliza *C. regium* como medicinal, órgão utilizado, formas de uso e indicação terapêutica

Região	Órgão utilizado	Formas de uso	Indicação terapêutica	Referências
Tocantins	*	*	Dores de cabeça	Rodrigues e Carlini, 2005
Mato Grosso	Raiz	Chá, garrafada	Inflamação em geral, problema de próstata e pneumonia	Moreira e Guarim-Neto, 2009
Goiás	Xilopódio	Chá, garrafada ou pó	Infecções ginecológicas, gastrite e úlcera gástrica	Tresvenzol et al., 2006
Goiás	*	*	Infecção gástrica	Carvalho, 2004
Mato Grosso do Sul	Raiz	*	Colesterol, feridas internas e externas, laxante, depurativo do sangue, inflamação da pele, útero, ovário e próstata	Nunes et al., 2003
Mato Grosso	Casca	Chá	Depurativo do sangue	Guarim-Neto, 2006
Goiás	*	*	Inflamações uterinas, vias urinárias, diarreia	Souza e Felfili, 2006
Mato Grosso	Rizóforo	Decocto, chá	Infecções, inflamações, corrimentos, depurativo	Souza e Felfili, 2006
Mato Grosso	Folha	Chá	Cálculo renal, úlcera	Sangalli et al., 2002

* Não há especificações

2.2.3 Estudos Agronômicos

Sementes de *C. regium* apresentam tegumento duro o que dificulta a permeabilidade da água conferindo-lhe a condição de dormência. Segundo Kirizawa (1981), a semente desta espécie é constituída também, por uma camada paliçádica resistente na parte mais externa do tegumento revestida por uma camada delgada, que se removida através de escarificação permite a embebição normalmente.

A superação da dormência das sementes de *C. regium* já foi avaliado por Sales et al. (2002) e Camillo (2008). Esta foi conseguida através da escarificação química por ácido sulfúrico por períodos de 90 a 150 minutos resultando até 80% de germinação em papel umedecido.

Em se tratando de armazenamento das sementes de *C. regium*, Camillo (2008), verificou que sementes com 7,9% de umidade e mantidas em temperatura sub-zero

(-20°C) pode ser uma alternativa para conservação *ex situ* da espécie, garantindo característica ortodoxa para estas sementes.

O melhor substrato para germinação e desenvolvimento das plântulas de *C. regium* foi avaliado por Viu et al. (2007) e Sales et al. (2008). O substrato comercial vermiculita foi o mais eficiente em promover a germinação e maior altura de plântulas, segundo estes autores isso ocorreu devido às propriedades físicas do mesmo, que proporciona grande porosidade, aeração e boa capacidade de retenção de água. O maior número de folhas foi conseguido em substratos contendo solo de Cerrado+esterco (7:3) e solo de Cerrado+esterco+areia (1:1:1) com uma média de até 5 folhas por plântula ao final de 28 dias. Além de condições a campo, Sales et al. (2008) verificaram que em condições de laboratório os substratos papel toalha, papel mata borrão, vermiculita, palha de arroz carbonizada, terra preta, areia, solo de Cerrado e a mistura de todos os substratos apresentaram o mesmo valor estatístico para germinação.

A luminosidade e a temperatura exercem influência sobre a germinação das sementes de *C. regium* e os melhores resultados são obtidos no escuro, vermelho e vermelho-extremo (81,2%, 90,7% e 74,7% respectivamente) e em temperatura de 25°C, obtendo-se até 90% de sementes germinadas com IVG de 2,6 (SALES, 2001).

Em se tratando de conservação, sob condição *in vitro*, Camillo et al. (2009) estabeleceram crescimento mínimo de explantes *C. regium* em meio de cultura WPM (½) a uma temperatura de 20°C.

2.2.4 Fitoquímica

Pouco se sabe sobre a composição química da espécie *Cochlospermum regium*. Em 1996, Lima e colaboradores isolaram uma flavonona glicosilada denominada Dihidrokaenferol 3-O-glucopiranoside (C₂₁H₂₂O₁₁). Segundo Ritto (1996), foram isolados da raiz dessa espécie flavonóides e o ácido graxo 1-hidroxitetradecanona-3.

Honda et al. (1997), analisando o óleo essencial de *C. regium*, por cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas encontraram as seguintes substâncias: 34,1% β-selineno, sendo o mais freqüente, 5,4% de elemeno, 4,8% de trans-cariofileno, 3,4% de α-pineno, 2,8% de α-humuleno, 2,1% de aromadandreno, 1,2% de α-

selineno, 0,8% de δ -cadineno, além de outros compostos não identificados que resultaram em 45,4% do rendimento total do óleo. Segundo estes autores, as folhas de *C. regium* produzem 0,24% de óleo essencial,

2.2.5 Farmacologia

Do ponto de vista farmacológico, os extratos liofilizados de raízes de *C. regium* não apresentam toxicidade aguda quando administrados via oral (RITTO, 1996).

O teste de Ames realizado em *Salmonella typhimurium*, com extrato de *C. regium*, mediu a mutagênese bacteriana pelo número de células revertentes para a prototrofia de histidina e os resultados mostraram que o extrato liofilizado de raiz nas concentrações de 0,01; 0,1; 0,5; 1,0; 2,0 e 5,0g mL⁻¹, não exibiu atividade mutagênica (LIMA, 2002). Resultados semelhantes foram obtidos por Nunes e Carvalho (2003), no qual verificaram que extrato de raiz liofilizado nas concentrações 13, 19 e 25g L⁻¹ não mostraram atividade mutagênica nem direta nem indiretamente sobre larvas de *Drosophila melanogaster* pelo teste RXL (ring-X loss) que detecta a perda total do cromossomo X e a perda parcial do cromossomo Y.

Outro estudo realizado a partir de Teste de Micronúcleo em medula óssea de camundongos, com extrato liofilizado de raiz de *C. regium*, mostrou que não ocorreu modificação do DNA celular, não apresentando assim efeito antimutagênico (ANDRADE et al., 2008). Em contra partida, um trabalho realizado por Castro et al. (2004) mostrou que o extrato de raiz de *C. regium* liofilizado apresentou atividade mutagênica e citotóxica em eritrócitos da medula óssea de camundongos. Segundo os autores, esses efeitos são dados pela presença dos flavonóides e taninos.

Castro (2000) estudou o efeito antinociceptivo do 3-O-glicosildihidrocanferol extraído das raízes de *C. regium*, e postulou que esta ação não ocorre por bloqueio da pirenzepina e L-arginina, e também não interfere na síntese de óxido nítrico, mostrando que o mecanismo de ação da droga ocorre de modo diferente dos mecanismos clássicos, sendo desta forma, relevante o desenvolvimento de estudos mais aprofundados sobre essa substância para o desenvolvimento de drogas analgésicas.

Segundo Ritto (1996), o extrato liofilizado de raízes de *C. regium* inibe lesão gástrica induzida por indometacina e não apresenta atividade antiedematogênica.

2.2.6 Atividade antimicrobiana

Existem poucos estudos relacionados à atividade antimicrobiana com a espécie *Cochlospermum regium* e esses poucos relatos são sobre atividade antibacteriana.

Os extratos hexânico, hidro-alcóolico, acetato de etila, N-butanol, decoctos preparados conforme utilizado na medicina popular (12, 24 e 60g L⁻¹) e também da flavanona 3-0-glicosildihidrocanferol foram avaliados quanto a atividade antimicrobiana por Oliveira et al. (1996). Estes autores concluíram que o extrato hexânico e acetato de etila apresentaram atividade frente à *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, o extrato butanólico mostrou efeito somente contra *S. aureus* e a flavanona 3-0-glicosildihidrocanferol e o decocto não apresentaram atividade frente as linhagens avaliadas.

Segundo Honda et al. (1997), o óleo essencial das folhas de *C. regium* também apresentou atividade antibacteriana frente à *Staphylococcus aureus* (MIC=1,5mg mL⁻¹) e *Salmonella typhimurium* (MIC=5mg mL⁻¹).

2.3 Micropropagação

A micropropagação ou propagação *in vitro* proporciona a clonagem de muitas espécies, permitindo a formação de indivíduos geneticamente idênticos a partir de células, órgãos ou pequenos fragmentos de uma planta matriz, denominados totipotentes. É um procedimento de importância prática e potencial na agricultura, principalmente na produção de plantas em larga escala, no intercâmbio de germoplasma, e na pesquisa básica no que se refere a citologia e fisiologia celular (SOUZA et al., 2006). Apesar de ser mais utilizada para espécies de propagação vegetativa, o seu uso para formação de clones de genótipos superiores para espécies que se reproduzem por sementes tem se mostrado eficiente e viável (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998; CALGAROTO et al., 2007; LIMA et al., 2007;

NASCIMENTO et al., 2007; NERY et al., 2008; RIBEIRO et al., 2009; SAMARA et al., 2009), ampliando dessa maneira seu leque de aplicação.

Alguns procedimentos básicos iniciais devem ser seguidos a fim de utilizar a técnica de micropropagação, dentre estes incluem-se: a seleção da planta matriz, no qual deve ser considerado a sanidade e o estágio fisiológico da planta, sendo plantas mais jovens comprovadamente as mais indicadas como matrizes por serem mais sadias (ALBUQUERQUE et al., 2000; SETHER et al., 2001; TEIXEIRA, 2005; CARVALHO et al., 2006); o tipo de explante utilizado para iniciar o cultivo *in vitro*, que podem ser folhas, cotilédones, talos, segmentos nodais, ápices caulinares e radículas, entre outros. O nível de diferenciação do tecido e a fase de desenvolvimento em que se encontra devem ser levados em consideração para garantir o potencial morfogênético e a estabilidade genética (SERRANO GARCÍA e PIÑOL SERRA, 1991).

O meio de cultura no qual o explante será inoculado é composto basicamente por sais minerais, uma fonte de carbono (açúcar), alguns aminoácidos, vitaminas e reguladores vegetais. Como açúcar pode ser utilizado a sacarose (mais comum), a manose, a glicose, a frutose e a ribose, entre outros, uma vez que inicialmente o explante não é autotrófico (BARRUETO CID, 2001; NICOLOSO et al., 2003; REGO-OLIVEIRA et al., 2003; KROGSTRUP et al., 2005; AIRES et al., 2007; MOREIRA et al., 2007; RIBEIRO et al., 2007; RUŽIĆ et al., 2008; BAHMANI et al., 2009; TAPINGKAE et al., 2009).

O balanço nutricional e hormonal do meio é dependente da fase do cultivo e da demanda de cada espécie. Normalmente, para a produção de gemas e múltiplos brotos utiliza-se um balanço rico em citocinina, enquanto que para o enraizamento, doses maiores de auxinas. Já para o alongamento, faz-se a adição de giberelinas. No entanto, este modelo não pode ser generalizado, mas vem sendo utilizado como ponto de partida para determinação de protocolos de micropropagação de muitas espécies com sucesso (ERIG e SCHUCH, 2006; MENDES et al., 2007; AIRES et al., 2008; FLORES et al., 2009; LIMA NETO et al., 2009; RADMANN et al., 2009; ROCHA et al., 2009; SCHMILDT et al., 2009).

Para que a micropropagação tenha êxito, é necessário que as condições de incubação estejam bem ajustadas. De maneira geral, para a grande maioria das espécies, uma incubação inicial, em presença de luz, com intensidade de 20 a 70 $\text{mmol/m}^2/\text{s}$, e com temperaturas entre 20°C e 27°C são satisfatórias para muitas plantas. O fotoperíodo mais

utilizado nos laboratórios está entre 12h e 16h, e tem grande resposta morfogênica *in vitro*. (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

2.3.1 Etapas Básicas da Micropropagação

Definem-se três etapas básicas na micropropagação: estabelecimento, multiplicação e enraizamento. Em alguns casos, se faz necessária uma fase de alongamento em meio de cultura próprio, que precede o enraizamento, assim como a aclimação pode ser considerada a etapa final, ainda que realizada fora das condições de laboratório (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

A fase de estabelecimento da cultura inclui e desinfestação do material a fim de eliminar a contaminação superficial dos explantes e várias são as substâncias que podem ser utilizadas neste processo: etanol (em diluição de 70%), hipoclorito de sódio (NaOCl), 1% a 3% de cloro ativo, Tween®, fungicidas e bactericidas em geral, dentre outros (FLORES et al., 1998; NIETSCHKE et al., 2006; CANO et al., 2007; DINIZ et al., 2008; AMÂNCIO et al., 2009; BRONDANI et al., 2009). Deve-se considerar a fragilidade do explante ao determinar o tempo de exposição a estes produtos.

A fase de multiplicação implica na adição de reguladores vegetais no meio de cultura e é nesta etapa que se pode obter o maior número possível de plantas, por meio de subcultivos sucessivos. Porém, forçar em demasia as taxas de multiplicação, assim como prolongar muito esta fase, pode não ser conveniente em vista da ocorrência de plantas variantes (MORENO e ROIG, 1990; SOUZA, 2001).

Após a fase de multiplicação, e quando a parte aérea está formada, passa-se à fase de enraizamento que pode ser conseguido por meio da adição de auxinas ou outros agentes rizogênicos ao meio de cultura. Uma estratégia que vem sendo utilizada com êxito é a redução da concentração de macro e/ou micronutrientes da solução básica que compõe o meio, já que altas concentrações de sais minerais parecem interferir tanto na indução como na iniciação e alongamento das raízes (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Para espécies do Cerrado o enraizamento *in vitro* se mostra mais complicado que para espécies de outros biomas. Por isso, o enraizamento *ex vitro* pode ser uma alternativa mais segura e viável (MORAES et al., 2007).

Definida as condições de enraizamento passa-se para a fase de aclimação. Esta requer atenção e maiores cuidados devido à fragilidade das plantas *in vitro* e a dificuldade que pode representar a transferência das plantas das condições *in vitro* para *ex vitro*, como a excessiva perda de água por evapotranspiração que ocasiona estresse hídrico (Souza et al., 2006). No entanto, muitos experimentos conseguem com sucesso a aclimação de plantas micropropagadas (GIRARDI et al., 2007; LÉDO et al., 2007; NASCIMENTO et al., 2009; PORTELA et al., 2009; VICENTE et al., 2009).

2.3.2 Reguladores vegetais

A adição de reguladores vegetais no meio de cultura objetiva a tentativa de suprir as possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes, e também estimular o alongamento, a multiplicação da parte aérea e desenvolvimento do sistema radicular.

A necessidade de utilização de auxinas e/ou citocininas no estabelecimento de um protocolo de micropropagação é bem documentada na literatura como mostrado anteriormente. Skoog e Miller (1957) estabeleceram que uma alta relação citocinina/auxina (c/a) promove a proliferação de brotos e suprime o desenvolvimento de raízes (Fase 2 da micropropagação), enquanto que uma baixa relação c/a favorece o desenvolvimento de raízes (Fase 3 da micropropagação).

Para a fase de multiplicação, geralmente, a introdução das citocininas é indispensável, pois são responsáveis pela quebra da dominância apical induzindo a proliferação de gemas laterais (MOK et al., 2000). Combinações com outros reguladores podem ser avaliados. As espécies respondem diferentemente a tipo de citocinina e a diferentes concentrações sendo que o sucesso da multiplicação *in vitro* está nas tentativas e erros e nas necessidades e/ou problemas encontrados durante os testes. A dose de citocinina utilizada deve induzir uma taxa de proliferação aceitável sem causar o amarelecimento ou malformação dos brotos.

Na fase de enraizamento, as citocininas são geralmente omitidas e adiciona-se ao meio de cultura as auxinas, que são de um modo geral, indispensáveis para o enraizamento das partes aéreas formadas na fase de multiplicação *in vitro* (KRIKORIAN,

1993). O tipo e a concentração das auxinas eficientes para o enraizamento, assim como para as citocininas variam conforme a espécie (KRIKORIAN, 1993; CALDAS et al., 1998).

Quando a concentração de auxina no meio de enraizamento é excessiva, ocorre a formação de calo na base do explante, comprometendo a rizogênese e o crescimento da parte aérea. Em alguns casos é necessário utilizar dois meios diferentes para o enraizamento: um meio rico em auxina para indução e iniciação, e outro sem regulador vegetal para estimular a emergência e o crescimento das raízes até que estejam suficientemente alongadas para o transplântio. Entretanto, este procedimento acarreta no aumento dos custos da planta micropropagada (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

O ideal é utilizar um meio que favoreça a indução, iniciação e alongamento das raízes, ou então induzir o enraizamento *in vitro* e deixar que o alongamento ocorra no substrato de transplântio, o que reduziria o custo e permitiria um melhor desenvolvimento do sistema radicular. Reguladores vegetais que não fazem parte do grupo das auxinas são dispensáveis ou até prejudiciais a esta fase de enraizamento: as citocininas podem dificultar o enraizamento, já as giberelinas e o ácido abscísico inibem a formação de raízes.

2.4 Conservação em Banco de Germoplasma *in vitro*

O Banco de germoplasma vegetal visa conservar espécies de plantas úteis aos homens em condições seguras. Isto permite sua utilização em pesquisas, no desenvolvimento de novas variedades e na sua recuperação, no caso de alguma catástrofe ocasionar o desaparecimento das variedades cultivadas. Tem sido amplamente utilizados por universidades e empresas de pesquisa a fim de manterem-se as espécies potenciais protegidas (KEATMETHA et al., 2006; SARASAN et al., 2007; HOLOBIUC et al., 2008; DIMITROVA e MARCHEVA, 2009; LATA et al., 2009; RANGSAYATORN et al., 2009; RITSCHHEL et al., 2009).

Para ser considerado um bando de germoplasma, este deve conter uma variabilidade genética mínima que represente o acesso (tamanho efetivo e frequência de alelos), seja cultivar elite ou primitiva, população, raça, espécie ou gênero (CARVALHO et al., 2008).

Para conservação da viabilidade das espécies, utiliza-se o banco de germoplasma destinado à preservação da máxima variabilidade genética vegetal existente, desde as modernas cultivares até as espécies silvestres, com o objetivo de: conservar fontes genéticas para futuro uso em melhoramento e estudos em genética; manter coleções de diferentes genótipos devidamente caracterizados e avaliados para uso em programas de melhoramento; e prevenir e evitar a perda de recursos genéticos (TOWILL, 2000).

A diversidade contida em um germoplasma deve ser protegida de eventuais perdas para garantir a sua utilização, e tem sido coletada nos centros de origem das culturas. Segundo Vieira (2000) as coleções de germoplasma têm sido mantidas em instituições diversas, com a responsabilidade de: 1) garantir a sua diversidade; 2) multiplicá-la; 3) distribuí-la aos usuários e 4) promover a sua caracterização por diferentes metodologias.

O banco de germoplasma *in vitro* é um dos métodos utilizados para a conservação *ex situ* de material genético sob condições assépticas. Para cada espécie são necessários estudos para estabelecimento de protocolo específico, entretanto, para algumas plantas que não produzem sementes, ou que raramente produzem sementes como é o caso das espécies propagadas por bulbos e rizomas, a cultura *in vitro* tem sido a opção mais viável para a conservação. Este método está sendo cada vez mais utilizado para espécies que produzem sementes com pouca frequência, para conservação de materiais coletados no campo em fase estéril, bem como para espécies recalcitrantes, isto é, que não toleram desidratação e armazenamento por longo prazo a baixas temperaturas (HOYT, 1992).

Coleções *in vitro*, em geral, são conservadas em banco de germoplasma sob condições especiais protegidas de eventuais perdas, garantindo a sua utilização a curto, médio e longo prazo. Materiais introduzidos nesses bancos têm sido coletados nos centros de origem das culturas ou nas regiões onde se desenvolvem raças locais (TOWILL, 2000).

O crescimento *in vitro*, durante o período de conservação, pode ser limitado por vários fatores físicos e químicos, tais como a redução da temperatura e/ou intensidade luminosa, a diluição dos elementos nutritivos no meio de cultura e uso de agentes osmóticos, capazes de inibir o crescimento do material em cultivo (VILLALOBOS e ENGELMAN, 1995).

Plantas mantidas em banco de germoplasma têm baixa taxa de divisão celular, o que tende a diminuir a frequência de mutações que podem ocorrer durante a duplicação do DNA na fase mitótica do ciclo celular (HENSHAW, 1982).

Nos últimos anos, as técnicas de cultura *in vitro* para conservação em médio prazo em banco de germoplasma foram amplamente desenvolvidas e aplicadas em mais de 1000 espécies, muitas das quais são de regiões tropicais (LATA, 1991).

Segundo Villalobos e Engelman (1995), desde 1960, houve um crescimento significativo do número de coleções *in vitro* para preservação de plantas e subsequente melhoramento genético. De acordo com a FAO (Food and Agriculture Organization), no ano de 1994 havia 4.410.000 acessos conservados *in vitro*, sendo 50% do total conservado por países industrializados, 38% por países em desenvolvimento e 12% por grupos independentes (ANAON, 1994).

No Brasil uma das iniciativas pioneiras no que se refere à conservação de recursos genéticos de plantas medicinais em cultura de tecidos foi a criação, em 1987, do Banco de Germoplasma *in vitro* de plantas medicinais da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP). O Banco foi instalado a partir de recursos advindos da CEME (Central de Medicamentos - Ministério da Saúde) com objetivo de reunir o maior número possível de acessos de *Maytenus aquifolium* e *M. ilicifolia* para disponibilizar à indústria de fitoterápico um amplo acervo de acessos dessas espécies. Em 2000, com a aprovação de vários projetos financiados pelo CNPq e Fapesp foram introduzidas dezenas de espécies medicinais do Cerrado e da Mata Atlântica na forma de plântulas e células. Posteriormente, em Janeiro de 2001 o banco foi ampliado mais uma vez, a partir de um projeto temático dentro do Programa Biota-Fapesp, cujo objetivo foi a introdução *in vitro* de espécies medicinais da família Bignoniaceae com atividade antitumoral.

Capítulo I. GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Cochlospermum regium* IN VITRO

1. INTRODUÇÃO

O estudo germinativo das sementes de espécies medicinais é necessário para o entendimento das características agronômicas relacionadas à germinação e para otimização do processo de propagação a fim de melhorar a produção em larga escala.

As sementes de *Cochlospermum regium* apresentam característica de dormência devido ao seu tegumento duro que impede a entrada de água. Desta forma, estudos relacionados a superação desta dormência faz-se necessário quando se inicia um estudo agronômico.

A germinação ocorrendo *in vitro* é uma alternativa e um complemento ao método convencional e torna o estudo mais rápido, mais fácil de ser visualizado e exige pouco espaço físico, proporcionando resultados eficientes e com menor uso de material vegetal, além ser uma fonte permanente de explantes livres de contaminantes exógenos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Determinar condições ideais, *in vitro*, de germinação de sementes de *Cochlospermum regium*.

2.2 Objetivos específicos

- 1- Determinar a eficiência de uma metodologia de assepsia;
- 2- Avaliar a manifestação ou não da dormência das sementes introduzidas *in vitro*;
- 3- Estabelecer tempo ideal de imersão em ácido sulfúrico para quebra de dormência das sementes;
- 4- Avaliar a influência do tamanho das sementes sobre a germinação e contaminação endógena.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta e beneficiamento das sementes

Frutos maduros de *Cochlospermum regium* em estado de deiscência foram coletados em locais de ocorrência natural da espécie no mês de agosto de 2008 (Tabela 3). Um ramo contendo folhas e órgão reprodutivo foi utilizado para confecção de uma exsicata que está depositada no Herbário do Departamento de Biotecnologia de Plantas Medicinais da Universidade de Ribeirão Preto sob número 1830. As sementes foram beneficiadas manualmente, separadas por genótipos, armazenadas em sacos de papel graft devidamente identificados e mantidas em câmara fria a 5°C.

Tabela 3: Locais de coleta de frutos e/ou sementes de *C. regium*, com respectiva latitude, longitude e altitude, UNAERP, Ribeirão Preto-SP, 2009.

Local de coleta	Latitude	Longitude	Altitude (m)
João Ribeiro/MT	15°37'16,5"	53°58'55,7"	631
Presidente Murtinho/Vila Paredão/MT	15°35'35,9"	53°14'33,6"	537
Bauxi/MT	15°10'02,5"	56°32'58,8"	226
Barra do Garças/MT	15°51'18,3"	52°24'39,0"	379
Campo Novo do Parecis/MT	14°30'50,4"	57°54'34,0"	481
Chapada dos Guimarães/MT	15°20'13,8"	55°52'46,5"	325
Guia/MT	15°19'11,4"	56°14'20,9"	169
Bom Jardim de Goiás/GO	16°16'38,1"	51°59'49,0"	392
Acorizal/MT	15°13'15,4"	56°24'05,2"	188
Sacramento/MG	19°54'20,7"	47°22'36,5"	891

3.2 Assepsia das sementes

Sementes de *C. regium* foram imersas em benlate, hipoclorito de cálcio e ácido sulfúrico conforme os seguintes tratamentos:

A1= 2 horas em benlate 5%, 30 minutos em hipoclorito de cálcio 0,5%;

A2= 1 minuto em ácido sulfúrico (H₂SO₄) 98% PA, 2 horas em benlate 5%, 30 minutos em hipoclorito de cálcio 0,5% e;

A3= 1 minuto em H₂SO₄, 2 horas em benlate 5%, 30 minutos em hipoclorito de cálcio 0,5%, 40 minutos em H₂SO₄.

As sementes ao serem tratadas com benlate e hipoclorito de cálcio permaneceram sob agitação em mesa orbital à 90rpm e o quanto ao ácido sulfúrico a imersão foi estática em capela de exaustão.

Sementes contaminadas exogenamente *in vitro*, submetidas ao tratamento T0 foram posteriormente imersas em ácido sulfúrico 98% PA por 40 minutos e re-inoculadas em meio de cultura.

3.3 Superação da dormência

As sementes foram imersas em ácido sulfúrico 98% PA (H_2SO_4) por diferentes períodos de acordo com os seguintes tratamentos:

Sd0= 1 minuto em H_2SO_4 ;

Sd1= 20 minutos em H_2SO_4 ;

Sd2= 40 minutos em H_2SO_4 ;

Sd3= 80 minutos em H_2SO_4 ;

Sd4= 120 minutos em H_2SO_4 ;

Sd5= 160 minutos em H_2SO_4 ;

Sd6= 200 minutos em H_2SO_4 .

As sementes utilizadas neste experimento permaneceram armazenadas em câmara fria por 6 meses.

