

**PROPAGAÇÃO *IN VITRO* E IDENTIFICAÇÃO
DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM
CHAPÉU DE COURO (*Echinodorus cf scaber*
RATAJ), UMA PLANTA MEDICINAL**

FLÁVIA DIONÍSIO PEREIRA



UNIVERSITY OF CALIFORNIA
LIBRARY
DIVERSITY
UNIVERSITY OF CALIFORNIA
LIBRARY

FLÁVIA DIONISÍO PEREIRA

**PROPAGAÇÃO *IN VITRO* E IDENTIFICAÇÃO DE
METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM CHAPÉU DE
COURO (*Echinodorus cf scaber* RATAJ), UMA PLANTA
MEDICINAL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de "Mestre".

Orientadora
Prof.^a Dr.^a Maria das Graças Cardoso

LAVRAS
MINAS GERAIS -- Brasil

**Ficha Catalográfica preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Pereira, Flávia Dionísio

Propagação *In Vitro* e identificação de metabólitos secundários em chapéu de couro (*Echinodorus cf scaber* Rataj), uma planta medicinal / Flávia Dionísio Pereira. -- Lavras : UFLA, 1999.

112 p. : il.

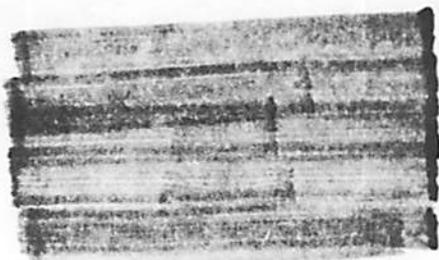
Orientadora: Maria das Graças Cardoso.

Dissertação (Mestrado) - UFLA.

Bibliografia.

1. Planta medicinal. 2. Cultura de tecido. 3. Fitoquímica. 4. Chapéu de couro. 5. *Echinodorus cf scaber* Rataj. 6. Regulador de crescimento. 7. BAP. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-633.884721



FLÁVIA DIONISÍO PEREIRA

**PROPAGAÇÃO *IN VITRO* E IDENTIFICAÇÃO DE
METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM CHAPÉU DE
COURO (*Echinodorus cf scaber* RATAJ), UMA PLANTA
MEDICINAL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de “Mestre”.

Aprovada em 19 de março de 1999

Prof. PhD José Eduardo Brasil Pereira Pinto **UFLA**

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva **UFLA**

Maria das Graças Cardoso
Prof.ª Dr.ª Maria das Graças Cardoso
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS – Brasil
1999

Aos meus pais, José Maria Pereira e Eva Dionísio do Carmo Pereira

OFEREÇO

A minha Vóinha, Cecília Penido

DEDICO

O rio atinge os seus objetivos porque aprendeu contornar obstáculos.

(André Luiz)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a “Deus Pai” pela dádiva de uma vida feliz e cheia de realizações.

A meus Pais e familiares, que sempre me incentivaram com muito amor e compreensão.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

À minha orientadora Professora, Maria das Graças Cardoso, que pacientemente me dedicou sua atenção e dispôs seu tempo sempre que necessário, e a quem eu devo o aprimoramento de meus conhecimentos.

Ao meu grande amigo e mestre, Professor José Eduardo Brasil Pereira Pinto, pelo exemplo de vida e pela oportunidade de chegar até aqui.

Aos professores Luciano Vilela Paiva e Custódio Donizete dos Santos, pela sugestões apresentadas na defesa da dissertação.

Ao professor David Lee Nelson, da UFMG, pelas sugestões apresentadas na defesa da dissertação.

A todos os professores do setor de Fisiologia Vegetal, que enriqueceram o meu saber.

Aos meus companheiros de pesquisa, Andréa Yu Kwan Villar Shan, José Fábio Camolesi e Camila Beggiato Corrêa, que, com sua valiosa ajuda, se fizeram prontos para mais uma descoberta científica.

Aos professores Evarito Mauro de Castro, Manuel Losada Gavilanes, Daniel Melo de Castro, Carlos Alberto Silva Ledo, pela ajuda científica.

Às minhas queridas colegas de curso: Ana Gabriela (GABY), Ester Solange (SOL), Flávia Landa (LAMBIDA). “A união faz a força”.

Ao amigo Edson José Artiaga de Santiago, por seu companheirismo nas horas de dificuldade.

Aos companheiros do laboratório de Química, Luciano, Rozane, Suzan, Juliano, Frederico, Ana Paula, Ellen, Valéria, Cleusa, Sr. Pedro.

Aos companheiros do laboratório de Cultura de Tecidos, Evaldo, Vantuil, Josiley, Osmar, Valéria, Heráclito, Berildo, Ilka, Janaina, Gabriela, Clara, Juliana, Regina, Iraci, Marvin, Laura, Isabela, Neuza, Vicentina, Luizinho.

Aos funcionários do Departamento de Biologia, Química e Agricultura da Universidade Federal de Lavras.