3.4 Influência do tamanho das sementes

As sementes de *C. regium* classificadas em pequenas, médias e grandes (Figura 2) a partir de medições, com paquímetro, de altura, comprimento e largura foram submetidas ao melhor tratamento de superação de dormência (120 minutos em H_2SO_4). As sementes utilizadas neste experimento permaneceram armazenadas em câmara fria por 10 meses.



Figura 2: Tamanhos de sementes de *C. regium* separados visualmente.
A=Sementes grandes/ B=Sementes médias/ C=Sementes pequenas

3.5 Condições gerais dos experimentos

Para avaliar a germinação de *Cochlospermum regium*, as sementes coletadas foram misturadas e formaram um único lote utilizado para os experimentos.

Todas as sementes, após serem submetidas à assepsia e/ou exposição ao ácido sulfúrico, foram lavadas três vezes em água destilada e autoclavada, em câmara de fluxo laminar. A seguir foram inoculadas em cubetas de vidro contendo meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) suplementado com 30g L⁻¹ de sacarose e gelificadas com 2,5g L⁻¹ de Phytigel[®]. Todas as sementes foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 25°C±2°C e intensidade luminosa de 25μMol m⁻²s⁻¹, com fotoperíodo de 16:8h.

As avaliações foram realizadas diariamente por 40 dias, e os parâmetros avaliados foram índice de velocidade de germinação (IVG), porcentagem de germinação, de contaminação exógena e endógena. Foram consideradas germinadas sementes com protrusão radicular. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 3 repetições e 10 replicatas, totalizando 30 sementes por tratamento. Os dados foram submetidos ao teste Tukey 5% com o auxílio do programa SISVAR (FERREIRA, 2005).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Assepsia das sementes

Problemas de contaminação são freqüentes ao se utilizar materiais provenientes do campo na propagação *in vitro*, mesmo quando se realiza uma assepsia prévia. Principalmente os explantes de raízes e tubérculos e materiais com tricomas, estão intensamente contaminados por fungos (BARRUETO CID e ZIMMERMANN, 2006). Desta forma, vários experimentos devem ser realizados para se determinar o melhor método de assepsia.

Nos experimentos realizados com assepsia de sementes de *C. regium*, todos os tratamentos utilizados foram eficientes para eliminar contaminação superficial das sementes. Essa eficiência certamente está relacionada à característica da semente que se apresenta lisa e sem reentrâncias o que facilitou a descontaminação. As sementes submetidas

aos tratamentos com hipoclorito de cálcio, benlate e 1 min. em ácido sulfúrico apresentaram dormência, não germinando no período de 40 dias. Segundo Kirizawa (1981), o tegumento duro das sementes de *C. regium* dificulta a impermeabilidade da água, ocasionando a dormência. A utilização do ácido sulfúrico por 40 min. estimulou a germinação de 56,6% das sementes ($\pm 11,54$) e o IVG foi de 0,26 ($\pm 0,05$). As sementes não apresentaram germinação uniforme.

Sementes introduzidas *in vitro* que foram submetidas ao tratamento T0 e permaneceram no meio de cultura com incidência de contaminação por fungo e foram re-submetidas à assepsia com H₂SO₄, por 40 min., germinaram em 76,6% ($\pm 5,77$) e apresentaram IVG de 0,43 ($\pm 0,02$). O início da germinação ocorreu a partir do 11º dia. Embora esse procedimento tenha promovido uma germinação mais rápida não foi uniforme, revelando a variabilidade genética e rusticidade da espécie. A rápida germinação destas sementes após re-submissão a processo de assepsia pode estar relacionado à degradação do tegumento pela ação dos fungos, que permaneceram por quatro meses em contato com as sementes. Além disso, o tempo que essas sementes permaneceram em contato com o meio de cultura, num ambiente com mais de 70% de umidade, pode ter colaborado para uma lenta embebição das mesmas, favorecendo maior índice de germinação após a imersão em ácido.

4.2 Superação da dormência

A dormência é um período de latência no qual as sementes, mesmo em condições ambientais favoráveis não germinam. Espécies silvestres apresentam em muitos casos, sementes com longos períodos de dormência, mantendo a viabilidade pelos tegumentos duros e por estarem enterradas no solo o que lhes proporciona ausência de luz (CARVALHO e NAKAGAWA, 1980). Este estado de dormência acontece em sementes de *C. regium*.

Experimentos realizados com ácido sulfúrico mostraram que as sementes submetidas por 1 ou 20 min. em H₂SO₄ não apresentaram germinação no período de 40 dias. Ao aumentar o tempo de exposição ao ácido para 40 min. a germinação começou a ocorrer, porém de forma não uniforme. Sementes expostas a 80 e 120 min. em H₂SO₄ germinaram quase que sua maioria, entre o 4º e 15º dia, sendo a germinação uniforme com aumento no IVG (Tabela 4). Este resultado com sementes germinadas *in vitro* corrobora com

os obtidos por Sales et al. (2002) e Camillo et al. (2009) nos quais a superação da dormência das sementes de *C. regium* foi obtida com escarificação química com ácido sulfúrico.

Exposições prolongadas (160 e 200 min.) de sementes de *C. regium* ao ácido sulfúrico promoveram redução da taxa de germinação e aumentaram a porcentagem de contaminação endógena. Quando ocorrem alterações causadoras de estresse na planta, tal como a alteração do pH, há incentivo ao crescimento de fungos endofíticos que podem estar em estado de latência ou podem passar a competir com as sementes por nutrientes minerais e carboidratos (PEREIRA et al., 2003; ALMEIDA et al., 2005). Além disto, o meio ácido também favorece a proliferação de alguns fungos que podem ter seu crescimento aumentado consideravelmente (MACCHERONI Jr. et al., 2004).

A partir dos dados obtidos neste trabalho recomenda-se a imersão das sementes de *C. regium* em ácido sulfúrico por 120 min. para a quebra de dormência e a utilização do ácido para eliminar a contaminação microbiana exógena, dispensando o uso de antimicrobianos no processo de assepsia *in vitro*.

Tabela 4: Porcentagem de germinação, IVG, porcentagem de contaminação exógena e endógena 40 dias após montagem do experimento, UNAERP, Ribeirão Preto-SP, 2009.

Tratamento	% germinação	IVG	% contaminação endógena	% contaminação exógena
Sd0	-	-	-	-
Sd1	-	-	3,3b	-
Sd2	30,0cb	0,30 b	10,0a	-
Sd3	56,6ab	0,69ab	6,6a	-
Sd4	73,3a	0,80 a	-	-
Sd5	46,6bc	0,59ab	16,6a	-
Sd6	46,6bc	0,59ab	13,3a	-
CV %	33,53	27,64	82,92	-

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Tukey.
(-) não houve resultados.

4.3 Influência do tamanho das sementes

O tamanho da semente pode influenciar diretamente na porcentagem e índice de velocidade de germinação e alguns trabalhos relatam que o tamanho da semente

interfere neste processo. O tamanho da semente mais viável para produção agrônômica varia conforme a espécie, podendo ser grande, média ou pequena. A influência pode estar relacionada a maior/menor reserva de nutrientes, água, estágio de desenvolvimento, entre outros. (NAKAGAWA e CAVARIANI, 2005; NIETSCHE et al., 2005; COSTA et al., 2006; DUARTE et al., 2006; GHISOLFI et al., 2006; OLIVEIRA, 2006).

As sementes de *C. regium* não são uniformes quanto às medidas de altura, comprimento e largura (Tabela 5), o que certamente está relacionado à rusticidade e não domesticação da espécie. O tamanho das sementes não influenciou na porcentagem de germinação, que ocorreu de modo desuniforme. Entretanto, sementes consideradas grandes apresentaram IVG maior (0,61) em relação as médias e pequenas. As sementes menores apresentaram maior porcentagem de contaminação endógena (43,3%) (Tabela 6). Microorganismos endofíticos são comuns em sementes. A possibilidade de sementes pequenas viverem em simbiose ou mutualismo com microorganismos endofíticos é aumentada, pois, estas sementes menores possuem menor disponibilidade de nutrientes suficientes para o desenvolvimento do embrião. Assim, possivelmente, microorganismos endofíticos, como fungos, têm o papel de degradar a casca da semente ou outro substrato após a dispersão fornecendo nutrientes para o embrião (STONE et al., 2000).

No experimento que avaliou o efeito do tamanho da semente na germinação foi observada uma redução de 41% na taxa germinativa quando comparado ao experimento de superação da dormência. Como foi utilizado o mesmo tempo de exposição ao ácido sulfúrico (120 min.) para ambos os experimentos e o diferencial entre os tratamentos foi o tempo de armazenamento podemos inferir que sementes de *C. regium* não são longevas. Segundo Camillo (2008), as sementes desta espécie são ortodoxas, entretanto o fato de não serem longevas inviabiliza a conservação convencional em Banco de Sementes. Deste modo a conservação em Banco de Germoplasma *in vitro* poderá ser uma alternativa viável para a conservação desta espécie.

Tabela 5: Médias de comprimento altura e largura de semente de *C. regium*. UNAERP, Ribeirão Preto-SP, 2009.

Tamanho de semente	Dimensões (mm)		
	Altura	Comprimento	Largura
Grande	6,30a	5,41a	2,98a
Média	5,45b	4,54b	2,80b
Pequena	4,65c	3,87c	2,52c
CV %	1,11	2,49	2,26

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

Tabela 6: Efeito do tamanho da semente no IVG, porcentagem de germinação, de contaminação exógena e endógena, UNAERP, Ribeirão Preto-SP, 2009.

Tamanho de semente (mm)	IVG	% germinação	% contaminação endógena	% contaminação exógena
Grande	0,61a	43,3a	6,6b	-
Média	0,26ab	26,6a	6,6b	-
Pequena	0,14b	20,0a	43,3a	-
CV %	46,74	56,66	30,57	-

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

(-) não apresentou resultados

5. CONCLUSÃO

1. Benlate, hipoclorito de cálcio e ácido sulfúrico são eficientes no tratamento de assepsia das sementes de *C. regium*;
2. Sementes de *C. regium* inoculadas *in vitro* apresentam dormência que pode ser superada com imersão em ácido sulfúrico, cujo uso dispensa a utilização de qualquer outro produto de desinfecção no processo de assepsia.
3. O tamanho das sementes não influencia na germinação, porém influencia no IVG e sementes pequenas proporcionam maior porcentagem de contaminação endógena.

Capítulo II: MICROPROPAGAÇÃO DE *Cochlospermum regium*

1. INTRODUÇÃO

A micropropagação ou propagação *in vitro* é uma alternativa ao modelo convencional de propagação vegetativa, cujas plantas são produzidas em meio de cultura e seu crescimento ocorre em salas especiais com temperatura e luminosidade controladas.

Esta técnica, de um modo geral, apresenta como desvantagem o alto custo e a necessidade de mão-de-obra especializada. No entanto, são inúmeras suas vantagens. Agronomicamente, a micropropagação viabiliza a clonagem de espécies obtendo-se mudas livres de doenças, em grande escala e em pequeno espaço físico quando comparado a produção convencional a campo. É uma técnica muito importante, também, no auxílio a conservação de germoplasma *in vitro*, pois proporciona que o material vegetal seja guardado sob condições controladas, livre de doenças e de intempéries ambientais.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estabelecer protocolo de micropropagação de *Cochlospermum regium*.

2.2 Objetivos específicos

- 1- Determinar o estabelecimento de explantes de *C. regium in vitro*;
- 2- Verificar a influência dos reguladores vegetais BAP, cinetina e zeatina na multiplicação de explantes de *C. regium*;
- 3- Avaliar a melhor posição da gema de explantes de *C. regium* quanto à multiplicação;
- 4- Avaliar o efeito do regulador IBA no enraizamento de explantes de *C. regium*;
- 5- Determinar a conservação de germoplasma *in vitro* de *C. regium* através de agentes de estresse osmótico.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Condições gerais dos experimentos

Os experimentos foram realizados no Departamento de Biotecnologia de Plantas Mediciniais da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP).

Os explantes de *C. regium* foram obtidos a partir de plântulas germinadas *in vitro* e de sub-epicagens, os quais, contendo uma gema e medindo aproximadamente 0,5cm (para os experimentos de estabelecimento e multiplicação), e 1,5cm (para o experimento de enraizamento), foram individualizados em câmara de fluxo laminar com auxílio de pinças e bisturis, inoculados em cubetas de 10cm e Ø2cm contendo aproximadamente 10mL de meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) suplementado com 30g L⁻¹ de sacarose, tendo como agente gelificante 2,5g L⁻¹ de Phytigel[®], acrescidos de uma poliamina antioxidante Polivinilpirrolidona - PVP (100mg L⁻¹). O pH do meio de cultura foi ajustado para 6,0 antes da autoclavagem a 121°C por 20 minutos.

Os explantes foram mantidos em câmara de crescimento sob intensidade luminosa 25µMol m⁻²s⁻¹ com fotoperíodo de 16:8h e temperatura de 25°C±2°C.

As avaliações foram realizadas semanalmente, aos 7, 14, 21 e 28 dias, para experimentos referentes ao controle da produção de calos e da vitrificação, ou mensalmente, aos 30 e 60 dias após a montagem dos experimentos, para os experimentos de

multiplicação, posição da gema e enraizamento *in vitro*. A conservação em banco de germoplasma em 25°C foi avaliada mensalmente por um período de 6 meses e em 15°C por 3 meses. A aclimação e o enraizamento *ex vitro* foram avaliados após 56 dias. Os parâmetros avaliados foram: porcentagem de brotação, número de gemas por explante, número de brotação por explante (experimentos com reguladores), altura dos brotos, porcentagem e incidência de calos e porcentagem de vitrificação. Para experimento de enraizamento foram incluídos os parâmetros porcentagem de enraizamento, número de raízes e comprimento de raízes e para o experimento de posição da gema e conservação de germoplasma *in vitro*, o parâmetro porcentagem de sobrevivência. Para incidência de calos, foi dado uma nota em escala crescente (0<1<3<5<7) a partir análises visuais (Figura 3). Quando avaliada, a intensidade de vitrificação seguiu a mesma escala.

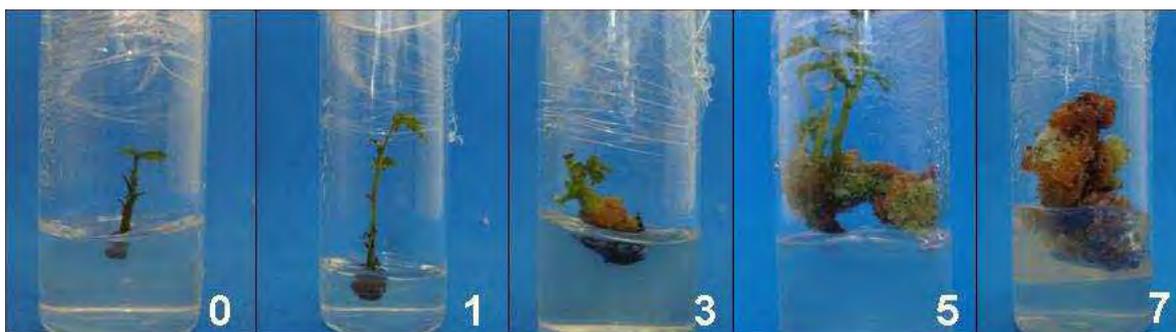


Figura 3: Incidência de calos em explantes de *C. regium*. Notas em escala crescente 0<1<3<5<7, onde, 0 é a ausência de calos e 7 a maior incidência.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Os dados foram analisados no teste Scott Knott 5% com o auxílio do programa SISVAR (FERREIRA, 2005).

2.2 Controle da produção de calos

2.2.1 Concentração do meio de cultura MS, tipo de explante e carvão ativo

Para o experimento que avaliou a concentração do meio de cultura e o tipo de explante foram utilizados três tipos de explantes obtidos diretamente de plântulas originadas do processo germinativo, sendo eles gema apical (GA), gema cotiledonar (GC); hipocótilo (HC) os quais foram inoculados em meio de cultura MS (T0) e MS/4 (T1) ambos com pH 5.0. No meio MS/4 foram reduzidos os macro, micronutrientes e a sacarose.

O segundo experimento avaliou a influência do carvão ativo. Para isto, utilizaram-se explantes provenientes de plântulas subcultivadas *in vitro* e os tratamentos foram:

C0= MS;

C1= MS + carvão ativo (3,5g L⁻¹).

Ambos os experimentos foram compostos por 3 repetições de 10 replicadas, totalizando 30 explantes por tratamento.

2.3 Controle da vitrificação

Os explantes utilizados nestes tratamentos foram obtidos de subcultivos *in vitro* e todas as plântulas apresentavam característica de vitrificação.

2.3.1 Agente gelificante, teor de sacarose, vedação das cubetas e tamanho dos frascos

Para o controle da vitrificação foram avaliados o efeito do teor da sacarose (Sac), do agente gelificante (Ag), da vedação das cubetas (V) e do tamanho do frasco.

Em relação ao efeito do teor de sacarose, foi realizado um teste preliminar com 3 concentrações. Visto o efeito, foram realizados mais testes utilizando-se mais tratamentos com diferentes teores de sacarose.

Experimento 1:

Sac1= MS + 30g L⁻¹ de sacarose;

Sac2= MS + 60g L⁻¹ de sacarose;

Sac3= MS + 90g L⁻¹ de sacarose;

Experimento 2:

Sac4= MS + 20g L⁻¹ de sacarose;

Sac5= MS + 30g L⁻¹ de sacarose;

Sac6= MS + 35g L⁻¹ de sacarose;

Sac7= MS + 40g L⁻¹ de sacarose;

Sac8= MS + 45g L⁻¹ de sacarose;

Sac9= MS + 50g L⁻¹ de sacarose;

Sac10= MS + 60g L⁻¹ de sacarose;

O efeito do Phytigel[®] foi avaliado separadamente em sua concentração normal e dobrada.

Ag0= MS + 2,5g L⁻¹ de Phytigel[®];

Ag1= MS + 5g L⁻¹ de Phytigel[®].

Da mesma forma como para o efeito da sacarose, para vedação das cubetas também foi realizado uma avaliação preliminar utilizando-se duas vedações e visto o efeito, foi realizado um experimento variando o tamanho de abertura das vedações.

Experimento 1:

V0= MS + tampa de plástico;

V1= MS + tampa de papel de filtro;

Experimento 2:

V2= MS + Tampa de plástico;

V3= MS + Tampa com furo de 6,5mm;

V4= MS + Tampa com furo de 9,0mm;

V5= MS + Tampa com furo de 12,0mm;

V6= MS + Tampa de papel de filtro.

Para a execução dos tratamentos Sac5 a Sac11 foram utilizadas 3 repetições de 6 explantes.

Nos tratamentos V2 a V6 os explantes vitrificados foram distribuídos em 3 repetições de 7 explantes, totalizando 21 cubetas por tratamento. As aberturas nas tampas foram feitas com auxílio de furadeira e brocas conforme cada tratamento. Dentro das cubetas, discos de papel de filtro foram postos com o objetivo de vedar o contato do meio de cultivo com o ambiente externo (Figura 4). As tampas de papel de filtro e os discos utilizados para vedar as cubetas foram autoclavados.

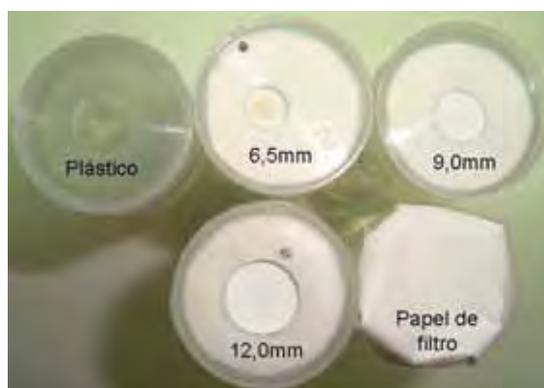


Figura 4: Vedação das cubetas utilizadas nos tratamentos V2 a V6.

A vedação das cubetas novamente foi avaliada, no entanto, utilizando-se outros materiais que poderiam da mesma maneira interferir na umidade dentro das mesmas. Estas foram distribuídas em 4 tratamentos:

V7= MS + tampa de plástico

V8= MS + tampa de alumínio

V9= MS + tampa de filme polivinilcloro (PVC)

V10= MS + tampa de algodão

A influência do frasco foi avaliada mantendo-se os explantes em cubetas e em frascos de 7,5cm de altura e 5,5cm de diâmetro, ambos fechados com tampas plásticas. Este foi realizado conjuntamente com os tratamentos V7 a V10 acima citados.

2.4 Multiplicação *in vitro*

Os explantes utilizados para avaliação dos reguladores vegetais na multiplicação foram obtidos a partir subcultivos de explantes mantidos *in vitro* em meio MS com PVP.

Para este experimento foram utilizados gemas apicais e como reguladores, as citocininas BAP (benzilaminopurina), cinetina e zeatina divididos nos seguintes tratamentos:

M0 = MS;

BAP1 = MS + 0,5 μ M de BAP;

BAP2 = MS + 1,0 μ M de BAP;

BAP3 = MS + 2,0 μ M de BAP;

Cin1 = MS + 0,5 μ M de cinetina;

Cin2 = MS + 1,0 μ M de cinetina;

Cin3 = MS + 2,0 μ M de cinetina;

Zea1 = MS + 0,5 μ M de zeatina;

Zea2 = MS + 1,0 μ M de zeatina;

Zea3 = MS + 2,0 μ M de zeatina.

Para avaliação do efeito dos reguladores vegetais foram utilizados 3 repetições composta de 8 explantes cada uma em esquema fatorial 3 x 4, três reguladores

vegetais e quatro concentrações. Quando os dados foram significativos, foi aplicada regressão polinomial, com o auxílio do programa SISVAR (FERREIRA, 2005).

2.5 Posição da gema

Explantos que continham 4 gemas (Figura 5) foram divididos em 4 posições de gemas:

GA = MS + gema apical;

GL1 = MS + gema lateral 1;

GL2 = MS + gema lateral 2;

GL3 = MS + gema lateral 3.

A gema lateral 3 obrigatoriamente é a que antecede a base do explante. Para este experimento foram utilizados 3 repetições de 7 replicatas, totalizando 21 explantes por tratamento.

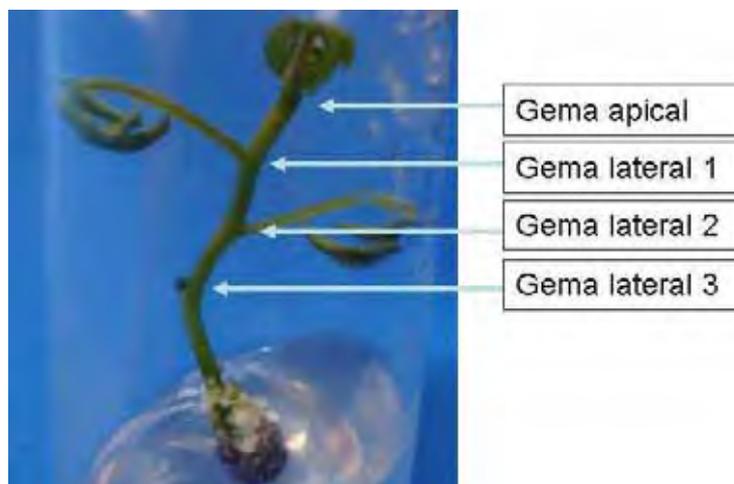


Figura 5: Posições de gemas de plantas de *C. regium* utilizadas.

2.6 Enraizamento *in vitro*

Para o estabelecimento do enraizamento *in vitro* foi utilizada a auxina IBA (ácido indol butírico). Os explantes utilizados continham duas gemas, sendo obrigatoriamente a gema superior, a apical. Da gema inferior a apical, foram retiradas as folhas e esta ficou imersa no meio de cultura contendo IBA. Os tratamentos utilizados foram:

E0 = MS;

IBA1 = MS + 1,0 μ M IBA;

IBA2 = MS + 2,0 μ M IBA;

IBA3 = MS + 4,0 μ M IBA;

IBA4 = MS + 6,0 μ M IBA;

Para avaliação do efeito do IBA no enraizamento de explantes de *C. regium*, foram utilizados 3 repetições composta de 7 explantes cada uma em esquema fatorial 1 x 5, um regulador vegetal e cinco concentrações. Quando os dados foram significativos, foi aplicada regressão polinomial, com o auxílio do programa SISVAR (FERREIRA, 2005).

2.7 Aclimação e Enraizamento *ex vitro*

A aclimação e o enraizamento *ex vitro* foram avaliados utilizando-se plantas *in vitro* não vitrificadas e sem raiz (n=24). Estas tiveram suas bases lavadas em água corrente e foram colocadas em bandejas de isopor contendo o substrato comercial Plantmax[®] enterradas de tal forma que a gema mais próxima a base permanecesse coberta pelo substrato. As plantas foram mantidas em casa de vegetação. Permaneceram totalmente cobertas por frascos de vidro pelo período de uma semana para evitar evapotranspiração excessiva. Decorrido o tempo, os frascos foram retirados por mais uma semana no período noturno, sendo recobertos durante o dia, até a retirada total dos frascos.

As avaliações foram realizadas após 56 dias e os parâmetros avaliados foram: porcentagem de sobrevivência e enraizamento e tamanho das raízes.

2.8 Conservação de germoplasma *in vitro*

A conservação de germoplasma *in vitro* foi avaliada utilizando-se agentes de estresse osmótico sob o crescimento mínimo, divididos em 10 tratamentos:

Cg0 = MS + 2% sacarose;

Cg1 = MS/2 + 2% sacarose;

Cg2 = MS + 2% sacarose + 4% sorbitol;

Cg3 = MS/2 + 2% sacarose + 4% sorbitol;

Cg4 = MS + 2% sacarose + 4% sorbitol + 2mg.L⁻¹ pantotenato de cálcio;

Cg5 = MS/2 + 2% sacarose + 4% sorbitol + 2mg.L⁻¹ pantotenato de cálcio;

Cg6 = MS + 2% sacarose + 4% manitol;

Cg7 = MS/2 + 2% sacarose + 4% manitol;

Cg8 = MS + 2% sacarose + 4% manitol + 2mg.L⁻¹ pantotenato de cálcio;

Cg9 = MS/2 + 2% sacarose + 4% manitol + 2mg.L⁻¹ pantotenato de cálcio.

Estes tratamentos foram avaliados em dois ambientes: um de sala de crescimento a 25±2°C e outro em sala de banco de germoplasma a 15±2°C.

As porcentagens correspondem ao peso/volume (p/v). Para esta avaliação foram utilizados 3 repetições com 7 replicatas, totalizando 21 explantes por tratamento.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Controle da produção de calos

3.1.1 Concentração do meio de cultura MS, tipo de explante e carvão ativo

Os calos são massas celulares indiferenciadas e desorganizadas que se originam da proliferação desordenada a partir de tecidos ou órgãos cultivados *in vitro* (GUERRA e NODARI, 2006), e quando se busca a micropropagação, estes são indesejados. O experimento realizado com diferentes concentrações de meio de cultura (MS e MS/4) e tipos de explantes, mostrou que aos 7 dias após instalação do mesmo, apenas a gema proveniente do

hipocótilo teve produção de calos. A gema apical, em meio MS, apresentou maior taxa de brotação (93,3%) em relação a gema cotiledonar (40,0%) (Tabela 7).

Tanto os explantes mantidos em MS ou o MS/4 formaram calos após 14 dias. No entanto, a gema apical apresentou menor porcentagem e incidência dos mesmos (56,6% e 0,8) (Tabela 7). Esses resultados mostram que a produção demasiada e incontrolada de células não é diminuída pela redução dos macro e micronutrientes do meio de cultura. Aos 21 dias os resultados foram muito semelhantes aos obtidos com 14 dias, porém houve superação da porcentagem de brotação pela gema apical.

Em 28 dias, de modo geral, gemas do hipocótilo apresentaram menor incidência de calos em meio MS/4. O maior número de gemas/explante foi obtido a partir de gema cotiledonar em meio MS (Tabela 7). Já é conhecido que a gema cotiledonar apresenta maiores valores para brotação. Moraes et al. (2007) relatam que gema cotiledonar obtidas após a germinação de sementes, de modo geral, é mais promissora em produção de brotações do que outros tipos de explantes.

A partir dos resultados obtidos pode-se afirmar que a redução da concentração dos nutrientes e sacarose do meio de cultura não diminui a produção de calos e um maior número de gemas é conseguido em meio MS basal.

Tabela 7: Influência do meio MS, MS/4 e das gemas apical (GA), cotiledonar (GC) e do hipocótilo (HC) na porcentagem e incidência de calos, porcentagem de brotação e número de gemas por explante, UNAERP, Ribeirão Preto-SP, 2009.

Dias	Meio de cultura	% de explantes com calos			Incidência de calos/explante			% de brotação/explante			Nº de gemas/explante						
		GA	GC	HC	CV% ²	GA	GC	HC	CV% ²	GA	GC	HC	CV% ²	GA	GC	HC	CV% ²
7	MS	-	-	13,30a	*	-	-	0,20a	*	93,30aA	40,00aB	-	20,70	*	*	*	*
	MS/4	-	-	13,30a	*	-	-	0,20a	*	60,00aA	13,30aB	-	54,55	*	*	*	*
	CV% ¹	-	-	43,30		-	-	50,00		19,20	48,41	-		*	*	*	
14	MS	56,60aB	86,60aA	83,30aA	13,24	0,80aB	1,40aA	1,80aA	23,26	100,00aA	93,30aA	-	7,19	*	*	*	*
	MS/4	60,00aA	90,00aA	83,30aA	17,14	0,60aB	1,20aA	1,10aA	22,11	86,60aA	46,60aA	-	63,20	*	*	*	*
	CV% ¹	25,23	9,24	13,86		37,76	12,62	23,39		8,75	48,09	-		*	*	*	
21	MS	90,00aA	93,30aA	86,60aA	13,86	1,20aA	1,90aA	2,50aA	30,09	100,00aA	96,60aA	-	7,07	*	*	*	*
	MS/4	80,00aA	93,30aA	90,00aA	10,05	0,93aA	1,53aA	1,40aA	23,48	96,60aA	86,60aB	-	12,20	*	*	*	*
	CV% ¹	16,64	6,19	12,23		16,85	21,54	34,54		4,15	9,96	-		*	*	*	
28	MS	90,00aA	93,30aA	86,60aA	13,86	1,43aA	2,40aA	2,70aA	21,90	100,00aA	96,60aA	3,30aB	7,07	3,13aB	5,16aA	0,10aC	7,04
	MS/4	83,30aA	96,60aA	93,30aA	10,98	1,03aA	1,70aA	1,50bA	25,35	96,60aA	86,60aA	-	12,20	2,20bA	2,60aA	-	43,64
	CV% ¹	18,84	6,08	10,14		27,30	18,38	25,15		4,15	9,96	-		12,53	21,11	-	

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Scott Knott.

(-) não teve resultado / (*) não foi avaliado / (°) referente a posição da gema (letra minúscula) / (°) referente a concentração do meio (letra maiúscula).

Quanto ao experimento realizado com carvão ativo, aos 7, 14 e 21 dias após o início dos tratamentos, os valores vegetativos obtidos para os parâmetros avaliados foram muito baixos e não diferiram estatisticamente. Por isso, não estão expostos na Tabela 8.

Aos 28 dias, quando foram avaliadas a porcentagem e incidência de calos, verificou-se que o problema de produção demasiada de calos foi resolvido com a presença de carvão ativo no meio de cultura (Tabela 8) e os valores vegetativos não diferiram dos explantes mantidos em meio MS sem carvão. Geralmente o carvão ativo é utilizado em meio de cultura para auxiliar na adsorção de compostos fenólicos como função de antioxidante e trabalhos relacionados ao seu uso no controle de calos são escassos. No entanto, trabalho de micropropagação realizado com *Caryocar brasiliense* mostrou efeito do carvão ativo na redução dos calos em explantes desta espécie (SANTOS et al., 2006).

Os explantes mantidos em meio com adição de carvão apresentaram menor porcentagem de calos (26,6%) e esta somente apareceu nos explantes que não brotaram. Assim, podemos afirmar que o carvão diminui os calos indesejáveis formados na base dos explantes de *C. regium*.

Tabela 8: Porcentagem de brotação, número de gemas por explante, porcentagem e incidência de calos e altura dos brotos de explantes em função da ausência e presença do carvão ativo no meio de cultura avaliado em 28 dias, UNAERP, Ribeirão Preto-SP, 2009.

Carvão ativo (mg mL⁻¹)	% de brotação	Nº de gemas/ Explante	% de explantes com calos	Incidência de calos	Altura dos brotos
0	86,6a	1,90a	56,60a	0,93a	1,10a
3,5	86,6a	2,10a	26,60b	0,73a	1,20a
CV%	15,62	20,31	13,86	24,98	10,24

Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Scott Knott. (*) não foi avaliado.

3.2 Controle da vitrificação

3.2.1 Agente geleificante, teor de sacarose, vedação das cubetas e do tamanho dos frascos

A vitrificação ou hiperhidricidade é um dos principais problemas na fase de multiplicação *in vitro* e se caracteriza por algumas mudanças morfo-fisiológicas relacionadas com o acúmulo de água intercelular nos tecidos, resultante de uma série de condições de estresse para a planta (SAHER et al., 2005). Essas desordens fazem com que o explante não sobreviva à aclimação, fase muito importante da micropropagação.

As desordens aparecem principalmente nas folhas e caules dos explantes, onde os mesmos apresentam-se translúcidos e com aspecto molhado. Dentre as diversas desordens, podem ser citados: menor número de cloroplastos, menor quantidade de clorofila, hipertrofia do mesófilo e do córtex do caule, má formação dos estômatos, descontinuidade da epiderme, lignificação do xilema, hipertrofia das células, maiores espaços intercelulares, falta de cera cuticular, células-guarda são diferentes quanto à morfologia e impedem mecanicamente o funcionamento estomático (FRANCK et al., 1998; OLMOS e HELLÍN, 1998; APOÂSTOLO e LLORRENTE, 2000). Desta forma, a vitrificação pode ser considerada como um fenômeno patológico em termos de resposta ao estresse (KEVERS et al., 2004). A vitrificação, de uma forma geral, pode ser controlada com a diminuição do potencial hídrico do meio de cultura e do interior das cubetas e frascos.

O primeiro experimento realizado com *C. regium* para tentar controlar da vitrificação foi a utilização de vários teores de sacarose no meio de cultura.

A sacarose é o carboidrato mais utilizado nos meios nutritivos e como resposta é responsável pelas mais altas taxas de crescimento na maioria das espécies. Assim como todos os outros carboidratos, a sacarose fornece energia metabólica e esqueletos de carbono para a biossíntese de aminoácidos e proteínas, polissacarídeos estruturais, bem como todos os compostos orgânicos necessários ao crescimento celular (CALDAS et al., 1998).

Para isto, foram utilizadas concentrações de 30, 60 e 90g L⁻¹ de sacarose no meio de cultura.

Na primeira e segunda avaliação, realizadas ao 7º e 14º dia não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos e os brotos apresentavam-se pouco alongados o que impossibilitou a avaliação da vitrificação. Por este motivo não estão explícitos na Tabela 9. Porém, aos 14 dias, já foi possível observar que explantes outrora vitrificados, não apresentaram essa característica nos explantes mantidos em meio com 60 e

90g L⁻¹ de sacarose, confirmando que a sacarose nas condições avaliadas e menores que 90g são eficientes para o controle da vitrificação (Tabela 9).

Nas avaliações realizadas aos 21 e 28 dias, houve diferença estatística entre todos os parâmetros avaliados, sendo com 30g L⁻¹ de sacarose, os explantes tiveram melhor desenvolvimento com exceção do controle da vitrificação. Esse desenvolvimento foi claramente menor quando se aumentou o teor de sacarose com 60% de brotação para explantes mantidos em meio com 60g L⁻¹ de sacarose e 30% para os mantidos com 90g L⁻¹ (Tabela 9).

Tabela 9: Efeito da adição de sacarose no meio de cultura na porcentagem de brotação, número de gemas obtidas por explante, porcentagem de vitrificação e altura de brotos, UNAERP, Ribeirão Preto-SP, 2009.

Dias	Sacarose (g L ⁻¹)	% brotação	Nº de gemas por explante	% vitrificação por explante	Altura dos brotos
14	30	*	**	33,30a	*
	60	*	**	0,00b	*
	90	*	**	0,00b	*
	CV%	*	*	30,00	*
21	30	80,00a	1,60a	46,60a	*
	60	30,00b	0,66b	0,00b	*
	90	23,30b	0,36b	0,00b	*
	CV%	32,69	58,44	21,43	*
28	30	90,00a	2,23a	50,00a	1,46a
	60	60,00b	1,16b	0,00b	0,76b
	90	30,00c	0,50b	0,00b	0,63b
	CV%	19,25	30,98	34,64	27,27

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Scott Knott.

(*) não foi avaliado / (**) não foi possível avaliar

Outra característica exclusiva de explantes que foram mantidos em alta concentração de sacarose, além do aparecimento de coloração avermelhada nas folhas (Figura 6), foi a abscisão foliar quando em doses superiores a 30g L⁻¹. Essa abscisão parece estar relacionada com a presença das antocianinas, sugerindo talvez que o alto teor de sacarose provoque um aumento na produção de etileno, e este etileno estimule enzimas da rota das antocianinas. Pois, em todas as situações que apareceu coloração avermelhada nas folhas,

houve posterior queda das mesmas, envelhecimento e morte dos explantes após certo período de exposição dos mesmos ao alto teor de sacarose. A biossíntese dos flavonóides, conseqüentemente das antocianinas, podem ser afetadas pelos hormônios vegetais com exceção do ácido giberélico e dos inibidores dos receptores do etileno que diminuem sua síntese. Já o ácido abscísico, auxina e etileno são responsáveis por um aumento de flavonóides (BRAIDOT et al., 2008).

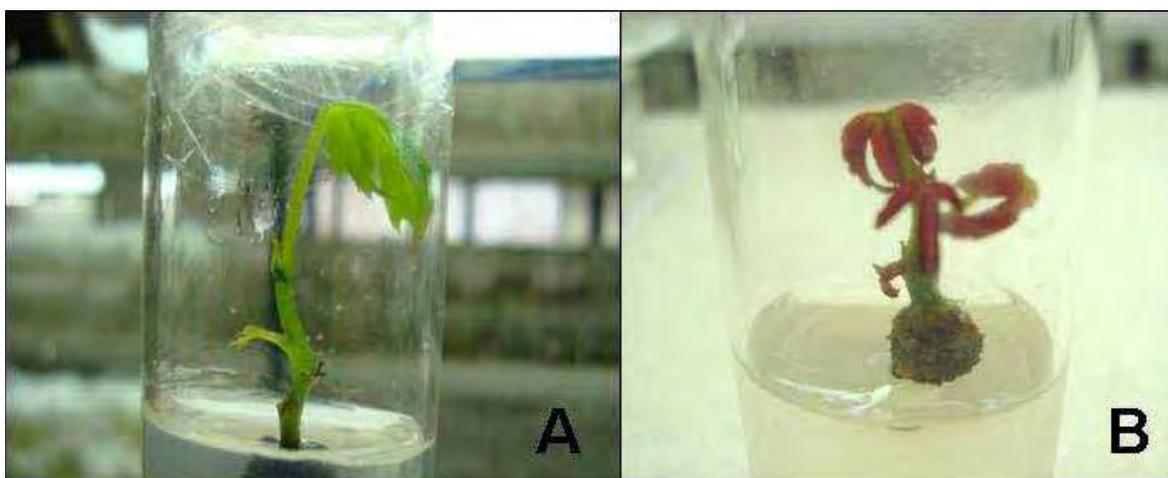


Figura 6: Explantes de *C. regium* vitrificados (A) e com presença de possíveis antocianinas nas folhas (B).

Em todos os experimentos realizados com sacarose, foi possível observar que esta realmente influencia na desvitrificação dos explantes. No entanto, as condições até então avaliadas, apesar de controlar a vitrificação, contiveram o desenvolvimento normal das brotações. Segundo Grattapaglia e Machado (1998), concentrações de sacarose acima de 2-4% podem incorrer em problemas de excessivo potencial osmótico, podendo causar deterioração dos explantes. Para tanto, novas avaliações com concentrações menores de sacarose adicionadas ao meio se fizeram importante na busca da concentração ideal para resolução dos problemas: vitrificação e baixa taxa de produção de gemas, justificando os tratamentos Sac3 a Sac8 que utilizam 20, 30, 35, 40, 45, 50 e 60g L⁻¹ de sacarose no meio MS.

Os resultados obtidos com os explantes na primeira avaliação (7 dias) foram muito discrepantes, por isso não aparecem na Tabela 10. Explantes mantidos em todos os tratamentos apresentarem porcentagem de brotação, no entanto, os brotos não estavam alongados o suficiente para que fosse possível observar plantas vitrificadas. Da mesma forma aconteceu na segunda avaliação, aos 14 dias: não houve diferença significativa para nenhum dos parâmetros avaliados.

No 21º dia, após início dos tratamentos, foi possível averiguar uma diminuição na porcentagem e intensidade de vitrificação conforme o aumento da concentração de sacarose no meio de cultura (Tabela 10). Para variáveis vegetativas, referentes a multiplicação, a sacarose nas concentrações de 20 e 35g L⁻¹ apresentaram os mais altos valores.

O aumento da sacarose para 35 e 45g L⁻¹ proporcionou melhores resultados vegetativos sob explantes de *C. regium* mantidos *in vitro* aos 28 dias. Apesar de essas condições apresentarem porcentagem de vitrificação não muito baixas, a intensidade da vitrificação foi menor nos explantes mantidos nestes tratamentos que os mantidos em tratamentos com teores menores, podendo ser escolhido como melhor meio para estabelecimento *in vitro* com 45g L⁻¹ de sacarose. Na avaliação dos 28 dias ficou comprovado que realmente ao aumentar a concentração de sacarose acima do comumente usado (3%), aumenta a presença de antocianinas nos explantes.

Tabela 10: Efeito da adição de sacarose no meio de cultura na porcentagem de brotação, número de gemas obtidas por explante, porcentagem e intensidade de vitrificação, altura de brotos e % de sobrevivência dos explantes, UNAERP, Ribeirão Preto-SP, 2009.

Dias	Teor de sacarose (g L ⁻¹)	% brotação	Nº de gemas/explante	% vitrificação/explante	Intensidade vitrificação	Altura dos brotos	% sobrevivência	% plantas com antocianinas
14	20	83,33a	1,78a	**	**	*	100,00a	*
	30	50,00a	1,00a	**	**	*	100,00a	*
	35	53,33a	2,38a	**	**	*	94,44a	*
	40	61,11a	1,83a	**	**	*	100,00a	*
	45	61,11a	1,39a	**	**	*	100,00a	*
	50	72,22a	1,83a	**	**	*	100,00a	*
	60	61,11a	1,28a	**	**	*	100,00a	*
	CV%	25,33	38,35	*	*	*	3,67	*
21	20	94,44a	3,52a	66,67a	3,33a	*	94,44a	*
	30	66,67a	2,47a	44,44b	1,89b	*	94,44a	*
	35	70,00a	4,81a	35,50b	0,73c	*	83,33a	*
	40	66,66a	3,49a	11,11c	0,22c	*	100,00a	*
	45	83,33a	2,72a	0,00c	0,00c	*	100,00a	*
	50	88,89a	3,33a	16,67c	0,27c	*	100,00a	*
	60	72,22a	2,33a	0,00c	0,00c	*	88,89a	*
	CV%	20,77	28,09	41,69	44,94	*	9,43	*
28	20	94,44a	4,19b	94,44a	4,61a	1,14a	94,44a	0,00c
	30	71,11b	3,39b	65,56b	2,83b	0,56b	94,44a	0,00c
	35	100,00a	7,08a	58,33b	0,92c	0,92a	66,67a	33,33b
	40	88,89a	5,86a	58,59b	0,92c	1,03a	66,67a	47,78a
	45	100,00a	4,67b	40,00c	0,40c	0,67b	83,33a	33,33b
	50	100,00a	5,00b	33,33c	0,33c	0,87a	83,33a	60,00a
	60	94,44a	3,18b	16,67c	0,17c	0,75b	77,78a	24,44b
	CV%	10,11	21,15	33,86	39,07	17,64	15,56	49,46

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Scott Knott. (*) não foi avaliado/ (**) não foi possível avaliar

Uma forma também utilizada para controlar a vitrificação é o aumento da concentração de agente gelificante no meio de cultura. Dentre as diversas características dos agentes gelificantes nos meios de cultivo destaca-se o favorecimento que estes proporcionam ao controle osmótico do meio sobre o explante cultivado, evitando desta forma, que ocorra excesso de umidade e conseqüentemente, a vitrificação (WU, 2007).

Para o experimento com *C. regium* os explantes mantidos em MS com 2,5 e 5g L⁻¹ de Phytigel[®], na primeira avaliação, realizada após 7 dias de montagem do experimento, não foi observada diferença significativa (Tabela 11).

O aumento na concentração de Phytigel[®] para 5g L⁻¹, diminui o número de gemas dos explantes, além de não solucionar a vitrificação após 14, 21 e 28 dias (Tabela 11). Alguns agentes gelificantes vêm sendo empregados com sucesso no controle da vitrificação, como Gelrite e Ágar. No entanto, para algumas culturas, elevados teores podem ser eficientes na vitrificação, mas podem diminuir a taxa de multiplicação (BRAND, 1993; LEITE et al., 1993; CUZZUOL et al., 1995; ROCHA, 2006). No caso, o agente gelificante utilizado no experimento com *C. regium*, a concentração de Phytigel[®], não apresentou influência sobre a vitrificação e reduziu o número de gemas formadas por explante.

Tabela 11: Efeito do Phytigel[®] nos parâmetros porcentagem de brotação, número de gemas por explantes, porcentagem de vitrificação e altura dos brotos de explantes de *C. regium*, UNAERP, Ribeirão Preto-SP, 2009.

Dias	Phytigel [®] (g L ⁻¹)	% brotação	Nº de gemas/ explante	% vitrificação	Altura dos brotos
7	2,5	50,00a	0,70a	46,60a	*
	5,0	50,00a	0,56a	50,00a	*
	CV%	20,00	34,11	26,71	*
14	2,5	70,00a	1,40a	50,00a	*
	5,0	56,60a	0,86b	50,00a	*
	CV%	12,89	29,27	40,00	*
21	2,5	73,30a	2,06a	56,60a	*
	5,0	66,60a	1,73b	56,60a	*
	CV%	19,34	28,02	26,96	*
28	2,5	76,60a	2,70a	56,60a	1,48a
	5,0	80,00a	2,20b	53,30a	1,73a
	CV%	16,48	20,07	24,62	18,34

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Scott Knott. (*) não foi avaliado

Possivelmente, a principal causa da vitrificação é a alta umidade existente dentro das cubetas. O tratamento com tampa de papel de filtro (V0 e V1) foi escolhido, pois esta tampa, por possuir uma porosidade maior, permite a diminuição da umidade estabelecida *in vitro*. Experimentos com cultivos *in vitro* utilizam diferentes formas de vedação dos frascos e cubetas a fim de controlar a vitrificação e, dependendo da espécie, apresentam resultados satisfatórios. Estas vedações podem ser de alumínio, metal, vitafilmeR, plástico e algodão (SOUZA et al., 1999; BANDEIRA et al., 2007; RIBEIRO et al., 2007; SANTANA et al., 2008). No experimento com *C. regium* foi proposto mais uma forma de vedação: de papel de filtro. No entanto, essa condição não solucionou o problema, pois, devido à elevada evaporação da água do meio de cultura ocorreu uma intensa desidratação dos explantes, ocasionando a morte dos mesmos em 28 dias de experimento.

Ao se pensar em diminuir a umidade, a tampa de papel de filtro foi eficiente, no entanto, reduziu-a demasiadamente, tornando inviável esta forma de controle da

vitrificação. Logo, a fim de aperfeiçoar a solução para a vitrificação a partir de métodos físicos, experimentos utilizando várias formas de vedação (V2 a V6) foram realizados.

A redução da intensidade da vitrificação pelas diferentes vedações das cubetas foi observada a partir do 14º dia após início dos tratamentos. No entanto, tanto aos 7 como aos 14 dias de avaliação, os brotos apresentavam-se pouco alongados dificultando as avaliações.

Aos 21 e 28 dias foi possível observar uma tendência a diminuição da porcentagem de brotação e do número de gemas em explantes mantidos nos tratamentos V3, V4, V5 e V6 quando comparados ao V2, ou seja, em todas as vedações em que havia maior saída de umidade. Além de ter baixa taxa de brotação, esses tratamentos proporcionaram brotos não alongados (Tabela 12). Após este período, já foi possível observar a evaporação do meio de cultura e necrose dos explantes, principalmente no tratamento cuja vedação foi realizada com papel de filtro.

Quanto à vitrificação, foi possível observar que a vedação com aberturas que possibilitem perda de umidade dos frascos, diminui a porcentagem de vitrificação que também só foi possível observar em explantes alongados. Dos explantes que brotaram poucos apresentavam-se alongados aos 28 dias: dos explantes inoculados no V2 50% estavam alongados, quanto aos tratamentos V3 33,3%, V4 16,7%, V5 100% e V6 nenhum deles alongaram-se, não sendo possível discernimento entre explantes vitrificados ou não no período de avaliação determinado. Dessa forma, a porcentagem de desvitrificação dos explantes foi a seguinte: 0% no tratamento V2; 19,04% no V3; 52,38% no V4; 23,80% no V5 e 0% no tratamento V6.

Vale salientar que em todos os tratamentos, exceto para explantes mantidos em cubetas vedadas com tampa de plástico, houve necrose dos explantes pela perda da umidade, sendo esta maior em explantes em cubetas vedadas com tampa de papel de filtro. É importante frisar que, após o término das avaliações houve o aparecimento de contaminação fúngica exógena nos tratamentos V3, V4 e V5, mostrando que da forma como as vedações foram utilizadas, não foram viáveis em conter a vitrificação. Essa contaminação pode ter acontecido pela manipulação das cubetas durante as avaliações, sendo que os movimentos realizados durante as mesmas podem ter facilitado a entrada de ar e contaminantes dentro das cubetas.

Tabela 12: Efeito da vedação das cubetas na porcentagem de brotação, número de gemas/explante, porcentagem de vitrificação, altura dos brotos e porcentagem de explantes necrosados, UNAERP, Ribeirão Preto-SP, 2009.

Dias	Tratamento	% Brotação	Nº de gemas/ explante	% vitrificação	Altura dos brotos	%explantes necrosados
21	V2	42,86a	1,14a	28,57a	*	*
	V3	19,04a	0,47b	0,00b	*	*
	V4	28,56a	0,52b	0,00b	*	*
	V5	28,57a	0,33b	4,76b	*	*
	V6	4,76a	0,04b	4,76b	*	*
	CV%	66,63	33,30	54,15	*	*
28	V2	57,14a	1,71a	28,57a	0,98a	0,00b
	V3	28,57a	0,61b	0,00b	0,75a	19,04b
	V4	28,56a	0,66b	0,00b	0,71a	23,81b
	V5	28,57a	0,42b	0,00b	0,77a	4,76b
	V6	9,52a	0,09b	0,00b	0,54a	52,38a
	CV%	67,39	35,42	50,35	14,77	47,65

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Scott Knott.

(*) não foi avaliado/ V2= Tampa de plástico;V3= Tampa com furo de 6,5mm;V4= furo de 9,0mm;V5= furo de 12,0mm e V6= Tampa de papel de filtro.

A forma anteriormente avaliada para controlar a vitrificação não foi eficiente devido a alta taxa de contaminação exógena que apareceu durante o experimento. Mas verificamos que ao diminuir a umidade interna do frasco é possível diminuir a intensidade da vitrificação. Para tanto, novas formas de vedações, como tampas de alumínio, filme PVC e algodão foram avaliadas para tentar suprir esta necessidade através dos métodos físicos de controle, e ter uma planta livre dos problemas causados pela vitrificação. Da mesma maneira, foi avaliada a influência dos frascos sobre os explantes vitrificados.

Passados 7 dias, na primeira avaliação, os explantes não haviam se desenvolvido o suficiente para que fosse possível a análise. Assim, esta avaliação não consta na Tabela 13. Aos 14 dias os explantes não estavam alongados o bastante para poder verificar a porcentagem e intensidade de vitrificação que são feitos visualmente. No entanto, a problemática encontrada nos experimentos anteriores de vedação quanto à presença de contaminantes, foi verificada onde havia tampa de alumínio e algodão. Este fator foi o

causador da baixa taxa de sobrevivência dos explantes mantidos nos tratamentos com estas vedações durante todo o experimento.