Aos meus queridos amigos dos bons e maus momentos: Érica, Helen, Regiane, Tatiana, Guilherme, Aldenir, Kika, Gustavo, Fabiano, Fabiana, Fernanda.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1 Objetivos.....	4
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	5
2.1 Aspectos relacionados a caracterização botânica da espécie em estudo.....	5
2.2 Micropropagação.....	7
2.3 Meios nutritivos e reguladores de crescimento.....	9
2.3.1 Citocininas.....	11
2.4 Metabolismo secundário.....	13
2.5 Análise e determinação fitoquímica.....	15
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	18
4 CAPÍTULO I.....	24
Propagação <i>in vitro</i> de <i>Echinodorus cf scaber</i> Rataj.....	24
Resumo.....	24
Abstract.....	25
4.1 Introdução.....	26
4.2 Material e Métodos.....	28
4.3 Resultado e Discussão.....	29
4.4 Conclusões.....	37
4.5 Referências Bibliográficas.....	38
5 CAPÍTULO II.....	41
Efeito do regulador de crescimento na anatomia de folhas micropropagadas de <i>Echinodorus cf scaber</i> Rataj.....	41
Resumo.....	41
Abstract.....	42
5.1 Introdução.....	43
5.2 Material e Métodos.....	45
5.3 Resultado e Discussão.....	47
5.4 Conclusões.....	59
5.5 Referências Bibliográficas.....	60

6 CAPÍTULO III.....	62
Metodologia de Extração, Isolamento e identificação dos constituintes químicos em plantas de <i>Echinodorus cf scaber</i> <i>Rataj</i>.....	62
Resumo.....	62
Abstract.....	64
6.1 Introdução.....	66
6.2 Material e Métodos.....	69
6.3 Resultado e Discussão.....	74
6.4 Conclusões.....	86
6.5 Referências Bibliográficas.....	88
7 CAPÍTULO IV.....	90
Identificação da composição Química do óleo essencial de <i>Echinodorus cf scaber</i> Rataj.....	90
Resumo.....	90
Abstract.....	91
7.1 Introdução.....	92
7.2 Material e Métodos.....	94
7.3 Resultado e Discussão.....	95
7.4 Conclusões.....	103
7.5 Referências Bibliográficas.....	104
ANEXOS.....	105

RESUMO

PEREIRA, Flávia Dionísio. Propagação *in vitro* e identificação do princípio ativo em chapéu de couro (*Echinodorus cf scaber* Rataj), uma planta medicinal. Lavras: UFLA, 1998. 112p. (Dissertação em Agronomia, área de Fisiologia Vegetal).*

A utilização de plantas que apresentam propriedades medicinais vem passando os tempos desde os primórdios da civilização humana e a aplicação empírica adveio de sucessivas observações que compõem a vasta medicina popular. Alterações no seu uso ocorreram com o passar dos tempos, mas a matéria-prima continuou sendo a mesma: os vegetais. O uso de plantas consideradas medicinais é bastante difundido no Brasil; estima-se que a metade das espécies nativas apresentem alguma propriedade medicinal, mas poucas foram estudadas adequadamente. Neste trabalho foram aplicadas técnicas *in vitro* constatando a influência de regulador de crescimento, sua atuação na célula e a identificação de algumas moléculas que conferem o princípio ativo da espécie *Echinodorus cf scaber* Rataj. Não existem relatos na literatura sobre estudos de tais aspectos nesta espécie. Os resultados indicam que segmentos nodais são a fonte de explante mais eficiente para estabelecer a planta *in vitro* sob o meio MS (Murashige e Skoog, 1962). Este, suplementado com $1,0\text{mg.L}^{-1}$ de BAP (6 benzil amino purina) mostrou eficiência na multiplicação nodal. Houve influência significativa no tipo de explante utilizado e na formação celular das mesmas. Os resultados em substâncias isoladas demonstram a presença de um éster conjugado que foi caracterizado nas frações obtidas da extração do óleo essencial através do método de arraste a vapor. Derivados terpenóides com grupos carboxílicos foram identificados através do processo de extração por solventes imiscíveis de diferentes polaridades nos quais as amostras foram analisadas em CCD (cromatografia de camada delgada), fracionadas e purificadas em CLC (cromatografia líquida em coluna) e, posteriormente, identificadas através de dados espectrométricos IV (infravermelho) e EM/CG (espectro de massa acoplado em cromatógrafo gasosa).

*Orientadora: Maria das Graças Cardoso – UFLA, José Eduardo Brasil Pereira Pinto – UFLA (Co-orientador).