No decorrer da avaliação, aos 21 dias, as microplantas mantidas em cubetas vedadas por algodão não estavam vitrificadas, mas apresentaram os mais baixos valores para porcentagem de brotação e sobrevivência, juntamente nos quais havia tampa de alumínio (Tabela 13). A forma de vedar as cubetas pode ser crucial para o bom desenvolvimento dos explantes e muitos trabalhos mostram que esta diferença realmente existe e influencia diretamente nas respostas vegetativas. Estas variações são inclusive utilizadas a fim de obterem-se melhores condições de fotoautotrofismo que irão futuramente interferir no enraizamento e aclimação das plantas micropropagadas (BANDEIRA et al., 2007; RIBEIRO et al., 2007; SOUZA et al., 2007; SANTANA et al., 2008; DAMIANI e SCHUCH, 2009).

Na quarta avaliação realizada, aos 28 dias, o melhor tratamento verificado foi o com tampa de filme PVC, no qual as plântulas estavam menos vitrificadas e com alta taxa de sobrevivência (85,71%) e brotação (82,71%) e nenhuma contaminação exógena durante toda avaliação (Tabela 13). A tampa de algodão, além da contaminação, tornou oportuna a alta evaporação do meio de cultura. Já a utilização dos frascos, proporcionou alta vitrificação e não interferiu nas respostas vegetativas.

Com esses resultados podemos concluir que a tampa de filme PVC pode ser utilizada para micropropagação de explantes de *C. regium* por permitir desenvolvimento normal da planta com baixa vitrificação.

Tabela 13: Efeito da vedação das cubetas e do frasco na porcentagem de brotação, número de gemas/explante, porcentagem e intensidade de vitrificação, altura dos brotos porcentagem de sobrevivência e de contaminação exógena, UNAERP, Ribeirão Preto-SP, 2010.

Dias	Tampas/Frasco	%Brotação	Nº de gemas/explante	% vitrificação	Intensidade de vitrificação	%sobrevivência	%cont. exógena	Altura dos brotos
14	Plástico	76,19a	1,92a	**	**	100,00a	0,00b	*
	Alumínio	42,86b	1,81a	**	**	52,38b	52,38a	*
	Filme PVC	71,43a	3,06a	**	**	100,00a	0,00b	*
	Algodão	33,33b	3,22a	**	**	66,57b	38,10a	*
	Frasco	80,95a	3,02a	**	**	100,00a	0,00b	*
	CV%	23,44	36,33	**	**	12,45	57,66	*
21	Plástico	85,71a	4,57a	82,14a	3,13a	95,24a	0,00c	*
	Alumínio	47,62b	4,51a	75,56a	3,20a	52,38b	66,67a	*
	Filme PVC	76,19a	4,87a	81,11a	2,01a	95,24a	0,00c	*
	Algodão	42,86b	3,56a	0,00b	0,00b	61,90b	42,86b	*
	Frasco	100,00a	4,80a	76,19a	2,91a	100,00a	0,00c	*
	CV%	21,58	20,28	19,74	29,20	12,05	44,54	*
28	Plástico	90,48a	5,24a	88,57a	4,06a	95,24a	0,00c	0,97a
	Alumínio	47,62b	5,33a	93,33a	3,67a	52,38b	66,67a	1,21a
	Filme PVC	82,71a	6,56a	48,09b	0,88b	85,71a	0,00c	1,14a
	Algodão	68,33b	3,72a	0,00c	0,00b	47,62b	42,86b	0,93a
	Frasco	95,24a	5,72a	95,24a	3,79a	95,24a	4,76c	1,36a
	CV%	20,64	28,03	25,63	35,80	15,50	45,63	18,42

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Scott Knott. (*) não foi avaliado/ (**) não foi possível avaliar

3.3 Multiplicação *in vitro*

A adição dos reguladores vegetais BAP, cinetina e zeatina no meio de cultura, não apresentou efeito sobre a porcentagem de brotação nem sobre o número de gemas obtido por explante, apresentando aos 60 dias 76,39%, 72,22% e 75% de brotação respectivamente (Tabela 14). Para o número de gemas obtidas por explante, o meio sem adição de reguladores apresentou resultados mais satisfatórios (2,96cm aos 60 dias). Porém, isoladamente, os reguladores apresentaram diferença significativa nas concentrações utilizadas aos 30 e 60 dias, conforme é mostrado na Figura 8 (porcentagem de brotação) e Figura 9 (número de gemas por explante). O número de brotação obtido por explante não foi aumentado com a adição de citocininas, apresentando o mínimo de uma brotação por explante em todos os tratamentos (Tabela 14).

Ao utilizar citocininas como reguladores vegetais no processo de multiplicação de explantes *in vitro*, espera-se que haja um aumento no número de brotação. No entanto, este efeito nem sempre é conseguido, pois vários fatores podem interferir, tais como espécie em questão, o tipo de explante, dentre outros (ROGALSKI et al., 2003; DUTRA et al., 2004; MENDONÇA et al., 2004; BERTONI et al., 2006; RUBIN et al., 2007; RODRIGUES et al., 2009; VICENTE et al., 2009).

As citocininas utilizadas além de não terem favorecido o processos de multiplicação dos explantes também interferiram negativamente na formação de calos, intensificando sua incidência, principalmente o BAP (Figura 7). Embora as citocininas não sejam classicamente substâncias promotoras de proliferação celular, resultados semelhantes tem sido obtidos por outros autores a exemplo de José et al. (2006), Beltrão et al. (2008), Paiva e Aloufa (2009) e Sexto et al. (2009) que ao introduzirem zeatina e BAP no meio de cultivo também obtiveram formação de calos nos explantes.

O regulador de crescimento zeatina juntamente com o meio sem adição de reguladores, foram os que proporcionaram maior altura dos explantes (1,78 e 1,74 cm respectivamente). Esses resultados corroboram com os obtidos por Santos et al. (2005), Carvalho et al. (2005), Villa et al. (2007), Nicioli et al. (2008) e Stein et al. (2009) no qual verificaram um aumento no comprimento das brotações com a adição de citocininas no meio de cultura. A menor altura foi obtida em explantes mantidos em meio MS com adição de

cinetina e BAP (1,35 e 1,38 cm respectivamente) (Tabela 14). Segundo Rubin et al. (2007) e Zigiotto (2007), déficit no alongamento de brotos com a adição de citocininas podem ocorrer com frequência em explantes mantidos *in vitro*.

Um outro aspecto importante a ser considerado com relação as citocininas é que elas podem atuar como um estímulo químico a vitrificação (MORAES et al., 2007). Embora a vitrificação tenha sido constatada nos explantes de *C. regium*, é possível descartar a possibilidade disto ter ocorrido pela influencia desta classe de reguladores vegetais, pois a vitrificação ocorreu em todos os explantes alongados com ou sem adição de citocinina (Tabela 14). Mas, vale ressaltar que em meio de cultivo com zeatina, os explantes apresentavam aspectos de vitrificação menos intenso. Resultados divergentes existem e foram constatados por Fráguas et al. (2004) e Bertoni et al. (2006) na qual a citocinina cinetina, BA e zeatina promoveram maior vitrificação nas plantas. Em alguns tratamentos como meio de cultivo com adição de cinetina nas concentrações 0,5 e 1,0 μ M e com adição de zeatina 0,5 μ M, foi constatado coloração vermelha nas folhas dos explantes, indicando a presença de antocianinas. Nessas plantas, foi verificada a ausência da vitrificação, sugerindo, mais uma vez, a possível interferência das antocianinas neste efeito indesejado.



Figura 7: Calos formados em explantes de *C. regium* com adição de BAP no meio de cultura.

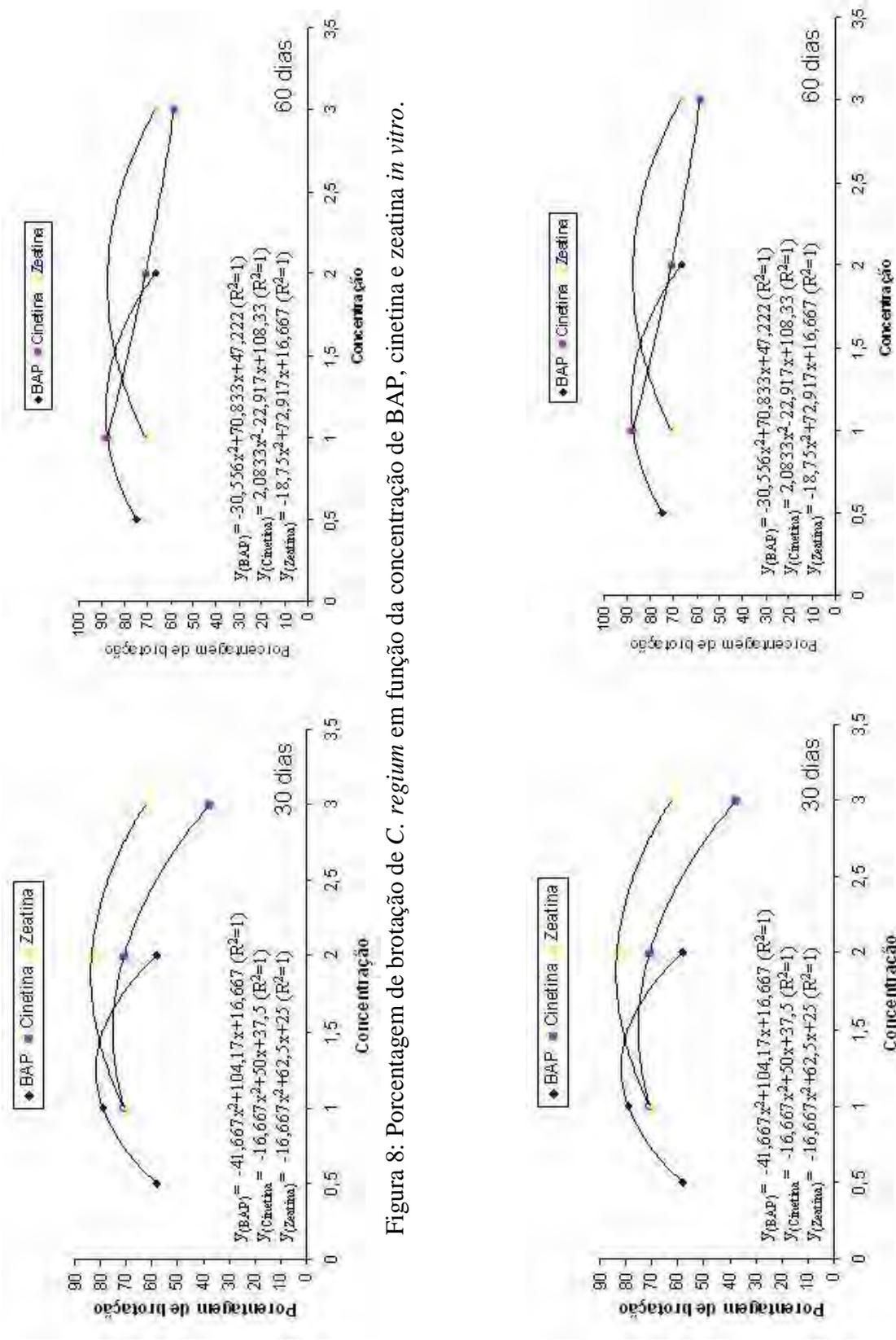


Figura 8: Porcentagem de brotação de *C. regium* em função da concentração de BAP, cinetina e zeatina *in vitro*.

Figura 9: Número de gemas obtidas por broto de *C. regium* em função da concentração de BAP, cinetina e zeatina *in vitro*.

Tabela 14: Influência dos reguladores de crescimento BAP, cinetina e zeatina na porcentagem de brotação, número de gemas obtidas por broto, número brotação por explante, porcentagem e incidência de calos, porcentagem de vitrificação e altura dos brotos, UNAERP, Ribeirão Preto – SP, 2009.

Tratamen- to	%brotação		N° gemas/ broto		N° brotação/ Explante		%calos		Incidência de calos		%vitrificação		Altura broto	
	30	60	30	60	30	60	30	60	30	60	30	60	30	60
MS	83,33a	95,83a	1,99a	2,96a	1,00a	1,17a	100,00a	100,00a	2,92b	3,33b	37,50a	29,17a	1,30a	1,74a
BAP	65,27a	76,39b	1,57a	1,94a	1,03a	1,24a	98,61a	98,61a	4,51a	4,35a	16,67a	34,72a	1,09b	1,38b
Cinetina	59,72a	72,22b	1,36a	2,18a	1,01a	1,09a	97,22a	100,00a	3,36b	3,47b	33,33a	22,22a	1,03b	1,35b
Zeatina	72,22a	75,00b	1,80a	2,53a	1,08a	1,21a	91,94b	91,67a	2,32b	2,72b	38,89a	45,83a	1,34a	1,78a

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si estatisticamente pelo teste Scott-Knott 5%.

* Avaliação aos 30 e 60 dias.

3.4 Posição da gema

A posição da gema pode interferir diretamente sobre as respostas vegetativas no processo de micropropagação. Teoricamente, qualquer tecido pode ser utilizado devido à condição de totipotência dos vegetais. No entanto, as gemas apicais, geralmente, apresentam maior capacidade de crescimento do que as gemas axilares/laterais, pois estas últimas estão sob o efeito da dominância apical (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). No experimento com *C. regium* a gema apical apresentou os melhores resultados, incluindo menor porcentagem e incidência de calos. Também, apesar de não haver diferença significativa, foi o tipo de explante com maior porcentagem de sobrevivência. Inclusive, conforme a gema se afasta da apical, ou se aproxima da base, menores são seus valores de multiplicação, maior a incidência de calos e menor a porcentagem de sobrevivência. (Tabela 15).

Ao final dos 30 dias de avaliação foi observado que a taxa de sobrevivência das gemas laterais diminuíram. Deste modo, foram feitas novas avaliações referentes a este parâmetro após 60 dias do início do experimento. Foi verificado que realmente a taxa de sobrevivência diminui conforme passado o tempo (Tabela 15), tendo ao final de 60 dias 52,38% de sobrevivência para gema mais próxima da base (lateral 3). Resultados divergentes foram obtidos por Rocha et al. (2005), Faria et al. (2007) e Malosso et al. (2008) ao verificarem melhor desenvolvimento vegetativo de plantas a partir das gemas basais, segunda gema axilar e da gemas laterais respectivamente.

Tabela 15: Efeito da posição das gemas apical, lateral 1, 2 e 3 na porcentagem de brotação, número de gemas obtidos por explante, porcentagem e incidência de calos, altura dos brotos e porcentagem de sobrevivência aos 30 e 60 dias, UNAERP, Ribeirão Preto – SP, 2009.

Posição da gema	%brotação	Nºgemas/ explante	%calos	Incidência de calos	Altura dos brotos	%sobrevivência	
						30 dias	60 dias
Apical	88,89a	4,12a	57,14b	1,76c	2,25a	90,47a	85,71a
Lateral1	58,41a	1,72b	83,01a	3,61a	0,85b	85,71a	71,43a
Lateral2	56,67a	1,82b	87,78a	2,79b	0,85b	76,19a	66,67a
Lateral3	53,33a	1,13b	100,00a	3,80a	0,72b	71,43a	52,38a
CV%	28,79	29,23	10,13	17,55	32,86	11,39	19,81

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si estatisticamente pelo teste Scott-Knott 5%.

3.5 Enraizamento *in vitro*

Após passar pela fase de multiplicação *in vitro*, uma etapa muito importante para que se estabeleça um protocolo de micropropagação é a fase de enraizamento. O enraizamento *in vitro* pode ser conseguido através da adição de auxinas ou outros agentes rizogênicos ao meio de cultivo (SOUZA et al., 2006). Para esta fase, geralmente são empregadas as auxinas IBA (ácido indol butírico), ANA (ácido naftaleno-acético) e AIA (ácido indol acético).

No experimento com *C. regium* o regulador de crescimento utilizado foi o IBA e os explantes, com uma gema, submergidos nos meios com diferentes concentrações deste regulador não apresentaram enraizamento aos 30 dias de avaliação. Por este motivo, não foi aplicado teste de regressão para este experimento (Tabela 16). Neste período a taxa de brotação foi favorecida na concentração de 2 μ M de IBA (Figura 10). Este efeito sugere que a espécie *C. regium* pode vir a ser utilizada como modelo de estudos de funcionamento fisiológico por fugir do padrão até então conhecido de espécies vegetais européias, pois ao adicionar auxina, aumenta-se o número de brotação/explante e ao utilizar citocininas (com intuito de brotação) não há aumento no valor do mesmo, como mostrado nos experimentos de multiplicação mencionados anteriormente.

Quando a concentração de auxina no meio de cultura é excessiva, pode ocorrer a formação de calos na base do explante. No experimento com *C. regium* houve formação de calos em todos os tratamentos, inclusive no meio sem adição de IBA. Isto significa que nas concentrações avaliadas, o IBA não causa efeito de calogênese nos explantes de *C. regium*. Entretanto, ao aumentar a concentração de IBA, aumenta-se a porcentagem de vitrificação dos explantes.

No decorrer do experimento, dos 30 aos 50 dias, percebeu-se que as plantas apresentavam necrose, característica esta aparentemente comum em explantes de *C. regium* quando apenas transferidos sem cortes das folhas, como foi feito para este experimento. Para tanto, a avaliação dos 60 dias foi antecipada para 50 dias e o parâmetro avaliado foi apenas a porcentagem de sobrevivência (Tabela 16), que foi superior para explantes mantidos no tratamento sem adição de IBA, seguido pelo tratamento com 2 μ M de IBA. Após a avaliação, os explantes foram transferidos para meio MS sem adição de

reguladores e após 21 dias foram reavaliadas quanto à porcentagem de regeneração do explante, pois, também parece ser um padrão para a espécie a parte aérea apresentar-se seca e em seguida surgirem novas brotações.

Explantos transferidos para meio MS sem adição dos reguladores não se regeneraram após 21 dias e os que sobreviveram, na grande maioria, estavam com aspecto de planta velha com coloração amarronzada. Neste caso, podemos inferir que a auxina nas condições avaliadas, pode ter sido tóxica para os explantes de *C. regium*.



Figura 10: Brotações múltiplas estimulado pela adição de $2\mu\text{M}$ de IBA no meio de cultura.

Tabela 16: Efeito da adição de IBA no desenvolvimento vegetativo de explantes de *C. regium in vitro*, UNAERP, Ribeirão Preto – SP, 2009.

IBA (μ M)	N° gemas/ explante	N° brotação/ Explante	Altura dos brotos	% calos	Incidência de calos	% vitricificação	%sobrevivência (30 dias)	%sobrevivência (50 dias)
MS	6,76a	2,07a	2,96a	63,24a	1,47a	42,86b	100,00a	81,90a
1,0	4,99b	1,24b	1,78b	77,78a	1,69a	42,22b	85,95b	47,62a
2,0	5,24b	1,62a	1,47b	71,43a	1,19a	85,71a	100,00a	55,56a
4,0	4,70b	1,20b	1,42b	84,92a	2,44a	74,60a	95,24a	46,62a
6,0	3,70b	1,21b	1,34b	85,71a	2,35a	89,68a	85,71b	47,60a
CV%	16,04	20,64	22,62	27,98	41,27	22,16	8,93	37,31

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si estatisticamente pelo teste Scott-Knott 5%.

3.6 Aclimação e Enraizamento *ex vitro*

A aclimação apesar de não ser uma etapa *in vitro*, é muito importante, pois sem sucesso nesta fase há a inviabilização da micropropagação.

Convencionalmente, a aclimação *ex vitro* das microplantas é realizada de forma que progressivamente, promove-se o incremento na irradiância mantendo-se, inicialmente, alta umidade relativa do ambiente logo após o transplante, com gradativa redução da mesma, até que a fase de endurecimento e autotrofismo se complete (CAMPOSTRINI e OTONI, 1996).

Plantas de *C. regium* aclimatadas tiveram sobrevivência de $45,85\% \pm 18,93$, mostrando que este método precisa ser melhorado afim de obterem-se maior número de plantas vivas. Vários são os estudos relacionados a diferentes métodos que podem influenciar e possibilitar maior número de plantas vivas na fase de aclimação. Dentre eles podem ser citados as diferentes concentrações de solução nutritiva na irrigação das plantas aclimatadas, os diferentes substratos, a luminosidade, o sombreamento, a utilização de fungos micorrízicos, o genótipo, entre outros (ANDRADE et al., 2000; TERCEIRO NETO et al., 2004; MALOSSO et al., 2008; HAHN et al., 2009; RUTA et al., 2009; CASTIGLIONE et al., 2009).

O enraizamento pode ser realizado tanto *in vitro* como *ex vitro*, porém este último têm se mostrado eficiente para várias espécies.

Uma das vantagens do enraizamento *ex vitro*, talvez a mais considerável, é o menor custo financeiro que esta técnica proporciona, pois dispensa os gastos com meio de cultura e reguladores, além de diminuir uma etapa da micropropagação, já que o enraizamento *ex vitro* faz parte da última etapa do processo que é a aclimação. Esta diminuição dos custos pode chegar até a 75% dos gastos totais e reduz o tempo de cultivo e de comercialização das mudas (GUERRA e NODARI, 2006).

A porcentagem de enraizamento *ex vitro* de *C. regium* foi de $77,50\% \pm 15,00$, podendo ser considerado eficiente e substituído pelo enraizamento *in vitro*, já que este se mostrou dificultado nas condições avaliadas (Figura 11). Além do mais, o enraizamento ocorreu sem utilização de indutores rizogênicos. No entanto, este valor pode ser aumentado a partir do momento que se aumenta a sobrevivência das plantas micropropagadas.

O tamanho médio final das raízes de *C. regium* foi de $1,57 \pm 0,63$. O enraizamento *ex vitro* é indicado para várias espécies, seja por estas apresentarem dificuldade de enraizamento *in vitro*, pelas raízes *in vitro* não se adaptarem a aclimação ou somente pela redução dos custos (PEDROTTI e VOLTOLINI, 2000; RADMANN et al., 2001; MACIEL et al., 2002).

Desta forma, pode-se indicar o enraizamento *ex vitro* satisfatório para espécie *C. regium*, pois acontece fácil e rapidamente sem a necessidade de reguladores, além de suprir a falta do enraizamento da espécie *in vitro* e optar por suspender esta fase.



Figura 11: Raízes de *C. regium* formadas *ex vitro*

3.6 Conservação de germoplasma *in vitro*

Os Bancos de Germoplasma *in vitro* vêm sendo estabelecidos por várias instituições de pesquisa e mantidos para conservar várias espécies medicinais incluindo plantas do Cerrado. A vantagem desta conservação é o crescimento mínimo, sem alteração da estabilidade genética e fácil acesso ao material genético caracterizado, estando disponível para domesticação e desenvolvimento de novas variedades (MORAES et al., 2007).

Anteriormente ao estabelecimento do Banco de Germoplasma *in vitro* deve-se desenvolver o protocolo de micropropagação, passando pelas fases de escolha do explante, desinfecção, estabelecimento, multiplicação, enraizamento e aclimação. Após o estabelecimento do banco, faz-se necessário multiplicar novamente as espécies conservadas

para confirmar a viabilidade do processo desenvolvido e também se as características da planta matriz foram mantidas no clone (MORAES et al., 2007).

A manutenção do crescimento mínimo das culturas pode ser feita através da redução de temperatura e/ou intensidade luminosa, da diluição dos elementos nutritivos no meio de cultura e também pela adição de reguladores osmóticos e hormonais capazes de inibir o crescimento do material em cultivo (WHITTERS, 1991; ENGELMANN, 1991; CARVALHO e VIDAL, 2003). Em nossos experimentos optamos por avaliar a redução do potencial osmótico através de fontes de carbono combinados com temperaturas de 25°C e 15°C.

Agentes osmóticos como manitol e sorbitol reduzem a captação mineral pelas células através de diferença de potencial osmótico, retardando desta forma o crescimento da planta (FORTES e PEREIRA, 2001; LÉDO et al., 2007). O pantotenato de cálcio (vitamina B5) é uma substância que auxilia o metabolismo em geral e desempenha função na regulação dos processos de suprimento de energia (HOFFMANN et al., 2000).

Explantos de *C. regium* mantidos em todos os tratamentos apresentaram redução da taxa de sobrevivência, sendo a menor porcentagem para explantes mantidos no tratamento Cg4 com MS e sorbitol em combinação com pantotenato de cálcio. A baixa sobrevivência neste meio esteve relacionada a contaminação dos explantes, pois, estas substâncias estimularam o aparecimento de contaminação endógena bacteriana. Desta forma, pode-se optar como melhor tratamento, após 60 dias, o Cg5 (MS/2 acrescido de sorbitol e pantotenato de cálcio). Apesar de este tratamento ter proporcionado um alto valor para número de gemas (8,72 – Tabela 17), a altura do broto foi mediana (1,43) e a porcentagem de sobrevivência, que é um fator muito importante, foi a mais alta. Resultados semelhantes foram obtidos por Golmirzaie e Toledo (1998), Faria et al. (2006) e Shawky e Aly (2007) no qual ao utilizar o sorbitol adicionalmente ao meio de cultivo obtiveram o crescimento mínimo *in vitro*.

Neste período a única diferença entre o melhor e o pior tratamento (Cg5 e Cg4 respectivamente) foi a concentração do meio de cultura. Desta forma, podemos inferir que a alta concentração dos nutrientes foi o que favoreceu o aparecimento dos endofíticos que ocasionaram a morte dos explantes.

As plantas ao final dos 60 dias da avaliação apresentaram aspecto de senescência, talvez pela alta temperatura em que se encontravam (25°C), as fontes de carbono foram rapidamente absorvidas e em consequência ocorreu a senescência das microplantas.

No 3º mês de avaliação, foi verificada uma queda na taxa de sobrevivência das mesmas, tendo ao final desse período morte de todo material vegetal, se fazendo possível a avaliação, somente até aos 60 dias.

Tabela 17: Efeito do manitol, sorbitol e pantotenato de cálcio sobre crescimento mínimo em explantes de *C. regium* mantidos *in vitro* em 25°C, UNAERP, Ribeirão Preto – SP, 2009.

Tratamento/dias	%sobrevivência		%brotação		Nº gemas/ Explante		Altura broto	
	30	60	30	60	30	60	30	60
Cg0	90,47a	85,71a	90,47a	93,33a	5,36a	9,83a	1,94a	2,69a
Cg1	71,43b	66,66a	84,13a	100,00a	4,11b	8,72a	2,01a	2,75a
Cg2	90,47a	71,43a	100,00a	100,00a	3,93b	7,16a	1,41b	1,83a
Cg3	85,71a	76,19a	85,71a	83,33a	2,32c	4,35b	0,73c	0,96b
Cg4	57,14b	23,81b	78,57a	100,00a	1,93c	3,89b	0,73c	0,77b
Cg5	90,48a	80,95a	85,71a	100,00a	3,65b	8,72a	1,08c	1,43b
Cg6	85,71a	52,38a	81,90a	100,00a	2,66c	6,38b	0,87c	1,14b
Cg7	66,67b	57,14a	63,33a	86,67a	1,05c	3,02b	0,58c	0,68b
Cg8	60,32b	33,33b	83,33a	100,00a	1,67c	5,33b	0,57c	0,80b
Cg9	80,95a	57,14a	90,47a	91,67a	1,89c	5,31b	0,69c	0,99b
CV%	19,92	27,95	19,59	13,69	25,04	28,11	17,80	39,48

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si estatisticamente pelo teste Scott-Knott 5%.

Cg0 = MS + 2% sacarose; Cg1 = MS/2 + 2% sacarose; Cg2 = MS + 2% sacarose + 4% sorbitol; Cg3 = MS/2 + 2% sacarose + 4% sorbitol; Cg4 = MS + 2% sacarose + 4% sorbitol + 2mg.L⁻¹ pantotenato de cálcio; Cg5 = MS/2 + 2% sacarose + 4% sorbitol + 2mg.L⁻¹ pantotenato de cálcio; Cg6 = MS + 2% sacarose + 4% manitol; Cg7 = MS/2 + 2% sacarose + 4% manitol; Cg8 = MS + 2% sacarose + 4% manitol + 2mg.L⁻¹ pantotenato de cálcio; Cg9 = MS/2 + 2% sacarose + 4% manitol + 2mg.L⁻¹ pantotenato de cálcio.

É sugerido que para espécies de clima tropical, a temperatura deve ser reduzida entre 15 e 25°C (Whiters, 1991). Logo, avaliamos conjuntamente o efeito dos agentes de estresse osmótico com baixa temperatura e os resultados mostraram que a conservação de *C. regium* em temperatura de 15°C, aos 30 dias, foi melhor para os explantes mantidos em tratamentos que continham manitol na sua composição com uma tendência a ser superior quando da presença de pantotenato de cálcio, ao contrário de como aconteceu em 25°C. No

entanto, não houve nenhum desenvolvimento vegetativo neste período em nenhum dos tratamentos (Tabela 18).

Ao contrário do que aconteceu em 25°C, o sorbitol foi o que proporcionou menor efeito na sobrevivência dos explantes, mostrando que em baixas temperaturas este agente não apresenta efeito de proteção para esta espécie.

No segundo mês de avaliação, as taxas de sobrevivência caíram ainda mais, e os tratamentos que proporcionaram maiores valores para este parâmetro foi os que tinham MS/2 e manitol, MS e MS/2 com manitol e pantotenato de cálcio. No entanto, a sobrevivência foi inferior a 50%, já não sendo mais considerável viável a conservação nestas formas propostas. Também, durante este período, nenhum desenvolvimento vegetativo foi observado nos explantes. Logo, ao perceber que mesmo em baixa temperatura até 48% dos explantes sobrevivem, estudos variando as concentrações destes agentes devem ser avaliados a fim de aperfeiçoar este protocolo e para obter maior sobrevivência com plantas saudáveis e sob regime de crescimento mínimo.

Estes resultados revelam a baixa tolerância da espécie *Cochlospermum regium* ao frio. Já foi relatado por Camillo et al. (2009) que pode ser conseguido crescimento mínimo *in vitro* (sem utilização de agentes osmóticos) mantendo as plantas em 20°C. Já em baixa temperatura (10°C) não há tolerância dos explantes. Os resultados obtidos em nossos experimentos mostraram que apesar se a taxa de sobrevivência ter sido baixa, em 15°C, houve um efeito dos agentes osmóticos e o pantotenato de cálcio que garantiram a sobrevivência destes explantes por este período, podendo estes, servirem de aliado na manutenção de um banco de germoplasma *in vitro* de *C. regium*.

Após um período de 90 dias (3 meses), nenhum desenvolvimento foi observado e em todos os tratamentos houve queda da porcentagem de sobrevivência com exceção do tratamento com MS acrescido de manitol e pantotenato de cálcio, no qual permaneceu intacta. Isto confirma que mesmo sendo baixa a sobrevivência, mais estudos envolvendo estes agentes devem ser realizados para obtenção de um banco de germoplasma *in vitro* efetivo.

Tabela 18: Efeito do manitol, sorbitol e pantotenato de cálcio sobre crescimento mínimo em explantes de *C. regium* mantidos *in vitro* em 15°C, UNAERP, Ribeirão Preto – SP, 2009.

Tratamento/dias	%sobrevivência		
	30	60	90
MS+2% sacarose	9,52b	9,52b	4,76c
MS/2+2% sacarose	47,62a	19,04b	4,76c
MS+2% sacarose+4% sorbitol	9,52b	9,52b	4,76c
MS/2+2% sacarose + 4% sorbitol	19,04b	0,00b	0,00c
MS+2% sacarose+4% sorbitol+2mg.L ⁻¹ pantotenato de cálcio	33,33b	0,00b	0,00c
MS/2+2% sacarose+4% sorbitol+2mg.L ⁻¹ pantotenato de cálcio	19,04b	0,00b	0,00c
MS+2% sacarose + 4% manitol	42,86a	19,04b	19,04c
MS/2+2% sacarose + 4% manitol	57,14a	42,86a	33,33b
MS+2% sacarose + 4% manitol + 2mg.L ⁻¹ pantotenato de cálcio	61,90a	47,62a	47,62a
MS/2+2% sacarose + 4% manitol + 2mg.L ⁻¹ pantotenato de cálcio	61,90a	42,86a	28,57b
CV%	40,77	65,68	54,78

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si estatisticamente pelo teste Scott-Knott 5%.

4. CONCLUSÕES

1. A gema cotiledonar é o explante mais indicado para iniciar a micropropagação por apresentar superioridade quanto ao número de brotos e a melhor gema para o processo de multiplicação *in vitro* é a apical;
2. A redução na concentração do meio MS não favorece a redução da presença de calos nos explantes;
3. O carvão ativo nas condições testadas é eficiente no controle da produção de calos;
4. O teor de sacarose influencia no processo de desvitrificação de explantes de *C. regium*;
5. O agente gelificante utilizado nas concentrações avaliadas não interferiu nesse processo;
6. Tampa de filme PVC em cubetas é capaz de promover desvitrificação em explantes de *C. regium*;

7. Explantes de *C. regium* apresentam capacidade de se manter e multiplicar *in vitro* sem adição de citocininas;
8. O regulador IBA não afeta o enraizamento de explantes de *C. regium*;
9. O sorbitol juntamente com pantotenato de cálcio promoveram a sobrevivência com crescimento mínimo em plântulas de *C. regium in vitro* em 25°C;
10. Em 15°C, o manitol juntamente com pantotenato de cálcio promoveram a sobrevivência com crescimento mínimo em plântulas de *C. regium in vitro*;
11. Mais testes referentes a aclimação de *C. regium* devem ser feitas a fim de aperfeiçoamento do método;
12. O enraizamento de plantas de *C. regium ex vitro* é eficiente.

Capítulo III. DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS *EX VITRO*

1. INTRODUÇÃO

A espécie *Cochlospermum regium* vem sendo utilizada pela população para fins medicinais contra infecções de um modo geral. É uma espécie que demanda estudos científicos, pois poucas são as informações existentes sobre a mesma. Assim, acontece para os estudos químicos, biológicos, genéticos e agronômicos.

Os estudos agronômicos quanto o seu desenvolvimento vegetativo e também as suas respostas fisiológicas básicas a diferentes estímulos externos são importantes para viabilizar a produção da espécie em campo de cultivo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Determinar melhor substrato para desenvolvimento de plântulas de *Cochlospermum regium*.

2.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar a influência dos substratos areia e solo+ esterco nas respostas vegetativas de plantas de *C. regium*;
2. Determinar qual substrato proporciona maior biomassa de parte aérea e raiz;

3. MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de *C. regium* (n= 550) imersas em H₂SO₄ por 120 min. foram posteriormente lavadas com água destilada e autoclavada e colocadas em caixas do tipo gerbox contendo vermiculita, e mantidas em fitotron Marconi MA1403/UR com temperatura controlada de 27°C e umidade relativa de aproximadamente 80%. Após germinação, plântulas com presença dos cotilédones foram classificadas de acordo com a relação parte aérea/ raiz nas seguintes categorias: Tipo 1: 4/1 (parte aérea/raiz), Tipo 2: ½ (parte aérea/raiz), Tipo 3: ¼ (parte aérea/raiz). Todas as plântulas foram transferidas para vasos de 3L de capacidade contendo areia (A) ou solo+esterco (SE) e depositadas em casa de vegetação. As plantas permaneceram em vasos por 8 meses e foram avaliadas quanto a altura da parte aérea, quantidade de folhas, comprimento e diâmetro da raiz, número de raiz fasciculada, porcentagem de plantas com raiz maior que parte aérea e peso fresco e seco da parte aérea e raiz. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, composto de 4 repetições com 3 replicatas, totalizando 12 plantas por tratamento. Os resultados obtidos foram submetidos ao teste Tukey 5% com o auxílio do programa SISVAR (FERREIRA, 2005). As sementes utilizadas neste experimento permaneceram armazenadas em câmara fria por 8 meses.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação do desenvolvimento das plântulas germinadas em fitotron permitiu a classificação em 3 categorias (Figura 12): Tipo 1 com 4:1 de parte aérea/raiz (representando 19,16% das plântulas formadas); Tipo 2 com 1:2 parte aérea/raiz (41,59%) e Tipo 3 com 1:4 parte aérea/raiz (39,25%). Quanto ao efeito do substrato no desenvolvimento das plantas verificou-se que o solo+esterco proporcionou maior crescimento em altura da parte aérea quando comparada a areia (29,56 e 16,83cm respectivamente) (Tabela 19). Resultados divergentes foram obtidos por Viu e colaboradores (2007), em trabalho com a mesma espécie.

Estes verificaram que o substrato comercial vermiculita foi o mais eficiente em promover maior tamanho de plântulas.

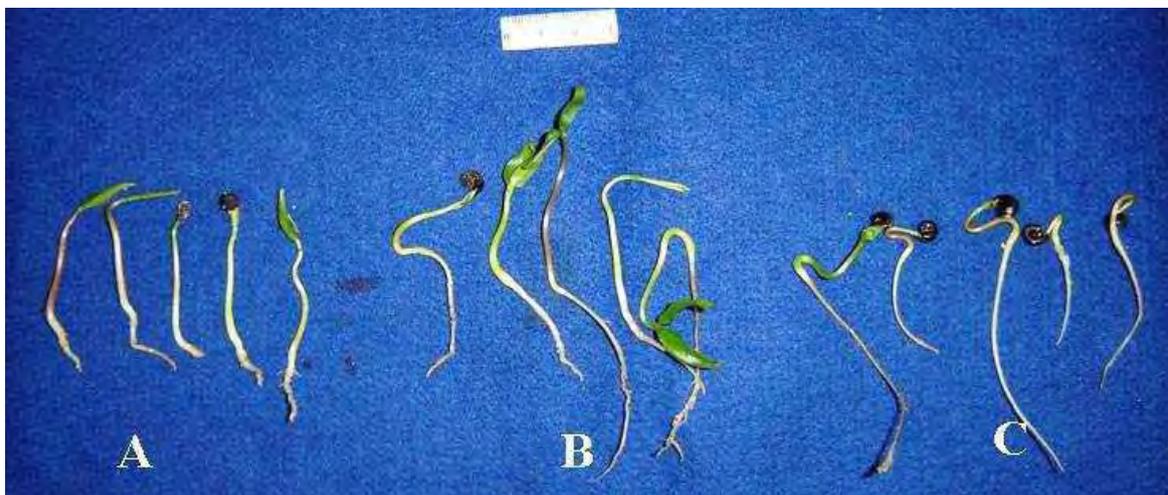


Figura 12: Tipo de plântulas referente a relação tamanho parte aérea/raiz.
A=plântulas Tipo 1/; B=Plântulas Tipo 2/; C=Plântulas Tipo 3

As plantas mantidas em areia apresentaram a raiz maior do que a parte aérea. No entanto, ao avaliar o peso fresco e seco das raízes das plantas mantidas em ambos os substratos constatou-se que não houve diferença estatística, quanto ao peso da biomassa (1,62 e 2,09g respectivamente) (Tabela 19).

Dessa forma, conclui-se que as raízes das plantas mantidas em areia apresentam a raiz maior que a parte aérea, como uma estratégia de armazenar água em solos arenosos e que as raízes que cresceram em solo+esterco investiram mais no desenvolvimento da parte aérea. Numa demonstração clara de alta plasticidade e adaptação da planta, o que explica a intensa dispersão da espécie em quase todas as fitofisionomias do bioma Cerrado (Figura 13). Outra característica que mostra a plasticidade desta espécie foi estudada por Poppendieck (1981) com relação à floração. Segundo o autor quando o ramo do ano foi destruído, pelos incêndios, por exemplo, que são bastante frequentes nos Cerrados, as flores nascem ao nível do solo a partir do xilopódio, de onde também saem os ramos. Esta é dada como característica única da espécie *C. regium* dentre as espécies do gênero.

Algumas características relevantes foram observadas durante o experimento de desenvolvimento das plantas na casa de vegetação. A partir do outono as

folhas das plantas começaram entrar em senescência e caducar, sendo mais freqüente nas plantas mantidas em vasos com solo+esterco e no início do inverno houve formação dos botões florais para plantas mantidas em ambos os tratamentos. Estes dados corroboram com os estudos realizados por Poppendieck (1981), no qual mostrou que a floração da espécie *C. regium* acontece na mesma época em que ela está desfolhada.

Característica comum observada durante este experimento foi, além da queda das folhas, a desidratação dos ramos que se apresentaram aparentemente mortos, mas que de maneira inesperada sem aparente modificação do ambiente, rebrotaram (Figura 14). Este efeito foi observado mais pronunciadamente em plantas mantidas na areia do que no solo+esterco (50 e 20% respectivamente). Esta é outra característica que pode ser atribuída à plasticidade da planta, pois, a areia retém menos água que o solo+esterco. Assim, quando a planta está ameaçada, como pela falta de água, ela se protege “secando” as parte aérea e acumulando água nas raízes esperando condições mais favoráveis para voltar a brotar.

O substrato areia acelerou o processo de lignificação dos caules das plantas, e a princípio suas folhas se mostraram mais verdes e mais vistosas. Porém no final do experimento foi verificado que plantas mantidas em solo+esterco apresentavam melhor aspecto, com folhas mais verdes e maior altura, enquanto que as mantidas em areia mantiveram inalterado seu crescimento.

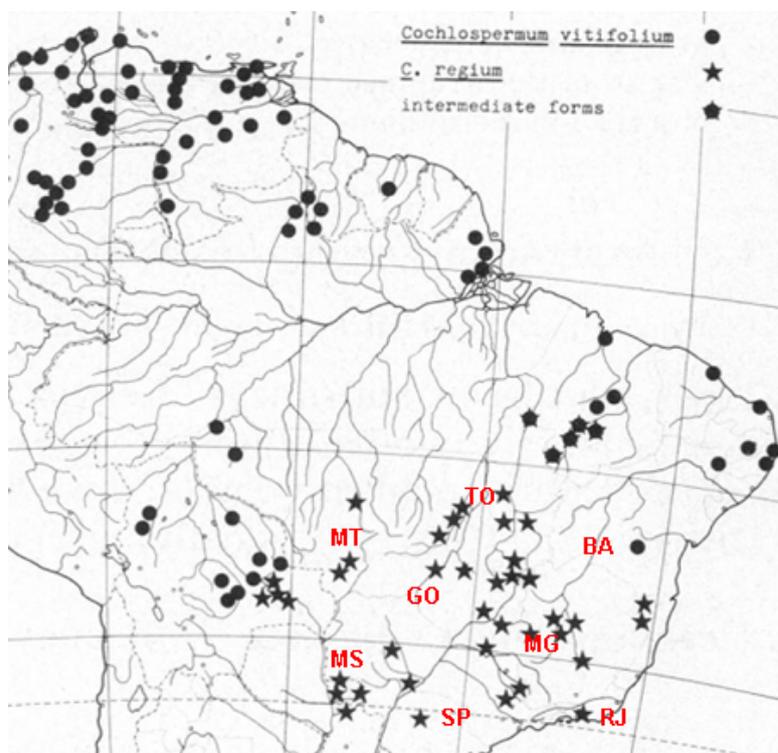


Figura 13: Distribuição geográfica da espécie *C. regium*.

Fonte: Poppendieck, 1981

SP – São Paulo/ RJ – Rio de Janeiro/ MG – Minas Gerais/ MS – Mato Grosso do Sul/
 MT – Mato Grosso/ GO – Goiás/ TO – Tocantins/ BA – Bahia.



Figura 14: Rebrotado de *C. regium* sob parte aérea aparentemente morta.

Tabela 19: Medidas de altura da parte aérea (APA), quantidade de folhas (QF), comprimento de raiz (CR) e diâmetro da raiz (ØR), número de raiz fasciculada (NRF), peso fresco e seco de parte aérea (PFPA e PSPA) e raiz (PFR e PSR), porcentagem de biomassa da parte aérea (%BPA) e raiz (%BR) e porcentagem de plantas com raiz maior que parte aérea (%RMPA), UNAERP, Ribeirão Preto-SP, 2009.

Trata- Mento	APA (cm)	QF	CR (cm)	ØR (cm)	NRF	%RMPA	PFPA	PSPA	PFR	PSR	%BPA	%BR
A	16,83b	9,50a	21,00a	0,93a	10,50a	91,67a	3,94b	0,71b	6,64a	1,62a	20,73a	17,49a
S+E	29,56a	11,79a	22,41a	1,31a	6,12a	29,17b	9,54a	1,87a	10,37a	2,09a	19,16a	17,97a
CV%	17,87	16,81	16,92	19,74	32,31	44,69	41,39	32,38	58,74	57,11	12,82	12,31

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Tukey. (n=12)/ * 8 meses após montagem do experimento/
A= areia; S+E= solo+estercos

5. CONCLUSÃO

1. O substrato solo+esterco proporciona maior peso seco de biomassa de parte aérea;
2. De um modo geral o substrato solo+esterco estimula maior tamanho de raiz em relação a parte aérea.

Capítulo IV. PRODUÇÃO EXTRATOS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE *Cochlospermum regium*

1. INTRODUÇÃO

O estudo da atividade biológica realizada *in vitro* é uma ferramenta necessária ao estudo de plantas com propriedades bioativas, sendo o primeiro teste realizado antes das avaliações *in vivo*. É uma avaliação adicional aos estudos farmacológicos e podem direcionar os estudos das espécies conforme o resultado que foi obtido. A atividade antimicrobiana dos produtos naturais é cada vez mais valorizada, pois devido a inúmeros fatores os microorganismos estão adquirindo resistência aos medicamentos convencionais. Igualmente as avaliações quanto as atividades citotóxicas sob células tumorais, são importantes, em função do aumento cada vez mais expressivo da incidência de câncer como uma das primeiras causas de óbito na população mundial.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

1. Preparar de extratos aquosos de *Cochlospermum regium*.

2. Avaliar extrato aquoso de raiz e parte aérea de *Cochlospermum regium* sobre linhagens de bactérias, leveduras e fungos;
3. Avaliar a atividade citotóxica de extrato aquoso de raiz e parte aérea de *Cochlospermum regium*.

2.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar o efeito antibacteriano de extratos aquosos brutos de raiz e parte aérea de *C. regium* sob as linhagens gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*;
2. Avaliar o efeito antibacteriano de extratos aquosos brutos de raiz e parte aérea de *C. regium* em cepas gram-negativas *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*;
3. Avaliar o efeito antifúngico de extratos aquosos brutos de raiz e parte aérea de *C. regium* em cepas de *Trichophyton rubrum*;
4. Avaliar o efeito citotóxico dos extratos aquosos brutos de raiz e parte aérea de *C. regium* sob linhagem celular normal 3T3 *in vitro*;
5. Avaliar o efeito citotóxico dos extratos aquosos brutos de raiz e parte aérea de *C. regium* sob linhagem celular tumoral de melanoma murino *in vitro*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Preparo dos extratos

Plantas de *C. regium* (3 genótipos) foram coletadas no município de Altinópolis – SP em um campo de Cerrado (Lat. 21°03'17.3" Long. 47°29'19,7" alt. 594m).

No laboratório o material foi separado em parte aérea e sistema radicular e posteriormente seco em estufa de ar circulate (Marconde 32 A) a 40°C por dois

dias. Em seguida foi pulverizado em moinho de faca até a obtenção de pó. Raízes de *C. regium* foram separadas em 3 genótipos e as partes aéreas misturadas em decorrência de diminuta quantidade de material.

Em seguida, foram realizados os decoctos à 10%. Estes extratos aquosos das raízes se apresentaram de uma forma viscosa o que impediu a filtragem, sendo necessário centrifugar o extrato, por 10 minutos a 10.000 rpm, obtendo-se duas fases do extrato (Figura 15): fase 1 denominada líquida e fase 2 chamada viscosa.



Figura 15: Extrato de raiz de *C. regium* apresentando duas fases após centrifugação.

Extrato a frio também foi realizado para a raiz do genótipo 1. Para seu preparo, o pó da raiz do genótipo 1 foi batido em liquidificador com água fria e posteriormente filtrado e liofilizado para os experimentos.

Para o preparo das alíquotas, foram pesados quantidades de aproximadamente 25mg da amostra, na qual foi acondicionada em tubos tipo *ependorf* de 2mL de capacidade. Esta, em câmara de fluxo laminar foi exposta a 1,5mL meio de cultivo respectivo ao microorganismo a ser utilizado e adicionado de 6% do solvente DMSO (Dimetilsulfóxido). Após foi realizada a diluição em vortex por aproximadamente 10 minutos. As amostras permaneceram em agitação *overnight* em mesa orbital a 90rpm. Em seguida, os extratos foram centrifugados a 12000rpm por 2 minutos e o sobrenadante retirado, novamente em fluxo laminar, transferido para tubos de 1,5mL, protegidos por papel alumínio

e congelados em freezer de -20°C. Para saber a concentração real utilizada, o restante da amostra que permaneceu no tubo após a coleta do sobrenadante foi seca em estufa de ar circulante a 45°C por 48 horas para evaporação total da água. Decorrido o tempo de secagem, as amostras foram novamente pesadas descontadas do valor inicial pesado.

3.2 Atividade antimicrobiana

O efeito da atividade antimicrobiana foi avaliado pelo método de microdiluição em meio BHI líquido (Brain Heart Infusion), para bactérias, ou RPMI, para fungos, em placas contendo 96 poços, seguindo as normas CLSI M7-A6 (2003) - bactérias, ou CLSI M27-A2 (2002) – fungos, com pequenas modificações, para adaptar o protocolo a fim de avaliar as concentrações dos extratos vegetais brutos.

A concentração do inóculo para bactérias foi ajustada em espectro (Spectronic® Genesys 2) utilizando, para bactérias, comprimento de onda de 550nm, numa faixa de absorvância de 0,10 a 0,15 e para fungos, comprimento de onda de 530nm, e a faixa de absorvância entre 0,125 e 0,150. Em seguida, o inóculo padrão foi diluído 50 vezes em meio de cultivo respectivo e, 100µL deste foi utilizado por poço o que equivale a 1×10^4 CFU/mL (Unidade formadora de colônia/mL) de cada linhagem de bactéria ensaiada.

Controles de esterilidade do meio de cultura e dos extratos foram realizados conjuntamente. A CIM (Concentração Inibitória Mínima) correspondeu à menor concentração inibitória do extrato ou fração onde não houver crescimento macroscópico das linhagens microbianas avaliadas comparadas com o crescimento do controle positivo.

Para a montagem da placa 100µL da amostra foram colocados em 3 poços da fileira 1, sendo que as duas últimas fileiras são reservadas para o controle de meio e antibióticos previamente determinados. Nas colunas 2 a 12 foram adicionados 100µL de meio de cultura com auxílio de pipetador automático. Foi adicionado 100µL a coluna 1 e a partir daí iniciou-se a diluição seriada até a coluna 11.

As bactérias avaliadas foram *Escherichia coli* ATCC 25922 e clínica, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e clínica, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27873 e clínica e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 2231 e clínica. O antibiótico referência utilizado foi Gentamicina.

Os fungos avaliados foram *Trichophyton rubrum* ATCC MYA3108 e um clínico mutante $\Delta TruMDR2$. O antibiótico referência foi anfotericina B.

Foram utilizados extratos aquosos brutos liofilizados de raiz do genótipo G1, G2 e G3 separados em líquido e viscoso, extrato de parte aérea e extrato a frio do genótipo 1 (G1F), diluídos em meio de cultivo e 6% de DMSO. Somente para atividade fúngica não foi avaliado o extrato a frio.

Os experimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar com auxílio de ponteiros e pipetadores com 3 repetições em 3 replicatas por cultura.

3.3 Atividade citotóxica

A cultura 3T3 (fibroblasto normal) foi cultivada em meio DMEM (Dulbelcos Eagle Medium) suplementado com 15% de soro bovino fetal (Cultilab), em estufa de CO₂ circulante 5% a 37°C. Quanto a linhagem tumoral melanoma murino (B16), o cultivo foi realizado em meio de cultura HAM F10 (Sigma®), suplementado com soro fetal bovino a 15%.

Após observação de confluência celular em 90% da garrafa, retirou-se o meio de cultura e adicionou-se 3mL de solução de Hanks, repetindo-se este procedimento por 3 vezes de forma a garantir que na garrafa de cultura não houvesse resquício de meio.

Adicionou-se, então, 3mL de solução da enzima Tripsina 25% (Sigma®). Esta garrafa foi levada a estufa 37°C com CO₂ circulante 5% onde permaneceu por 2 minutos. Decorrido o período de incubação, retirou-se, com movimentos bruscos, as células outrora aderidas. Estas foram transferidas a um tubo falcon 15mL. Este foi levado a centrifugação por 2 minutos a 9000 rpm. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se as células em 1mL de meio de cultura, conforme necessidade da célula alvo (DMEM ou HAM F10) suplementado com soro. Realizou-se contagem celular em câmara de Newbauer. Ajustou-se, após sucessivas diluições, uma concentração entre 1,5 e 2,0 x 10⁵ células. Distribui-se 100µL de células por poço, ou seja, 1,5 a 2,0 x 10⁵ células. Após distribuição celular, acrescentou-se 100µL de meio de cultura DMEM + 15% de soro. A placa foi então levada à estufa onde permaneceu por 24 horas para adesão celular.

Para adição do extrato, retirou-se todo o meio de cultura e lavaram-se as células 2 vezes com solução de Hanks. Adicionou-se 100µL de meio sem antibiótico com soro a cada poço e os extratos foram dispostos a serem ensaiados em trélicas. A placa foi então levada a estufa onde permaneceu por 48 horas. Decorrido o período de incubação, retirou-se o meio e o extrato, lavou-se os poços com solução de Hanks 2 vezes e adicionou-se solução, [MTT 3- (4,5 dimetilazol- 2yl)- 2-5- difenil- 2H tetrazolato de bromo)], MTT (5mg/mL). Esta permaneceu em contato com as células por 4 horas ainda em estufa de CO₂ circulante 5%. Após 4 horas, o corante MTT foi removido e lavou-se a placa 1 a 3 vezes com solução de Hanks. Adicionou-se 100µL de isopropanol, aguardou-se 20 a 30 minutos para solubilização do MTT em azul de formazan. Após conversão analisou-se a porcentagem de sobrevivência ou inibição do crescimento celular em espectrofotômetro ELISA a 590nm.

Foi utilizado extrato aquoso bruto liofilizado de raiz do genótipo G1, G2 e G3 separados em líquido e viscoso, extrato de parte aérea e extrato a frio do genótipo 1 (G1F), diluídos em meio de cultivo e 6% de DMSO.

A maior concentração utilizada foi 100µg/mL de extrato e 2µg/mL de antibiótico Actinomicina D.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Preparo dos extratos

O rendimento dos extratos variou em função do genótipo e os resultados estão descritos na Tabela 20.

Tabela 20: Dados relacionados à produção e rendimento dos extratos vegetais de *Cochlospermum regium*, UNAERP, Ribeirão Preto – SP, 2009.

Extratos	Rendimento em peso seco do extrato aquoso (%)			
	Material seco	Líquido	Viscoso	Total
Raiz Genótipo 1	600g	7,96%	4,33%	12,29%
Raiz Genótipo 1 Frio	100g	-	-	7,20%
Raiz Genótipo 2	170g	5,90%	12,39%	18,29%
Raiz Genótipo 3	50g	9,90%	31,68%	41,58%
Parte aérea	455g	-	-	40,03%

- não houve separação de fases

4.2 Atividade antimicrobiana

Extrato bruto de raiz de *C. regium* tanto na fase líquida, como viscosa, não apresentaram atividade antibacteriana frente a nenhuma linhagem avaliada, nas condições de trabalho (Tabela 21). Este resultado corrobora com o obtido por Oliveira et al. (1996) que avaliaram o efeito antibacteriano de decocto de raiz de *Cochlospermum regium* sobre *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e concluíram que esse tipo de extrato não apresentou atividade frente aos microorganismos utilizados.

Embora os resultados apresentados neste trabalho tenham sido negativo para a atividade antibacteriana, recomendamos que novos ensaios sejam realizados alterando a forma de preparo dos extratos, a coleta de material em diversos estágios vegetativos e em diferentes condições de sazonalidade. Estas considerações são importantes porque não se pode desconsiderar os estudos etnofarmacológicos que evidenciam de forma proeminente a utilização desta espécie para infecções e contaminação microbiana, de modo geral, para estômago, próstata, vias urinárias, além do aparelho reprodutor feminino.

Uma dificuldade encontrada durante o preparo das alíquotas para os testes foi referente às diluições. Percebeu-se que os extratos, principalmente os viscosos, apresentavam dificuldade de solubilidade em água. Desta forma, diante do processo utilizado para diluição citado em material e métodos, cada alíquota apresentava uma concentração diferente. No entanto, foram preparadas quantidades suficientes para realizar as repetições no mínimo para as mesmas linhagens ATCC e clínica.

É importante considerar que um dos grandes desafios apontados pelas indústrias farmacêuticas é referente a padronização de extratos de origem natural. Um artigo recente publicado na revista Science mostra a clara preocupação destas indústrias, sendo a formulação dos extratos uma barreira imposta para a maior produção de medicamentos provenientes de produtos naturais (LI e VEDERAS, 2009).

Tabela 21: Atividade antibacteriana de extrato bruto de 3 genótipos de raiz de *C. regium* e de parte aérea UNAERP, Ribeirão Preto – SP, 2009.

Linhagens	Raiz G1			Raiz G2		Raiz G3		Parte aérea G1+G2+G3	Gentamicina ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
	Líqu	Visc	Frio	Líqu	Visc	Líqu	Visc		
<i>E. coli</i> ATCC	>2,8	>1,0	>1,3	>1,3	>1,0	>1,2	>2,7	>1,5	25
<i>E. coli</i> clínica	>2,8	>1,0	>1,3	>1,3	>1,0	>1,2	>2,7	>1,5	25
<i>S. aureus</i> ATCC	>2,8	>1,0	>1,3	>1,3	>1,0	>1,2	>2,7	>1,5	12,5
<i>S. aureus</i> clínica	>2,8	>1,0	>1,3	>1,3	>1,0	>1,2	>2,7	>1,5	75
<i>P. aeruginosa</i> ATCC	>1,0	>1,0	>1,0	>1,5	>1,0	>1,0	>2,7	>1,5	25
<i>P. aeruginosa</i> clínica	>1,0	>1,0	>1,0	>1,5	>1,0	>1,0	>2,7	>1,5	125
<i>S. epidermidis</i> ATCC	>2,8	>1,0	>1,0	>1,5	>1,0	>3,0	>2,7	>1,5	12,5
<i>S. epidermidis</i> clínica	>2,8	>1,0	>1,0	>1,5	>1,0	>3,0	>2,7	>1,5	12,5

(>) referente a maior concentração utilizada nos testes em mg mL^{-1}

Há uma necessidade especial para produtos com ação antifúngica, pois poucos são os existentes no mercado, e a busca por esta atividade através da química das plantas é imensa, e muitas apresentam resultados satisfatórios (DULGER e HACIOGLU, 2008; BOBBARALA et al., 2009; BOKHARI, 2009; THOBUNLUEPOP et al., 2009; MOREIRA et al., 2010). No entanto, nas condições avaliadas, nenhum dos extratos mostrou atividade contra *Trichophyton rubrum* (Tabela 23).

Tabela 22: Atividade antifúngica de extrato bruto de 3 genótipos de raiz de *C. regium* e de parte aérea UNAERP, Ribeirão Preto – SP, 2009.

Linhagens	Raiz G1		Raiz G2		Raiz G3		Parte aérea G1+G2+G3	Fluconazol ($\mu\text{g /mL}$)
	Líqu	Visc	Líqu	Visc	Líqu	Visc		
<i>T. rubrum</i> ATCC	>4,3	>0,8	>4,3	>0,7	>4,2	>3,3	>4,2	36
<i>T. rubrum</i> $\Delta\text{TruMDR2}$	>4,3	>0,8	>4,3	>0,7	>4,2	>3,3	>4,2	36

(>) referente a maior concentração utilizada nos testes em mg mL^{-1}

4.3 Atividade citotóxica

4.3.1 3T3 fibroblasto (células normais)

No teste realizado em 3T3 fibroblasto (células normais que diferenciam em vários tecidos) foi verificado que os extratos mostraram baixa citotoxicidade, com exceção do extrato G1F (extrato a frio) no qual a porcentagem de inibição do crescimento celular foi semelhante a Actinomicina D (antibiótico referência). No entanto, esta citotoxicidade indesejada foi menor que a apresentada pelo antibiótico (34,87% - Tabela 24).

Alguns extratos estimularam a proliferação da célula, ou sua atividade mitótica, como a fase líquida do extrato da raiz do genótipo 1, a fase viscosa do genótipo 3 e o extrato da parte aérea. Desta forma, pode-se dizer que os extratos nas condições avaliadas apresentam baixa citotoxicidade frente a células normais.

Esta introdução a atividade citotóxica de extratos aquosos de *C. regium* são importantes no que diz respeito a viabilização de um futuro fitoterápico. É importante conhecer claramente os possíveis problemas e/ou soluções que o produto natural apresenta para que possa passar para as próximas fases dos testes clínicos e garantir um fitoterápico de qualidade e seguro.

4.3.2 B16 – melanoma murino

A maioria dos extratos possibilitou o aumento da atividade mitótica das células melanoma murino. Estas são causadoras de cânceres de pele. Quando houve atividade inibidora do crescimento celular, esta foi insignificante, sendo maior quando o extrato utilizado foi o da parte aérea (11,37%). A droga referência (Actinomicina D) controlou 79,16%, mostrando que o extrato bruto de raiz e folhas de *C. regium*, não foi eficiente contra o melanoma e pelo contrário, aumentou a atividade mitótica da célula cancerígena (Tabela 24).

Estes resultados são importantes, pois se confirmados em outros tipos de ensaios os fitoterápicos produzidos a partir de *C. regium* não deverão ser prescritos para pacientes com pré-disposição genética a esse tipo de câncer.

Tabela 23: Porcentagem de inibição celular de melanoma murino (B16) e fibroblasto (3T3) dos extratos aquosos brutos de *C. regium*, UNAERP, Ribeirão Preto – SP, 2009.

Extrato	B16	3T3
Raiz G1 líquido	*	*
Raiz G1 viscoso	*	9,31%
Raiz G1 frio	7,83%	34,87%
Raiz G2 líquido	7,13%	21,98%
Raiz G2 viscoso	*	14,41%
Raiz G3 líquido	*	17,15%
Raiz G3 viscoso	*	*
Parte aérea	11,37%	*
Actinomicina D	79,16%	47,63%

(*) aumentaram atividade mitótica.

5. CONCLUSÃO

1. Os extratos de *Cochlospermum regium* nas condições avaliadas não apresentam atividade antibacteriana e antifúngica;
2. Extratos aquosos de *C. regium* nas condições avaliadas apresentam baixa citotoxicidade em células normais e aumentam o potencial mitótico em células B16-F10.

Capítulo V. IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Cochlospermum regium*

1. INTRODUÇÃO

Cochlospermum regium é uma espécie medicinal importante do Cerrado, cuja composição química é pouco conhecida e estudada. Sabe-se que nas suas raízes há presença de flavonóides, com apenas um único isolado, o Dihidrokaenferol 3-O-glucopiranoside. No entanto, os estudos químicos desta espécie devem ser realizados para somar aos estudos agronômicos, farmacológicos e genéticos o que possibilitará o desenvolvimento de produto fitoterápico que apresentem segurança, qualidade e eficácia

Alguns testes são utilizados para determinar o perfil químico geral das plantas. Um destes pode ser o histoquímico em cortes anatômicos, que revela a presença ou ausência dos grandes grupos de metabólitos secundários nas plantas. Com este perfil aliado aos estudos biológicos, é possível direcionar as avaliações em busca de uma substância química ou um grupo específico que provavelmente está condicionando esta atividade.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o perfil químico da espécie *Cochlospermum regium*

2.2 Objetivos Específicos

1. Identificar as substâncias presentes nas folhas de *C. regium* através de análises histoquímicas anatômicas;
2. Determinar a composição química do óleo essencial de folhas de *C. regium*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Descrição geral dos experimentos

O material vegetal de *Cochlospermum regium* para testes histoquímicos e extração de óleo essencial, foi coletado as 9:00 h da manhã na reserva EcoCerrado Brasil, em Araxá –MG (Lat19°36'48,9''Long. 42°08'20,8 929m). Para as análises histoquímicas as folhas foram separadas em jovens (5 cm) e adultas (9cm).

3.2 Teste histoquímico

Foram coletados 4 genótipos de plantas de *C. regium*. Os cortes, feitos na região da nervura central, foram feitos manualmente separando-se folhas velhas de folhas jovens (brotos). Os reagentes utilizados foram:

- Sudan III para lipídeos (Coloração vermelha);
- FeCl₃ 1% - Cloreto férrico (coloração preta, azul escuro) e K₂Cr₂O₇ - dicromato de potássio (coloração castanho-avermelhada) para fenólicos totais;
- Vanilina clorídrica para taninos (coloração avermelhada);

- Dragendorff - iodo bismutato de potássio (coloração castanho-avermelhada) e Bouchardt - iodeto de potássio (coloração marrom-avermelhada) para alcalóides.

Em todos os testes foi feito um controle, onde cortes foram clarificados e submetidos aos mesmos procedimentos.

3.3 Composição do óleo essencial de folhas de *C. regium*

Partes aéreas secas em estufa de ar circulante à 43°C foram posteriormente submetidas à hidrodestilação por 120min, utilizando-se aparelho Clevenger. Para a obtenção do óleo essencial foram pesadas 26g de folhas, as quais foram inseridas em um balão de fundo redondo com capacidade volumétrica de 250mL contendo \cong 120mL de água destilada.

A identificação das substâncias presentes nos óleos essenciais foi realizada em colaboração com o IAC – Instituto Agrônomo de Campinas, sob os cuidados da Prof^a Dr^a Márcia Ortiz Mayo Marques. A identificação das substâncias foi conduzida em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM, Shimadzu, QP-5000), dotado de coluna capilar de sílica fundida OV - 5 (30m x 0,25mm x 0,25 μ m Ohio Valley Specialty Chemical, Inc.), operando por impacto de elétrons (70eV). As condições de Análise foram: *Injetor*: 240°C; *Detector*: 230°C; *Gás de arraste*: He; *Vazão*: 1,0mL/min.; *Diluição*: 1 μ L óleo essencial/1,0mL AcoEt (Acetato de Etila), *Volume de Injeção*: 1 μ L, *Split*: 1/20. *Programação*: 60°-165°C, 3°C/min.; 165°-240°C, 10°C/min.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Teste histoquímico

Os testes histoquímicos permitem a evidenciação de classes de metabólitos secundários, como compostos fenólicos totais, alcalóides, lipídeos, lignina, dentre outros, e podem ser aplicadas às secções obtidas de materiais frescos ou fixadas. Através das

colorações das estruturas submetidas aos reagentes específicos para cada grupo ativo, é possível detectar a presença desses grupos e até seus locais de acúmulo, com o auxílio da microscopia óptica (KRAUS e ARDUIN, 1997; RICCO, 2002).

Em cortes de nervura central de folhas de *C. regium*, os testes histoquímicos com o reativo Sudan, indicaram a presença de compostos lipídeos, o Cloreto férrico mostrou coloração enegrecida na região da epiderme na nervura da folha e o Dicromato de potássio com coloração castanho-avermelhado, indicando reação positiva para compostos fenólicos em geral. A Vanilina clorídrica indicou reação positiva para taninos em células de parênquima da nervura central da folha e na mesma região foi observada, pelo teste de Dragendorff e Bouchardt, a presença de alcalóide (Tabela 25).

Tabela 24: Testes histoquímicos em folhas de *C. regium*, FCA/UNESP, Botucatu – SP, 2008

Genótipo	Folhas	Sudan III		Dragendorff		Bouchardt		K ₂ Cr ₂ O ₇		FeCl ₃ 1%		Vanilina clorídrica	
		C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T
01	Jovem	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
	Adultas	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
02	Jovem	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
	Adultas	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
03	Jovem	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
	Adultas	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
04	Jovem	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
	Adultas	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+

(C) controle; (T) tratamento; (-) negativo; (+) positivo

Os testes comprovam que há presença de todos os grandes grupos ativos em folhas da espécie *C. regium* (Figura 16) e que esta não se diferencia quanto a idade das folhas, estando presentes nas jovens e velhas.

Visto que foram encontrados lipídeos nas folhas de *C. regium*, se fez necessário a extração do óleo essencial bem como sua análise.

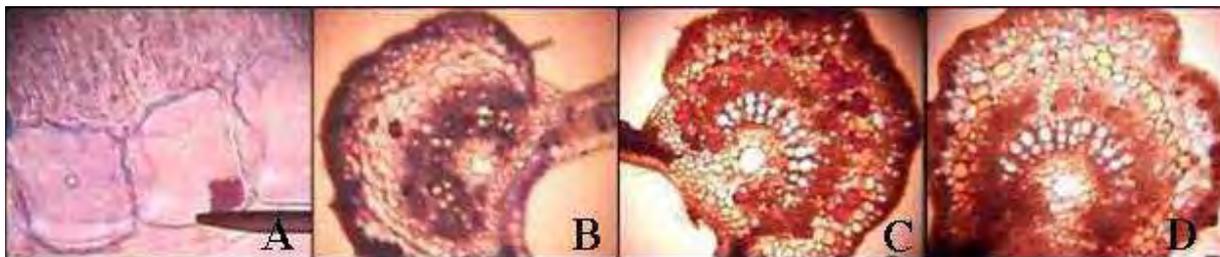


Figura 16: Testes histoquímicos em folhas de *C. regium*
(A) lipídeos; (B) fenólicos totais; (C) taninos; (D) alcalóides.

4.2 Composição do óleo essencial de folhas de *C. regium*

Os óleos essenciais são constituídos principalmente por terpenos e seus derivados oxigenados. Tem grande importância na indústria de fragrâncias, farmacêutica e na aromaterapia. Esses óleos são normalmente obtidos por destilação com arraste de vapor ou por hidrodestilação de diferentes partes das plantas, incluindo flores, folhas, sementes, raízes, tronco, casca e madeira (FACCHETTI e CADOPPI, 2005).

Cada vez mais aumenta o interesse pelo estudo da caracterização e composição dos óleos essenciais de plantas para fins medicinais (POTZERNHEIM et al., 2006; MARCO et al., 2007; MAIA et al., 2007; VULPI et al., 2007; BORSATO et al., 2008; RODRIGUES et al., 2008; BOTREL et al., 2009; COSTA et al., 2009).

Nas folhas de *C. regium* foram identificadas 94,87% dos compostos presentes no óleo essencial totalizando 32 substâncias (Tabela 26), sendo majoritários os β -Copaen-4-alfa-ol (18,73%) e Viridiflorol (12,67%). A porcentagem de óleo extraído da folha foi de 0,2% e esse teor foi semelhante ao obtido em trabalho realizado por Honda et al. (1997). Entretanto esses autores obtiveram como constituinte majoritário do óleo essencial de *C. regium* o β -selineno (34,1%). Os resultados apresentados até o momento mostram que certamente deve haver quimiotipos dentro da espécie, com expressivas variações qualitativas, o que sinaliza a necessidade de se realizar estudos mais aprofundados sobre a relação entre a composição química e atividade biológica dos óleos essenciais extraídos de *C. regium*.

Tabela 25: Composição do óleo essencial de folhas de *C. regium*, FCA/UNESP, Botucatu – SP, 2008.

Substância	Porcentagem	Índice de Kovats
1. β -Copaen-4-alfa-ol	18,73	1584
2. Viridiflorol	12,67	1590
3. Biciclogermacreno	8,26	1494
4. Longiborneol	7,13	1592
5. Trans cariofileno	4,49	1418
6. α -humuleno	4,44	1454
7. Cubenol	4,44	1642
8. Mirceno	3,82	991
9. Cadinol<epi- α >	3,14	1640
10. Germacreno B	2,96	1556
11. Cedr-8(15)EM-9- α	2,87	1644
12. Bisaboloides	2,86	1626
13. Guaiol	2,61	1595
14. 1,2-epoxi humuleno	2,16	1606
15. Spatulanol	2,07	1576
16. Cubenol <1Epi>	1,77	1627
17. Kushimona	1,51	1593
18. Epi-longipinanol	1,31	1561
19. Eudesmol <10-epi-gamma>	1,29	1619
20. α -muurolol	0,84	1645
21. Germacreno D	0,69	1480
22. Ledol	0,58	1565
23. δ -cadineno	0,48	1513
24. Δ -cadineno	0,47	1524
25. Germacreno A	0,44	1503
26. δ -muuroleno	0,37	1477
27. β -elemeno	0,35	1391
28. 9-epi-(E)-cariofileno	0,32	1467
29. α -muuroleno	0,30	1499
30. β -bourboneno	0,22	1384
31. Aromadandreno	0,21	1441
32. Δ -elemeno	0,18	1339

5. CONCLUSÃO

1. Folhas de *C. regium* contêm as principais classes de metabólitos secundários produzidos por plantas angiospermas
2. O óleo essencial das folhas de *C. regium* apresentou vasta gama de substâncias químicas sendo o β -Copaen-4-alfa-ol o composto majoritário.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIRES, P. S. R.; CARVALHO, J. M. F. C; PIMENTEL, N. W.; SILVA, H. Efeito da citocinina 6-benzilaminopurina na micropropagação *in vitro* da mamona utilizando o genótipo BRS Nordestina. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 8, n. 2, 2008.

AIRES, P. S. R.; CARVALHO, J. M. F. C; PIMENTEL, N. W.; SILVA, H. Efeito da concentração de vitaminas e das fontes de carbono no superbrotamento da mamona utilizando o genótipo BRS Nordestina. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 7, n. 2, 2007.

ALBUQUERQUE, C. C.; CAMARA, T. R.; MANEZES, M.; WILLADINO, L.; MEUNIER, L.; ULISSES, C. Cultivo *in vitro* de ápices caulinares de abacaxizeiro para limpeza clonal em relação à fusariose. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 57, n. 2 p. 363-366, 2000.

ALIYU, R.; OKOYE, Z. S. C.; THOMAS SHIER, W. The hepatoprotective cytochrome P-450 enzyme inhibitor isolated from the Nigerian medicinal plant *Cochlospermum planchonii* is a zinc salt. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 48, p. 89-97, 1995.

ALMEIDA, C. V. de; YARA, R.; ALMEIDA, M. de. Fungos endofíticos isolados de ápices caulinares de pupunheira cultivada *in vivo* e *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 5, p.467-470, 2005.

AMÂNCIO, V. F.; MENDONÇA, A. B.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; BLANK, A. F.; LEDO, A. S.; INNECCO, R. **Desinfestação de alecrim-pimenta utilizando hipoclorito de sódio**. Associação Brasileira de Horticultura. Disponível

em:<http://www.abhorticultura.com.br/biblioteca/arquivos/Download/Biblioteca/44_053.pdf>. Acesso em: 25 dez. 2009.

ANAON, R. Survey of exting Data in *ex situ*. **Collections of plant genetic resources for food and agriculture**. Food and Agriculture Organization, Roma, 1994.

ANDRADE, L. S.; SANTOS, D. B.; CASTRO, D. B.; GUILLO, L. A.; CHEN-CHEN, L. Absence of antimutagenicity of *Cochlospermum regium* (Mart. and Schr.) Pilger 1924 by micronucleus test in mice. **Brazilian Journal Biology**, São Carlos, v. 68, n. 1, p.155-159, 2008.

ANDRADE, M. W. de.; LUZ, J. M. Q.; LACERDA, A. S.; MELO, P. R. A. de. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All). **Ciências Agrotécnicas**, Lavras, v. 24, n. 1, p.174-180, 2000.

APOÂ STOLO, N. M.; LLORENTE, B. E. Anatomy of normal and hyperhydric leaves and shoots of *in vitro* grown *Simmondsia chinensis* (Link) Schin. **In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, New York, v. 36, p. 243-249, 2000.

ARAÚJO, A. G de; PASQUAL, M.; SILVA, A. B da; VILLA, F.; ROCHA, H. S.; COSTA, F. C. Propagação *in vitro* de plântulas de orquídea em diferentes meios de cultura e concentrações de citocinina. **Plant Cell Culture and Micropropagation**, Lavras, v. 2, n. 2, p. 68-73, 2006.

BAHMANI, R.; KARAMI, O.; GHOLAMI, M. Influence of carbon sources and their concentrations on rooting and hiperhydricity of apple Rootstock MM.106. **World Applied Sciences Journal**, Teerã, v. 6, n. 11, 2009.

BANDEIRA, J. de M.; LIMA, C. S. M.; RUBIN, S.; RIBEIRO, M. V.; FALQUETO, A. R.; PETERS, J. A.; BRAGA, E. J. B. Diferentes tipos de vedações dos frascos e concentrações de sacarose na micropropagação de *Thymus vulgaris* L. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 472-474, 2007.

BAPUJI, J. L.; RATNAM, S. V. Traditional uses of some medicinal plants by tribals of Gangaraju Madugula Mandal of Visakhapatnam District, Andhra Pradesh. **Ethnobotanical Leaflets**, Tamil Nadu, v, 13, p. 388-398, 2009.

BARRUETO CID, L. P. A propagação *in vitro* de plantas. O que é isso? **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, DF, v. 3, n. 19, p. 16-21, 2001.

BARRUETO CID, L. P.; ZIMMERMANN, M. J. **A contaminação *in vitro* de plantas**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, 20p., 2006.
BELTRÃO, A. E. S.; LAMOCA-ZARATE, R. M.; BELTRÃO, F. A. S. Cultura *in vitro* de *Solanum paludosum*: regeneração. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 21, n. 4, p. 79-82, 2008.

BENOIT-VICAL, F.; VALENTIN, A.; DA, B.; DAKUYO, Z.; DESCAMPS, L.; MALLIÉ, M. N'Dribala (*Cochlospermum planchonii*) versus chloroquine for treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 89, p. 111-114, 2003.

BENOIT-VICAL, F.; VALENTIN, A.; PÉLLISIER, Y.; MARION, C.; DAKUYO, Z.; MALLIÉ, M.; BASTIDE, J. M. Antimalarial activity in vitro of *Cochlospermum tinctorium* tubercle extracts. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 89, p. 217-218, 2005.

BERTONI, B. W.; DAMIÃO FILHO, C. F.; MORO, J. R.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, A. M. S. 2006. Micropropagação de *Calendula officinalis* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 1, p. 48-54, 2006.

BLENCH, R. **Hausa names for plants and trees**. 2 ed., 2007 Disponível em: <<http://www.rogerblench.info/RBOP/htm>>. Acesso em: 19 set. 2009.

BOBBARALA, V.; KATIKALA, P. K.; NAIDU, K. C.; PENUMAJJI, S. Antifungal activity of selected plant extracts against phytopathogenic fungi *Aspergillus niger* F2723. **Indian Journal of Science and Technology**, Chennai, v. 2, n. 4, p. 87-90, 2009.

BOKHARI, F. M. Antifungal activity of some medicinal plants used in Jeddah, Saudi Arabia. **Mycopathologia**, New York, v. 7, n. 1, p. 51-57, 2009.

BORSATO, A. V.; DONI-FILHO, L.; CÔCCO, L. C.; PAGLIA, E. C. Rendimento e composição química do óleo essencial da camomila [*Chamomilla recutita* (L.) Rauschert] extraído por arraste de vapor d'água, em escala comercial. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 1, p. 129-136, 2008.

BOTREL, P. P.; PINTO, J. E. B. P.; FIGUEIREDO, F. C.; BERTOLUCCI, S. K. V.; FERRI, P. H. Teor e composição química do óleo essencial de *Hyptis marrubioides* Epling (Lamiaceae) em diferentes genótipos. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Botucatu, v. 11, n. 2, p. 164-169, 2009.

BRAIDOT, E.; ZANCANI, M.; PETRUSSA, E.; PERESSON, C.; BERTOLINI, A.; PATUI, S.; MACRI, F.; VIANELLO, A. Transport and accumulation of flavonoids in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant Signaling & Behavior*, v. 3, n. 9, p. 626-632, 2008.

BRAND, M. H. Agar and ammonium nitrate influence hyperhydricity, tissue nitrate and total nitrogen content of serviceberry (*Amelanchier arborea*) shoots *in vitro*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v. 35, p. 203-209, 1993.

BRONDANI, G. E.; DUTRA, L. F.; GROSSI, F.; WENDLING, I.; HORNIG, J. Estabelecimento, multiplicação e alongamento *in vitro* de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden. *Revista Árvore*, Viçosa, v. 33, n. 1, p. 11-19, 2009.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALSA, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, CBAB, 1998.

CALGAROTO, N. S.; TATSCH, R.; SILVA, A. C. F. da; PARANHOS, J. T. Germinação *in vitro* de sementes de *Scutis buxifolia* Reissek. *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 357-359, 2007.

CAMILLO, J. **Germinação e conservação de germoplasma de algodão-do-campo [*Cochlospermum regium* (Mart. & Schr.) Pilg.] - Cochlospermaceae**. 2008. 95 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Agrárias, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

CAMILLO, J.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; VIEIRA, R. F.; PEIXOTO, J. R. Conservação *in vitro* de *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilg.-Cochlospermaceae sob regime de crescimento mínimo. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Botucatu, v. 11, n. 2, p. 184-189, 2009.

CAMPOSTRINI, E.; OTONI, W. C. Aclimação de Plantas: abordagens recentes. **ABCTP Notícias**, Brasília, n. 25, 1996. Disponível em: <<http://www.cnph.embrapa.br/laborato/biocel/abctp25.htm>>. Acesso em: 16 fev. 2010.

CANO, N. D.; PETERLE, P. L. CUZZUOL, G. R. F. Controle da contaminação do cultivo de *Sinningia aghensis* Chaultherms *in vitro*. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 891-893, 2007.

CARVALHO, A. R. Popular use, chemical composition and trade of Cerrado's medicinal plants (Goiás, Brazil). **Environment, Development and Sustainability**, n, 6, p. 307-316, 2004.

CARVALHO, J. F. R. P. de; CARVALHO, C. R. de; OTONI, W. C. Regeneração *in vitro* de urucum (*Bixa orellana* L.) a partir de diferentes tipos de explantes. **Revista árvore**, Viçosa, v. 29, n. 6, p. 887-895, 2005.

CARVALHO, J. M. F. C.; ARAÚJO, S. de S.; SILVA, M. A. da. **Preservação e intercâmbio de germoplasma**. Embrapa Algodão, Campina Grande, 24p., 2008.

CARVALHO, J. M. F. C.; SILVA, M. M. de A.; MEDEIROS, M. J. L. e. **Fatores inerentes à micropropagação**. Embrapa Algodão, Campina Grande, 28p., 2006.

CARVALHO, J. M. F. C.; VIDAL, M. S. **Crioconservação no Melhoramento Vegetal**. Campina Grande: EMBRAPA Algodão, 2003.

CARVALHO, N. M. de; NAKAGAWA, J. **Sementes: Ciência, tecnologia e produção**. Campinas: Fundação Cargill, 326 p., 1980.

CASTIGLIONE, V.; CAVALLARO, V.; DI SILVESTRO, I.; BARBERA, A. C. Acclimatization of micropropagated globe artichoke (*Cynara cardunculus* L. Subsp. *Scolymus* (L.) Hegi) plantlets as affected by mycorrhizal inoculum, transplantation time and genotype. **Acta Horticulturae**, v. 812, p. 461-466, 2009. Disponível em: <http://www.actahort.org/books/812/812_66.htm>. Acesso em: 17 fev. 2010.

CASTRO, D. B.; SANTOS, D. B.; FERREIRA, H. D.; SANTOS, S. C.; CHEN-CHEN, L. Atividades mutagênica e citotóxica do extrato de *Cochlospermum regium* Mart. (algodãozinho-do-campo) em camundongos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 6, n. 3, p.15-19, 2004.

CASTRO, M. S. de A. **Mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo do 3-O glicosildihidrocanferol, flavonóide extraído dos rizomas de *Cochlospermum regium***. 2000.

155 f. Tese (Doutorado) - Curso de Farmacologia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2000.

COELHO, M. F. B.; SALES, D. M.; ALBUQUERQUE, M. C. F.. Germinação e emergência de *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilg. em diferentes substratos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 10, n. 4, p.90-96, 2008.

CORDEIRO, M. C. R.; BARRUETO CID, L. P.; PINTO, A, C. de Q.; GOMES, A. C.; ANDRADE, S. R. M. de; RAMOS, V. H. V. **Ensaio preliminares para o estabelecimento de um protocolo de assepsia, visando à micropropagação de cultivares de mangueira**. Embrapa Cerrados: Planaltina-DF, 20p., 2002.

COSTA, L. C. B.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; ALVES, P. B.; EVANGELINO, T. S. Variação no rendimento e composição química do óleo essencial de folhas de atroveran (*Ocimum selloi* Benth) inteiras e moídas sob condições de armazenamento. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 11, n. 1, p. 43-48, 2009.

COSTA, R. S.; OLIVEIRA, I. V. de M.; MÔRO, F. V.; MARTINS, A. B. G. Aspectos morfológicos e influência do tamanho da semente na germinação de jambo-vermelho. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 1, p.117-120, 1 jan. 2006.

CUZZUOL, G. R. F.; GALLO, L. A.; ALMEIDA, M. de.; CROCOMO, O. J. Controle da vitrificação do cravo (*Dianthus caryophyllus* L.) *in vitro*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 52, n. 3, p.604-614, 1995.

DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W. Enraizamento *in vitro* de mirtilo em condições fotoautotróficas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 4, p. 1012-1017, 2009.

DEBIASI, C.; SILVA, C. G.; PESCADOR, R. Micropropagação de babosa (*Aloe vera* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 9, n. 1, p. 36-43, 2007.

DEHARO, E.; BAELMANS, R.; GIMENEZ, A.; QUENEVO, C.; BOURDY, G. *In vitro* immunomodulatory activity of plants used the Tacana ethnic group in Bolivia. **Phytomedicine**, v. 11, p. 516-522, 2004.

DIMITROVA, D.; MARCHEVA, M. P. Maintenance and *in vitro* conservation of potatoes. **Acta Horticulturae**, v. 830, p. 71-76, 2009. Disponível em: <http://www.actahort.org/books/830/830_7.htm>. Acesso em: 23 dez. 2009.

DINIZ, J. D. N.; ALMEIDA, J. L.; OLIVEIRA, A. B.; BEZERRA, A. M. E. Protocolo para desinfestação, multiplicação e enraizamento *in vitro* de *Spathiphyllum wallisi*. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 39, n. 1, p. 107-113, 2008.

DIVAKARAN, M.; BABU, K. N.; PETER, K.V. Conservation of *Vanilla* species *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, v. 110, p. 175-180, 2006.

DOUGHARI, J. H.; EL-MAHMOOD, A. M.; OHILLIP, B. Evaluation of antimicrobial potentials of stem bark extracts of *Cochlospermum planchonii*. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, Victoria Island, v. 2, n. 8, p. 167-172, 2008.

DUARTE, E. F.; NAVES, R. V.; BORGES, J. D.; GUIMARÃES, N. N. R. Germinação e vigor de sementes de cagaita (*Eugenia dysenterica* Mart. Ex. DC.) em função de seu tamanho e tipo de coleta. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 36, n. 3, p.173-179, 2006.

DULGER, B.; HACIOGLU, N. Antifungal Activity of Endemic *Salvia tigrina* in Turkey. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, Benin, v. 7, n. 3, p. 1051-1054, 2008.

DUTRA, L. F.; OLIVEIRA, A. F. de; FRÁGUAS, C. B.; PASQUAL, M. Multiplicação *in vitro* de oliveira (*Olea europaea* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 1, p. 220-223, 2004.

ENGELMANN, F. *In vitro* conservation of tropical plant germplasm - a review **Euphytica**, Netherlands, v. 57, p. 227-243, 1991.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Fatores que afetam a multiplicação *in vitro* de mirtilo. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 7, n. 1-2, p. 83-88, 2006.

ETUK, E. U.; FRANCIS, U. U.; GARBA, I. Regenerative action of *Cochlospermum tinctorium* aqueous root extract on experimentally induced hepatic damage in rats. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, Victoria Island, v. 3, n. 1, p. 01-04, 2009.

FACCHETTI, R.; CADOPPI, A. Análise de óleos essenciais por cromatografia a gás ultra-rápida (ultra fast GC). **Revista Analytica**, São Paulo, v. 16, 2005.

FARIA, G. A.; COSTA, M. A. P. de C.; JUNGHANS, T. G.; LEDO, C. A. da S.; SOUZA, A. da S. Efeito da sacarose e sorbitol na conservação *in vitro* de *Passiflora giberti* N. E. Brown. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 2, p. 267-270, 2006.

FARIA, G. A.; COSTA, M. A. P. de C.; LEDO, C. A. da S.; JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. da S.; CUNHA, M. A. P. da. Meio de cultura e tipo de explante no estabelecimento *in vitro* de espécies de maracujazeiro. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n. 4, p. 535-543, 2007.

FERREIRA DF. 2005. **SISVAR 5.1** - Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows. Lavras: Universidade Federal de Lavras. Download gratuito. Disponível em: <<http://www.dex.ufla.br/~danielff/software.htm>>. Acesso em: 10 mai. 2009.

FLORA BRASILIENSIS. **Flora Brasiliensis**. 1840-1906. Disponível em: <http://florabrasiliensis.cria.org.br/search?taxon_id=6994>. Acesso em: 10 set. 2009.

FLORES, R.; NICOLOSO, F. T.; MALDANER, J.; GARLET, T. M. B. Benzilaminopurina (BAP) e thidiazuron (TDZ) na propagação *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 11, n. 3, p. 292-299, 2009.

FLORES, R.; STEFANELLO, S.; FRANCO, W. T. H.; MANTOVANI, N. Regeneração *in vitro* de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart.). **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 4, n. 3, p. 201-205, 1998.

FORTES, G. R. de L.; PEREIRA, J. E. S. Preservação *in vitro* da batata com ácido acetilsalicílico e duas fontes de carboidrato. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 10, p. 1261-1264, 2001.

FRÁGUAS, C. B.; PASQUAL, M.; PEREIRA, A. R. Multiplicação *in vitro* de *Ficus carica* L.: efeito da cinetina e do ácido giberélico. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 1, p. 49-55, 2004.

FRANCK, T.; KEVERS, C.; DEBY-DUPONT, G.; DEBY, C.; GASPAR, T. Hyperhydricity: a special defense strategy against *in vitro* culture stress conditions? **Archives of Physiology and Biochemistry**, v. 106, n. 1, p. 71, 1998.

GHISOLFI, E. M.; EFFGEN, E. M.; MENDONÇA, A. R. de.; NAPPO, M. E.; SILVA, A. G. da. Influência do tamanho da semente e tipo de recipiente na germinação de *Schizolobium amazonicum* (Herb) Ducke. **Revista Científica Eletrônica De Agronomia**, Garça, v. 5, n. 9, p.1-2, 3 mar. 2006. Disponível em: <<http://www.revista.inf.br/agro09/artigos/ARTIGO04.pdf>>. Acesso em: 07 jul. 2009.

GIRARDI, C. G.; SILVA, M. F.; PESCADOR, R. Influência da luz na aclimação de mudas de *Zingiber officinale* – roscoe (Zingiberaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 759-761, 2007.

GOLMIRZAIE, A.; TOLEDO, J. *In vitro* conservation of potato and sweetpotato germplasm. **CIP Program Report**, Peru, p. 351-356, 1998.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALSA, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, CBAB, 1998.

GUARIM NETO, G. O saber tradicional pantaneiro: as plantas medicinais e a educação ambiental. **Revista Eletrônica do Mestrado em Educação Ambiental**, Rio Grande, v. 17, 2006. Disponível em: <<http://www.remea.furg.br/edicoes/vol17/art34v17a5.pdf>>. Acesso em: 07 mai. 2008.

GUERRA, M.P.; NODARI, R. O. **Introdução ao conceito de biotecnologia: Cultura de tecidos vegetais**, 2006. Disponível em: <<http://www.lfdgv.ufsc.br/Apostila%20Biotecnologia.pdf>>. Acesso em: 10 out. 2009.

HAHN, E. J.; JEON, M. W.; LEE, E. J.; PAEK, K.Y. Acclimatization of *Doritaenopsis* hybrid orchids as affected by PPF levels. **Acta Horticulturae**, v. 812, p. 437-440, 2009. Disponível em: <http://www.actahort.org/books/812/812_62.htm>. Acesso em: 16 fev. 2010.

HASSAN, N. A.; EL-HALWAGI, A. A.; GABER, A.; EL-AWADY, M.; KHALAF, A. Slow-growth in vitro conservation of garlic cultivars grow in Egypt: chemical characterization and molecular evaluation. **Global Journal of Molecular Sciences**, Rennes cedex, v. 2, n. 2, p. 67-75, 2007.

HENSHAW, G. G. Tissue culture methods and germoplasm storage. In: VILLALOBOS, V. M.; **Proceedings of the 5th international congress on plant tissue culture**. Ed. Fujiwara. Tokyo Japan: Abe Photo Printing Co. LTd. P. 789-792, 1982.

HOFFMANN, H.; RICHTER, M. I.; SOARES, M.; KOCK, M. H.; SANSÃO, V. **Vitaminas**, Instituto Educacional Luterano de Santa Catarina, 2000. Disponível em: <<http://www.scribd.com/doc/5382222/tudo-sobre-vitaminas>>. Acesso em: 23 dez. 2009.

HOLOBIUC, I.; BLINDU, R.; CARASAN, M.; HELEPCIUC, F.; VOICHITA, C.; NEGREAN, G. *In vitro* conservation strategy in *Veronica multifida* ssp. *Capsellicarpa* (Dubovik) A. Jelen. **Romanian Journal of Biology - Plant Biology**, Bucharest, v. 53, n. 2, p. 71-81, 2008.

HONDA, N. K.; BRUM, R. L.; HESS, S. C.; CRUZ, A. B.; MORETTO, E. Antibacterial activity of *Cochlospermum regium* essential oil. **Fitoterapia**, Milano, v. 68, n. 1, p.79-79, 1997.

HOYT, E. **Conservação dos parentes silvestres de plantas cultivadas**. Wilmington: Addison-Wesley Iberoamericana, 52 p., 1992.

JOSÉ, D. P.; TAVARES, L. S.; MAZZOCCOLI, L.; VICCINI, L. F.; SANTOS, M. de O. Multibrotação *in vitro* de *Lippia lacunosa* induzida por BAP. In: XXIX Semana de Biologia e XII Mostra de Produção Científica, Juiz de Fora. **Resumos...**Juiz de Fora: UFJF, 2006.

KARTHA, K. K.; MROGINSK, L. A. I.; PAHL, K.; LEUNG, N. L. Germplasm preservation of coffee (*Coffea arabica* L.) by *in vitro* culture of shoot apical meristem. **Plant Science Letters**, v. 22, p. 301–307, 1981.

KEATMETHA, W.; SUKSA-ARD, P.; MEKANAWAKUL, M.; TE-CHATO, S. *In vitro* germplasm conservation of *Garcinia mangostana* L. and *Lansium domesticum* Corr. **Walailak Journal Science & Technology**, v. 3, n. 1, p. 33-50, 2006.

KEVERS, C.; FRANCK, T.; STRASSER, R. J.; DOMMES, J.; GASPAR, T. Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress-induced change of physiological state. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 77, p. 181-191, 2004.

KIRIZAWA, M. **Contribuição ao conhecimento morfo-ecológico e do desenvolvimento anatômico dos órgãos vegetativos e de reprodução de *Cochlospermum regium* (MART. e SCHR.) PILGER – Cochlospermaceae**. 1981. 437 f. Tese (Doutorado) - IB/USP, São Paulo, 1981.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: EDUR. 198 p., 1997.

KRIKORIAN, A. D. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. In: ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. (Ed.). **Cultivo de tejidos em la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Colombia: CIAT, p. 41-78, 1993.

KROGSTRUP, P.; FIND, J. I.; GURSKOV, D. J.; KRISTENSEN, M. M. H. Micropropagation of socotran fig, *Dorstenia gigas* Schweinf. Ex Balf. F.- a threatened species, endemic to the Island of Socotra, Yemen. . **In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, New York, v. 41, p. 81-86, 2005.

LATA, A. H. *In vitro* conservation of tropical plant germoplasma, a review. **Euphytica, Netherlands journal of plant breeding**, Mississipi. v. 57, p. 227 - 243, 1991.

LATA, H.; MORAES, R. M.; BERTONI, B.; PEREIRA, A. M. S. *In vitro* germoplasm conservation of *Podophyllum peltatum* L. under slow growth conditions. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/t115586016k70121/>>. Acesso em: 23 dez. 2009.

LÉDO, A. da S.; CUNHA, A. O.; ARAGÃO, W. M.; TUPINAMBÁ, E. A. Efeito da sacarose e do manitol na conservação *in vitro* por crescimento lento de coqueiro anão. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 19, n. 4, p. 346-351, 2007.

LÉDO, A. da S.; GOMES, K. K. P.; BARBOZA, S. B. S. C.; VIEIRA, G. S. S.; TUPINAMBÁ, E. A.; ARAGÃO, W. M. de. Cultivo *in vitro* de embriões zigóticos e aclimatação de plântulas de coqueiro-anão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 2, p. 147-154, 2007.

LEITE, D. L.; PETERS, J. A.; NAKASU, B. H. Efeito de solidificantes sobre a multiplicação e crescimento de gemas de pereira. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v. 5, n. 1, p. 47-49, 1993.

LEMO, E. E. P. de; FERREIRA, M. de S.; ALENCAR, L. M. C. de; RAMALHO NETO, C. E.; ALBUQUERQUE, M. M. de. Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 10, p. 1359-1364, 2002.

LIMA NETO, M. C.; RIBEIRO, J. de S.; BEZERRA NETO, E. Enraizamento de estacas de bambu com uso de auxinas. **Revista Acadêmica Ciências Agrárias e Ambientais, Curitiba**, v. 7, n. 2, p. 175-179, 2009.

LIMA, D. P. de; CASTRO, M. S. de A.; MELLO, J. C. P. de.; SIQUEIRA, J. M.; KASSAB, N. M. A flavanone glycoside from *Cochlospermum regium*. **Fitoterapia**, Milano, v. 66, n. 6, p.545-546, 1 jan. 1996.

LIMA, L. L. de. **Detecção da atividade mutagênica e anti-mutagênica do *Cochlospermum regium* (algodãozinho do campo) pelo teste Ames**. 2002. 79 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia, Universidade Salgado de Oliveira, Goiânia, 2002.

LIMA, R. V.; LOPES, J. C.; SCHMILDT, E. R.; MAIA, A. R. Germinação *in vitro* de urucu. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 29, n. 1, p. 171-177, 2007.

LI, J. W-H.; VEDERAS, J. C. Drug discovery and natural products: end of an Era or an endless frontier? **Science**, Washington, v. 325, p.161-165, 2009.

MACCHERONI Jr, W.; ARAUJO, W. L.; AZEVEDO, J. L.; Secreção de enzimas mediada pelo pH do ambiente em isolados patogênicos e endofíticos do fungo *Colletotrichum*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 61, n. 3, p. 298-302, 2004.

MACIEL, S. C.; VOLTOLINI, J. A.; PEDROTTI, E. L. Enraizamento *ex vitro* e aclimatização do porta-enxerto de macieira Marubakaido micropropagado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24 n. 2, p. 289-292, 2002.

MAIA, J. T. L. S.; MARTINS, E. R.; CASALI, V. W. D.; BARBOSA, L. C. A. Variação na composição do óleo essencial de acessos de *Ocimum selloi* Benth. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 1089-1091, 2007.

MALOSSO, M. G.; BARBOSA, E. P.; NAGAO, E. O. Micropropagação de jambu [*Acmella oleraceae* (L.) R.K. Jansen]. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 10, n. 3, p. 91-95, 2008.

MALOSSO, M. G.; BERTONI, B. W.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, A. M. S. Conservação *in vitro* de *Jacaranda decurrens* em banco de germoplasma. In: VI Jornada Paulista de Plantas Mediciniais, São Pedro. **Anais...São Pedro**. 2003.

- MANTOVANI, N.; GRANDO, M. F.; OTONI, W. C.; GRISON, T. P. Padrões de desenvolvimento de gemas caulinares *in vitro* x *in vivo* de *Ginkgo biloba* L. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 594-596, 2007.
- MARCO, C. A.; INNECCO, R.; MATTOS, S. H.; BORGES, N. S. S.; NAGAO, E. O. Características do óleo essencial de capim-citronela em função de espaçamento, altura e época de corte. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 3, p. 429-432, 2007.
- MENDES, C. L.; ARAÚJO, A. A. de; SENA, K. X. da F. R. de; CHIAPPETA, A. de A. Prevalência de *Candida* sp. em infecções vaginais, **NewsLab**, São Paulo, v. 68, p. 104-112, 2005. Disponível em: <http://www.newslab.com.br/newslab/ed_anteriores/68/art01.pdf>. Acesso em: 13 mar. 2010.
- MENDES, G. C.; SOARES, C. Q. G.; BRAGA, V. F.; PINTO, L. C.; SANTANA, R.; VIVVINI, L. F.; PEIXOTO, P. H. P. Enraizamento *in vitro* de *Vriesea cacuminis* L. B. Smith (Bromeliaceae) do Parque Estadual do Ibitipoca, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 969-971, 2007.
- MENDONÇA, A. B. de.; AMANCIO, V. F.; ARRIGONI-BLANK, M. de F.; LEDO, A. da S.; BLANK, A. F.; CARVALHO FILHO, J. L. S. de. PAULA, J. W. de.; INNECCO, R. Influência de Concentrações de Meio MS, Ácido Ascórbico e BAP na Micropropagação de Alecrim-Pimenta (*Lippia Sidoides* Cham.). In: Congresso Brasileiro de Olericultura, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: ABH, 2004. Disponível em: <http://www.abhorticultura.com.br/biblioteca/arquivos/Download/Biblioteca/44_024.pdf>. Acesso em: 08 dez. 2009.
- MISSOURI BOTANICAL GARDEN, Saint Louis. *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilg. - **Taxonomy Browser**. Disponível em: <<http://www.tropicos.org/Name/8000024>>. Acesso em: 02 dez. 2009.
- MOK, M. C.; MARTIN, R. C.; MOK, D. W. S. Cytokinins: biosynthesis, metabolism and perception. **In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, New York, v. 36, n. 2, p. 102-107, 2000.
- MORAES, R. M.; CALDAS, L. S.; SILVEIRA, C. E. dos S.; SOUZA, A. V.; BERTONI, B. W.; PEREIRA, A. M. S. Micropropagação e Banco de Germoplasma *in vitro* para produção e conservação de plantas nativas do Cerrado. In: PEREIRA, A. M. S. **Recursos genéticos e conservação de plantas medicinais do Cerrado**. Ribeirão Preto: Legis Summa, p. 185-211, 2007.

MOREIRA, A. C. P.; LIMA, E. de O.; WANDERLEY, P. A.; CARMO, E. S.; SOUZA, E. L. de. Chemical composition and antifungal activity of *Hyptis suaveolens* (L.) poit leaves essential oil against *Aspergillus* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 41, n. 1, p. 28-33, 2010.

MOREIRA, B. M. T.; TOMBA, E. C.; ZONETTI, P. da C. Crescimento *in vitro* de plântulas de orquídea (*Laelia purpurata* Lindl var *venosa* X *Cattleya warneri* T. Moore Alba) sob diferentes concentrações de sacarose e frutose. **Revista Saúde e Biologia**, Campo Mourão, v. 2, n. 2, p. 16-21, 2007.

MOREIRA, D. L.; GUARIM-NETO, G. Usos múltiplos de plantas do Cerrado: um estudo etnobotânico na comunidade sítio Pindura, Rosário Oeste, Mato Grosso, Brasil. **Polibotânica**, Colonia Santo Tomás, n. 27, p. 159-190, 2009.

MORENO, V.; ROIG, L. A. Somaclonal variation in Curcubits. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry. Somaclonal variation in crop improvement I**. Berlin: Springer-Verlag Heidelberg, v. 2, p. 435-464, 1990.

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

NAKAGAWA, J.; CAVARIANI, C. Efeito do tamanho na germinação de sementes de mucuna-preta. **Científica**, Jaboticabal, v. 28, n. 6, 2005.

NASCIMENTO, D. C.; PORTELA, I. P.; COSTA, L. C.; MOREIRA, R. M.; Aclimação de mudas de crisântemo (*Dedranthema grandiflora*) 'Rage' micropropagadas em diferentes substratos. In: XI ENPOS, Pelotas. **Anais...Pelotas:UFPEL**, 2009. Disponível em: <http://www.ufpel.tche.br/cic/2009/cd/pdf/CA/CA_00493.pdf>. Acesso em: 26 nov. 2009.

NASCIMENTO, P. K. V. do; FRANCO, E. T. H.; FRASSETTO, E. G. Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de *Parapitadenia rigida* Bentham (Brenam). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 141-143, 2007.

NERGARD, C. S.; DIALLO, D.; INNGJERDINGEN, K.; MICHAELSEN, T. E.; MATSUMOTO, T.; KIYOHARA, H.; YAMADA, H.; PAULSEN, B. S. Medicinal use of *Cochlospermum tinctorium* in Mali Anti-ulcer, radical scavenging- and immunomodulating activities of polymers in the aqueous extract of the roots. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 96, p. 255-269, 2005.

NERY, M. C.; CARVALHO, M. L. M. de; OLIVEIRA, L. M. de; NERY, F. C.; SILVA, D. G. Germinação *in vitro* e *ex vitro* de embriões/sementes de *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nich. **Cerne**, Lavras, v. 14, n. 1, p. 1-8, 2008.

NETO, C. P. C. T.; HERNANDEZ, F. F. F.; BEZERRA, F. C.; SOUSA, R. F. de.; CAVALCANTI, M; L; F. Efeito da concentração salina da solução nutritiva na aclimatação de plantas micropropagadas de Violeta Africana (*Saintpaulia ionantha* Wendl). **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, João Pessoa, v. 4, n. 2, p. 1-8, 2004.

NICIOLI, P. M.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R. C.; SANTANA, J. R. F. de; SILVA, L. C.; SILVA, D. P. C. da; PORTO, J. M. P. Ajuste do processo de micropropagação de barbatimão. **Ciência rural**, Santa Maria, v. 38, n. 3, p. 685-689, 2008.

NICOLOSO, F. T.; ERIG, A. C.; RUSSOWSKI, D.; MARTINS, C. F. Efeito de doses e fontes de carboidratos no crescimento de plantas de ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] cultivadas *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 1, p. 84-90, 2003.

NIETSCHE, S.; GONÇALVES, V. D.; PEREIRA, M. C. T.; SANTOS, F. A.; ABREU, S. C. de.; MOTA, W. F. da. Tamanho da semente e substratos na germinação e crescimento inicial de mudas de cagaiteira. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 6, p.1321-1325, 2005.

NIETSCHE, S.; MARQUES, S. V.; PEREIRA, M. C. T.; SALLES, B.; XAVIER, A. A.; FRANÇA, A. C.; LIMA, C. DE; SILVA, L. S. Estabelecimento *in vitro* de explantes de três cultivares de bananeira. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 3, 2006.

NUNES, G. P.; SILVA, M. F.; REZENDE, U. M. Plantas medicinais comercializadas por raizeiros no Centro de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 13, n. 2, p.83-92, 2003.

NUNES, W. B.; CARVALHO, S. de. Evaluation of the potencial of *Cochlospermum regium* in *Drosophila melanogaster* male germ cells. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 26, n. 4, p.545-549, 2003.

OLIVEIRA, C. C. de; SIQUEIRA, J. M. de; SOUZA, K. C. B. de.; REZENDE, U. M. Antibacterial activity of rhizomes from *Cochlospermum regium*: preliminary results. **Fitoterapia**, Milano, v. 67, n. 2, p.176-177, 1996.

- OLIVEIRA, I. V. de M. Influência do tamanho-peso da semente na precocidade de emergência de bacuripari (*Rheedia gardneriana*). **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 19, n. 4, p.387-390, 2006.
- OLMOS, E.; HELLÍN, E. Ultrastructural differences of hyperhydric and normal leaves from regenerated carnation plants. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 75, p. 91-101, 1998.
- ORTIZ-ANDRADE, R.; TORRES-PIEDRA, M.; SÁNCHEZ-SALGADO, J. C.; GARCÍA-JIMENEZ, S.; VILLALOBOS-MOLINA, R.; IBARRA-BARAJAS, M.; GALLARDO-ORTIZ, I.; ESTRADA-SOTO, S. Acute and sub-chronic effects of *Cochlospermum vitifolium* in blood glucose levels in normoglycemic and stz nicotinamide-induced diabetic rats. **Revista Latinoamericana de Química**, Naucalpan de Juárez, v. 37, n. 2, 2009.
- OUATTARA, L.; KOUDOU, J.; OBAME, L. C. E.; KAROU, D. S.; TRAORE, A.; BESSIÈRE, J. M. Chemical composition and antibacterial activity of *Cochlospermum planchonii* Hook.f.ex Planch essential oil from burkina faso. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Lasani Town, v, 10, n. 22, p. 4177-4179, 2007.
- PAIVA, A. M. S.; ALOUFA, M. A. I. Estabelecimento *in vitro* de aroeira da praia (*Schinus terebinthifolius* Raddi) em diferentes concentrações de 6 benzilaminopurina (BAP). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 11, n. 3, p. 300-304, 2009.
- PEDROTTI, E. L.; VOLTOLINI, J. A. Enraizamento *ex vitro* e aclimatização do porta-enxerto de macieira M.9. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 234-239, 2001.
- PEREIRA, J. E. S.; MATTOS, M. L. T.; FORTES, G. L. R. Identificação e controle com antibióticos de bactérias endofíticas contaminantes em explantes de batata micropropagados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, p.827-834, 2003.
- PINHEIRO, E. S.; GILBERT, B.; MACDO, M. F.; SIANI, A. C.; SACRAMENTO, R.; SAFALTE, L. **Identificação de oportunidades de investimentos no setor de fármacos: lista tentativa de farmoquímicos e intridução à eleição de uma política para fitoterápicos e fitofármacos**: Espécies para extrativismo e manejo sustentável (2005). Disponível em: <<http://www.eclac.org/publicaciones/xml/6/22306/LCBRSR153FarmacosEloanGilbert.pdf>>. Acesso em: 01/12/09.

POPPENDIECK, H. H. **Flora Neotropica Monograph**, 1981. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/4393745?&Search=yes&term=cochlospermum&term=flora&term=neotropica&term=regium&list=hide&searchUri=%2Faction%2FdoBasicSearch%3FQuery%3Dflora%2Bneotropica%2Bcochlospermum%2Bregium%26wc%3Don%26x%3D8%26y%3D7&item=1&ttl=4&returnArticleService=showArticle>>. Acesso em: 20 jul. 2009.

PORTELA, I. P.; COSTA, L. C.; NASCIMENTO, D. C.; MOREIRA, R. M.; VELEDA, F. B. Aclimação de mudas de morangueiro (*Fragaria x Ananassa* duch.) cv. Oso grande provenientes da micropropagação *in vitro* em diferentes concentrações de benzilaminopurina (BAP) e substratos. In: XI ENPOS, Pelotas. **Anais...Pelotas:UFPEL**, 2009. Disponível em: <http://www.ufpel.tche.br/cic/2009/cd/pdf/CA/CA_00600.pdf>. Acesso em: 26 nov. 2009.

POTZERNHEIM, M. C. L.; BIZZO, H. R.; VIEIRA, R. F. Análise dos óleos essenciais de três espécies de *Piper* coletadas na região do Distrito Federal (Cerrado) e comparação com óleos de plantas procedentes da região de Paraty, RJ (Mata Atlântica). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 16, n. 2, p. 246-251, 2006.

PRESBER, W.; HEGENSCHIED, B.; HERNANDEZ-ALVAREZ, H.; HERMANN, D.; BRENDDEL, C. Inhibition of the growth of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium berghei* *in vitro* by an extract of *Cochlospermum angolense* (Welw.). **Acta Tropica**, Basel, v. 50, n. 4, p. 331-338, 1992.

RADMANN, E. B.; BIANCHI, V. J.; OLIVEIRA, R. P de; FACHINELLO, J. C. Multiplicação *in vitro* e alongamento das brotações micropropagadas do porta-enxerto 'Tsukuba 1' (*Prunus persica* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 3, p. 656-663, 2009.

RADMANN, E. B.; BRAGA, E. J. B.; KARAN, M. A. L.; POSADA, M. A. C.; PETERS, J. A. Influência da densidade de fluxo luminoso na qualidade de plantas micropropagadas de *Gypsophila paniculata* L. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 7, n. 3, p. 171-175, 2001.

RANGSAYATORN, N.; JINA, K.; PAMPASIT, S. Slow growth *in vitro* conservation of *Dendrobium draconis* Rchb. F.: effect of black kwao krua (*Mucuna colletti* Lace). **Acta Horticulturae**, v. 829, p. 355-358, 2009. Disponível em: <http://www.actahort.org/books/829/829_56.htm>. Acesso em: 24 dez. 2009.

REGO-OLIVEIRA, L. do; FARIA, R. T. de; FONSECA, I. C. de B.; SACONATO, C. Influência da fonte e concentração de carboidrato no crescimento vegetativo e enraizamento *in*

vitro de *Oncidium varicosum* Lindl. (Orchidaceae). **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, n. 2, p. 265-272, 2003.

RIBEIRO, M. de F.; DONINI, L. P.; SOUZA, J. A. de.; GUISSO, A. P.; FERREIRA-MOURA, I.; BOBROWSKI, V. L.; VIÉGAS, J. Influência de diferentes concentrações de sais de MS e açúcares no cultivo *in vitro* de manjeriço roxo (*Ocimum basilicum* L.). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 57-59, 2009.

RIBEIRO, M. de N. O.; PASQUAL, M.; VILLA, F.; PIO, L. A. S.; HILHORST, W. M. *In vitro* seed germination and seedling development of *Annona crassiflora* Mart. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 66, n. 3, p. 410-413, 2009.

RIBEIRO, M. V.; LIMA, C. S. M.; BANDEIRA, J. de M.; RUBIN, S.; BENITEZ, L. C.; PETER, J. A.; BRAGA, E. J. B. Concentrações de Sacarose e Tipos de Vedação no Cultivo *in vitro* de *Melissa officinalis* L. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p.843-845, 2007.

RICCO, R. A.; SENA, G. A.; VAI, V. M.; WAGNER, M. L.; GURNI, A. A. **Taninos Condensados de *Ephedra Chilensis* K. Presl (=E. Andina Poepp. Ex May.) -Ephedraceae**. 2002. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.

RITSCHER, P. S.; LOPES, C. A.; FERREIRA, M. E.; FRANÇA, F. H.; MENÊZES, J. E.; TEIXEIRA, D. M. C.; TORRES, A. C.; CHARCHAR, J. M.; THOMAZELLI, L. **Organização do banco ativo de germoplasma de batata-doce: situação atual e perspectivas**. Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste Brasileiro. Disponível em: <<http://www.cpatas.embrapa.br:8080/catalogo/livrorg/batata doce.pdf>>. Acesso em: 16 out. 2009.

RITTO, J. L. A. **Caracterização farmacognóstica da droga e do extrato fluido de algodãozinho-do-campo, a *Cochlospermum regium* (Mart & Schrank.) Pilger**. 1996. 112 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Fármaco e Medicamentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

ROCHA, P. S. G. da. **Propagação *in vitro* de porta-enxertos do gênero *Prunus* spp.** 2006. 101 f. Tese (Doutorado) - Curso de Agronomia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2006.

ROCHA, P. S. G. da.; SCHUCH, M. W.; BIANCHI, V. J.; MISTURA, C. C. Influência da localização da gema no ramo sobre o estabelecimento *in vitro* de porta-enxertos de *Prunus* spp. **Revista Brasileira de Agrociências**, Pelotas, v. 11, n. 4, p. 497-499, 2005.

ROCHA, P. S. G. da.; SCHUCH, M. W.; BIACHI, W. J.; FACHINELLO, J. C. Multiplicação e alongamento *in vitro* do porta-enxerto de *Prunus*. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 25, n. 1, p. 69-74, 2009.

RODRIGUES, E.; ASSIMAKOPOULOS, C. T.; CARLINI, E. L. A. Conhecimento tradicional e repartição de benefícios: o caso dos índios Krahô. In: Lin Chau et al (Eds). **Direitos de recursos tradicionais: formas de proteção e repartição de benefícios**. Botucatu: UNESP, PP. 115-146, 2005.

RODRIGUES, E.; CARLINI, E. A. Ritual of plants with possible action on the central nervous system by the Krahô Indians, Brazil. **Phytotherapy Research**, v. 19, p. 129-135, 2005.

RODRIGUES, I. C. da S.; RIBEIRO, M. V.; PEROTTI, J. C.; PETERS, J. A.; BRAGA, E. J. B. Multiplicação *in vitro* de *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze. In: XI ENPOS, Pelotas. **Anais...** Pelotas: UFPEL, 2009. Disponível em: <http://www.ufpel.edu.br/cic/2009/cd/pdf/CB/CB_00953.pdf>. Acesso em: 28 out. 2009.

RODRIGUES, V. G.; CARDOSO, M. das G.; LIMA, R. K.; SOUZA, S. P. de.; LAGE, G. A.; MORAES, J. C.; MELO, B. A. Caracterização química e bioatividade do óleo essencial de *Thymus vulgaris* L. sobre *Spodoptera frugiperda*. In: 31ª reunião anual da sociedade brasileira de química. **Resumos...** 2008. Disponível em: <<http://sec.s bq.org.br/cdrom/31ra/resumos/T0865-1.pdf>>. Acesso em: 23 dez. 2009.

ROGALSKI, M.; GUERRA, M. P.; SILVA, A. L. Multiplicação *in vitro* da ameixeira 'Santa Rosa': efeito da citocinina BAP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 2, p. 365-367, 2003.

RUBIN, S.; LIMA, C. S. M.; BANDEIRA, J. de M.; RIBEIRO, M. V.; BENITZ, L. C.; PETERS, J. A.; BRAGA, E. J. B. Reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro* de *Thymus vulgaris* L. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 480-482, 2007.

RUTA, C.; PERRINI, R.; TAGARELLI, A.; MORONE FORTUNATO, I. Use of arbuscular mycorrhiza for acclimatization of micropropagated plantlets of melon, oregano, artichoke and

spanish broom. **Acta Horticulturae**, v. 812, p. 473-478, 2009. Disponível em: <http://www.actahort.org/books/812/812_68.htm>. Acesso em: 17 fev. 2010.

RUŽIĆ, D. J. V., LAZIĆ, T. I.; CEROVIĆ, R. M. Micropropagation of some *Prunus* and *Pyrus* genotypes *in vitro* as affected by different carbon sources. **Acta Horticulturae**, v. 795, p. 413-418, 2008. Disponível em: <http://www.actahort.org/books/795/795_62.htm>. Acesso em: 24 dez. 2009.

SABÁ, R. T.; LAMEIRA, O. A.; LUZ, J. M. Q.; GOMES, A. P.; INNECCO, R. Micropropagação do jaborandi. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 1, p. 106-109, 2002.

SAHER, S.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, N.; PIQUERAS, A.; HELLÍN, E.; OLMOS, E. Reducing properties, energy efficiency and carbohydrate metabolism in hyperhydric and normal carnation shoots cultured *in vitro*: a hypoxia stress? **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 43, n. 6, p. 573-582, 2005.

SALES, D. M. **Germinação de sementes de algodão do campo (*Cochlospermum regium* (MART. e SCHR.) PILG.) - cochlospermaceae em função de ácido sulfúrico, substrato, luz e temperatura**. 2001. 64 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agricultura Tropical, Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá, 2001.

SALES, D. M.; COELHO, M. F. B.; ALBUQUERQUE, M. C. F.; FERRONATO, A. Superação da dormência por ácido sulfúrico em sementes de algodão do campo [*Cochlospermum regium* (Mart. & Schr.) Pilg.] - Cochlospermaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 4, n. 2, p.65-71, 2002.

SALGADO-SÁNCHEZ, J. C.; ORTIZ-ANDRADE, R. R.; AGUIRRE-CRESPO, F.; VERGARA-GALICIA, J.; LEÓN-RIVERA, I.; MONTES, S.; VILLALOBOS-MOLINA, R.; ESTRADA-SOTO, S. Hypoglycemic, vasorelaxant and hepatoprotective effects of *Cochlospermum vitifolium* (Willd.) Sprengel: a potential agent for the treatment of metabolic syndrome. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 109, p. 400-405, 2007.

SAMARAH, N. H., QURASHI, S. A., KARAM, N. S.; SHIBLI, R. A. *In vivo* and *in vitro* seed germination in black iris: a potential new floricultural crop from Jordan. **Acta Horticulturae**, v. 813, p.113-120, 2009. Disponível em: <http://www.actahort.org/books/813/813_14.htm>. Acesso em: 30 dez. 2009.

SANGALLI, A.; VIEIRA, M. C.; HEREDIA, N. A. Z. Levantamento e caracterização de plantas nativas com propriedades medicinais em fragmentos florestais e de Cerrado de

Dourados – MS, numa visão etnobotânica. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 569, p. 163-174, 2002.

SANTANA, J. R. F. de.; PAIVA, R.; PEREIRA, F. D.; OLIVEIRA, L. M. de. Estímulo do comportamento fotoautotrófico durante o enraizamento *in vitro* de *Annona glabra* L., I. Desenvolvimento do sistema radicular e da parte aérea. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 1, p. 80-86, 2008.

SANTOS, A. S. A.; MACHADO I. S.; LEÃO, A. L.; RAMOS, A. A. Concentrações de BAP e TDZ na propagação *in vitro* de curauá (*Anana erectifolius* L. B. Smith): A Influência das Citocininas Sintéticas na Cultura de Tecido. **Biociência, Ciência e Desenvolvimento**, v. 35, p. 62-65, 2005.

SANTOS, B. R.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R. C.; OLIVEIRA, L. M. de.; SILVA, D. P. C. da.; MARTINOTTO, C.; SOARES, F. P.; PAIVA, P. D. O. de. Micropropagação de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 2, p.293-296, 2006.

SANTOS-SEREJO, J. A. dos.; JUNGHANS, T. G.; SOARES, T. L.; SILVA, K. M. da. Meios nutritivos para micropropagação de plantas. In: SOUZA, A. S. DA; JUNGHANS, T. G. **Introdução a micropropagação de plantas**. Cruz Das Almas: Embrapa, 2006.

SARASAN, V.; CRIPPS, R.; RAMSAY, M. M.; ATHERTON, C.; MCMICHEN, M.; PRENDERGAST, G.; ROWNTREE, J. Conservation *in vitro* of threatened plants progress in the past decade. **In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, New York, v. 42, p. 206-214, 2006.

SCHMILDT, E. R.; AMARAL, J. A. T. do; SCHMILDT, O.; COELHO, R. I.; RABELLO, W. S.; MARTINS FILHO, S. Resposta rizogênica *in vitro* de ápices caulinares de mamoeiro ‘Tainung 01’ em diferentes tempos de permanência em meios de indução e regeneração. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 31, n. 4, p. 695-700, 2009.

SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE DO DISTRITO FEDERAL – SES. **Rotinas em ginecologia e obstetrícia**, 2009. Disponível em: < <http://www.saude.df.gov.br/sites/100/163/00001045.pdf>>. Acesso em: 13 mar. 2010.

SERRANO GRACÍA, M.; PIÑOL SERRA, M T. **Biociencia vegetal**. Madrid: Editorial Sinteris, 285p., 1991.

SETHER, D. M.; KARASEV, A. V. OKUMURA, C.; ARAKAWA, C.; ZEE, F.; KISLAN, M. M.; BUSTO, J. L.; HU, J. S. Differentiation, distribution, and limination of two different pineapple mealybug wilt-associated viruses found in pineapple. **Plant disease**, Saint Paul, v. 85, n. 8, p. 856-861, 2001.

SEXTO, P. A. S.; GRANDO, M. F.; NIENOW, A. A.; NOLLA, D.; AUGUSTIN, L.; SUZIN, M. 2006. Resposta *in vitro* do cultivo de ápices caulinares de *Ginkgo biloba*. In: Congresso Brasileiro de Olericultura, Goiânia. **Anais...** Goiânia, Associação Brasileira de Horticultura, 2006. Disponível em: <http://www.abhorticultura.com.br/biblioteca/arquivos/Download/Biblioteca/46_0644.pdf>. Acesso em: 22 out. 2009.

SHAWKY, B.; ALY, U. I. *In vitro* conservation of globe artichoke (*Cynara scolymus* L.) germplasm. **International Journal of Agriculture & Biology**, v. 9, n. 3, p. 404-407, 2007.

SILVA, A. B.; PASQUAL, M.; MACIEL, A. L. R.; MOREIRA, M. A.; DUTRA, L. F. Influência da Benzilaminopurina e do Benomyl na proliferação *in vitro* de abacaxizeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 6, p. 1190-1196, 2002.

SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *in vitro*. **Symposium of the Society for Experimental Biology**, Cambridge, v. 11, p. 118-131, 1957.

SOUZA, C. D. de.; FELFILI, J. M. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 20, n. 1, p. 135-142, 2006.

SOUZA, C. M. de.; PINTO, J. E. B. P.; RODRIGUES, B. M.; MORAIS, A. R. de.; ARRIGONO-BLANKS, M. F. de. Influência dos fatores físicos na regeneração de brotos em repolho. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 23, n. 4, p.830-835, 1999.

SOUZA, F. V. D. **Transformación genética em melón (*Cucumis melo* L.) y tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) com los genes *chit 42* y *bgn 16.2* para la obtención de plantas resistentes a enfermedades fúngicas**. 179 f. Tese (Doutorado em Biología Celular) – Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Universidad Politécnica de Valencia, España, 2001.

SOUZA, F. V. D.; JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. S. da.; SANTOS-SEREJO, J. A. dos.; COSTA, M. A. P. de C. Micropropagação. In: SOUZA, A. S. da.; JUNGHANS, T. G.

Introdução a micropropagação de plantas. Cruz Das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 152p., 2006.

SOUZA, J. A. de.; DONINI, L. P.; SILVA, L. C. da.; CORRÊA, M. G. S.; SCHUCH, M. W. Enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de macieira – M9 em função da vedação, sacarose e material de suporte no meio de cultura. **Scientia Agraria**, v. 8, n. 2, p.161-164, 2007.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação de famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II.** 2 ed., Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008.

STEIN, V. C.; BOBROWSKI, V. L.; VARGAS, D. P.; HEIDEN G.; IGANC, J. R. V. Efeito do genótipo na propagação *in vitro* de *Plantago* sp. **Revista Verde**, Mossoró, v. 4, n. 2, p. 68 – 75, 2009.

STONE, J. K.; BACON, C. W.; WHITE Jr, J. F. An overview of endophytic microbes: endophytism defined. In: BACON, C. W.; WHITE Jr, J. F. **Microbial endophytes.** New York: Marcel Dekker, p. 3-29, 2000.

TAPINGKAE, T.; KRISTIANSEN, P.; TAJI, A. Influence of carbohydrate source on the *in vitro* flowering of sturt's desert pea (*Swainsona formosa*). **Acta Horticulturae**, v. 829, p. 225-230, 2009. Disponível em: <http://www.actahort.org/books/829/829_32.htm>. Acesso em: 25 dez. 2009.

TEIXEIRA, J. B. **Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas.** Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, 2005. Disponível em: <http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc_2001/simposios/S-06/Joao%20Batista%20Teixeira/Palestra%20%20Jo%20E3o%20Batista%20Teixeira.pdf>. Acesso em: 12 ago. 2009.

THOBUNLUEPOP, P.; JATISATIENR, C.; PAWELZIK, E.; VEARASILP, S. *In vitro* screening of the antifungal activity of plant extracts as fungicides against rice seed borne fungi. **Acta Horticulturae**, v. 837, p. 223-228, 2009. Disponível em: <http://www.actahort.org/books/837/837_29.htm>. Acesso em: 19 fev. 2010.

THOMPSON, M. R.; DOUGLAS, T. J.; OBATA-SASAMOTO, H.; THORPE, T. A. Mannitol metabolism in cultured plant cells. **Physiology plant**, v. 67, p. 365-369, 1986.

TIJANI, M. B.; BELLO, I. A.; ALIYU, A. B.; OLURISHE, T.; MAIDAWA, S. M.; HABILA, J. D.; BALOGUN, E. O.; Phytochemical and antibacterial studies of root extract of *Cochlospermum tinctorium* A. Rich. (Cochlospermaceae). **Research Journal of Medicinal Plant**, CIDADE, v, 3, n. 1, p. 16-22, 2009.

TOWILL, L. E. Germoplasm preservation. In: TRIGIANO, R. N. and GRAY, D. J.: **Plant tissue culture concepts and laboratory exercises**. 2^a Ed, CRC Press, Boca Raton, p. 337-353, 2000.

TRAORÉ, M.; GUIGUEMDÉ, A.; YAGO, I.; NIKIÈMA, J. B.; TINTO, H.; DAKUYO, Z. P.; OUÉDRAOGO, J. B.; GUISSOU, I. P.; GUIGUEMDÉ, T. R. Investigation of antiplasmodial compounds from two plants, *Cochlospermum tinctorium* A. Rich and *Gardenia sokotensis* Hutch. **African Journal Traditional, Complementary and Alternative medicines**, Lagere, v. 3, n. 4, p. 34-41, 2006.

TRESVENZOL, L. M.; PAULA, J. R.; RICARDO, A .F. FERREIRA, H. D.; ZATTA, D. T. Estudo sobre o comércio informal de plantas medicinais em Goiânia e cidades vizinhas. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 1, p.23-28, 2006.

VICENTE, M. A. A.; ALMEIDA, W. A. B.; CARVALHO, Z. S. Multiplicação *in vitro* e aclimação de *Vernonia condensata* Baker. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 11, n. 2, p.176-183, 2009.

VILLA, F.; PASQUAL, M.; PIO, L. A. S.; ASSIS, F. A.; TEODORO, G. S. Influência do carvão ativado e BAP na multiplicação *in vitro* de duas frutíferas de clima temperado. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 312, n. 54, p. 118-124, 2007.

VILLALOBOS, V. M.; ENGELMANN, F.: *Ex situ* conservation of plant germoplasm using biotechnology. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. v. 11, p. 375 - 382, 1995.

VIU, A. F. M.; COSTA, E. A. da; VIU, M. A. de O.; CAMPOS, L. Z. de O.; SANTOS, S. C. Germinação e desenvolvimento de plântulas de [*Cochlospermum regium* (Schrank) Pilger] - (algodão-do-campo) em diferentes substratos. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p.957-959, 12 dez. 2007.

VONTHRON-SÉNÉCHEAU, C.; WENIGER, B.; OUATTARA, M.; BI, F. T.; KAMENAN, A.; LOBSTEIN, A.; BRUN, R.; ANTON, R. *In vitro* antiplasmodial activity and cytotoxicity

of ethnobotanically selected Ivorian plants. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 87, p. 221-225, 2003.

VULPI, T. S.; MORAIS, C. P. M.; TRINDADE, A. P. F.; LIMA, M. C. H. P.; VELOZO, S. M.; KAPLAN, M. A. C. Análise do óleo essencial dos diferentes órgãos de *Acmella ciliata* Kunth (Asteraceae). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 1128-1130, 2007.

WERNER, E. T.; PESSOTTI, K. V.; LOPES, F. P.; CUZZUOL, G. R. F. Indução da Calogênese de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) *in vitro*. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p.1053-1055, 2007.

WITHERS, L. A. *In-vitro* conservation. **Biological Journal of the Linnecun Society**, London, v. 43, n. 3, p. 1-42, 1991.

WU, C. K. **Formação de Mudas e Microtubérculos de Batata (*Solanum tuberosum* L.) em Sistemas Biorreatores**. 2007. 95 f. Dissertação (Mestre) - Curso de Agricultura Tropical e Subtropical, Instituto Agronômico, Campinas, 2007.

ZIGIOTTO, D. C. **Compostos fenólicos e atividade antioxidante em plantas *Salvia officinalis* (L) micropropagadas**. 2007. 54 f. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2007.