ABSTRACT

PEREIRA, FLÁVIA DIONÍSIO. *In vitro* Propagation and identification of secondary metabolites in leather hat (*Echinodorus cf scaber* Rataj), a medicinal plant. Lavras: UFLA, 1998. 112p. (Dissertation in Agronomy, major in Plant Physiology). *

The use of plants presenting medicinal properties has survived through the times since the dawn of human civilization; the empirical application has resulted from successive observations which make up the huge folk medicine. Changes in how to use them have occurred as time passes by but the raw material has continued being the same: plants. The use of plants regarded as medicinal is quite wide spread in Brazil; it is estimated that the half of the native species presents some medicinal property being that few were studied properly. In this work were applied *in vitro* techniques confirming the influence of growth regulator, its action at the cell level and identification of some molecules which provide the active principle of the of the species *Echinodorus cf scaber* Rataj. There are no reports in the literature of studies of this species under these respects. The results show that nodal segments are the most efficient explante source to establish an *in vitro* plant under Murashige and Skoog, 1962 medium. This one, supplemented with $1,0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ of BAP (6 benzyl amino purina) proved efficient in nodal multiplication. There was significant influence under the sort of explants used and cellular formation of them. The results of the isolated substances show the presence of a conjugated éster which was characterized in the fractions obtained from the extraction of the essential oil through the steam drag method. Terpenoid derivates with carboxilic groups were identifield through the immiscibles solvents of different polarities where the samples were analyzed in TLC (thim layer chomatography), fractioned and purified in LCC (liquid cromatography in column) and afterwards identified through spectrométric IV data (infra-red) and CG/EM (gas cromatography coupled mass spectrum in).

*Adviser: Maria das Graças Cardoso - UFLA, José Eduardo Brasil Pereira Pinto -UFLA (co-adviser).

1 INTRODUÇÃO GERAL

A utilização de plantas que apresentam propriedades medicinais vem perpassando os tempos desde os primórdios da civilização humana. Numerosas etapas marcaram a evolução da arte de curar, porém, é difícil delimitá-las com exatidão, já que a medicina esteve, por muito tempo, associada a práticas mágicas, místicas e ritualísticas. Consideradas ou não seres espirituais, as plantas, por suas propriedades terapêuticas ou tóxicas, adquiriram fundamental importância na medicina popular (Martins et al., 1994).

Analisando a história, é possível perceber que as grandes civilizações foram construídas e baseadas em sistemas médicos que utilizam como recurso terapêutico quase que exclusivamente plantas medicinais. A China, com sua milenar medicina tradicional chega até os dias atuais com 435 medicamentos fitoterápicos pesquisados a partir deste conhecimento tradicional; a Índia, com a medicina ayurveda; no Egito, as plantas medicinais que são usadas desde a antiguidade e mantêm-se até hoje nos formulários médicos de muitos países; no ocidente, as civilizações clássicas gregas e romanas construíram conhecimentos e princípios utilizados na medicina moderna. Tais conhecimentos adquiridos sobre o seu ambiente foram passados de geração a geração por especialistas como os pajés, chamãs, mezinheiros, benzedeiras, raizeiros e druidas por eficientes sistemas de transmissão oral (Cardozo Júnior, 1996).

A utilização desta prática no Brasil iniciou-se por influência européia com os primeiros padres da Companhia de Jesus chefiados por Manuel da Nóbrega, em 1579, os quais chegaram com Tomé de Souza, com a finalidade de catequizar os índios. Estes religiosos formulavam receitas chamadas “Boticas dos Colégios” à base de plantas, a maioria de origem européia. Mesmo assim grande parte delas reproduziu-se espontaneamente, formando genótipos ou

variedades distintas daquelas que vieram com os europeus durante a colonização (Martins et al., 1994).

Nas décadas de 1950 a 70, as plantas medicinais ficaram marginalizadas em virtude do grande impulso que a química orgânica promoveu na medicina alopática. Entretanto, a partir da década de 1980, elas passaram novamente a ser valorizadas como fontes de propriedades curativas de baixo custo (Matos, 1987). Atualmente estima-se que existam no mundo cerca de 500.000 espécies vegetais, das quais 60 a 70% se encontram na América Latina, principalmente nas florestas tropicais úmidas em que poderia se afirmar que de 10 a 12% devem apresentar atividade biológica, constituindo importante fonte de fármacos (Estrella, 1993).

Nas diferentes regiões florísticas existentes no Brasil, metade das espécies nativas apresentam alguma propriedade medicinal; de acordo com estimativas otimistas, cerca de 1% delas já foi quimicamente estudada (Clemente Filha, 1996). Os dados demonstram que de 70 a 80% da população do mundo em desenvolvimento depende parcialmente ou completamente dos remédios de ervas. Várias razões sócio-culturais são atribuídas para a contínua popularidade tradicional de remédios de ervas, particularmente na região rural do mundo em desenvolvimento. Esse tradicionalismo ocorre principalmente nas culturas antigas da Ásia, mundo árabe e América Latina (Wijesekera, 1991).

Os produtos naturais formam a base dos terapêuticos. A medicina alopática utiliza aproximadamente 119 drogas com estrutura definida, que são extraídas de cerca de 90 espécies de plantas superiores. No entanto, existem cerca de 250.000 espécies de plantas superiores e somente 10% delas já foram estudadas com a finalidade de verificar suas atividades biológicas, o que permite deduzir que muitas substâncias com atividade medicinal podem ainda ser isoladas (Corrêa, 1995).

A Organização Mundial de Saúde selecionou 252 fármacos básicos dos quais 48,9% são obtidos por síntese, 11% são de origem vegetal, 9,1% de origem mineral, 8,7% de origem animal e 6,4% de origem microbiana. (Korolkovas, 1989).

Os custos para desenvolver medicamentos sintéticos ou parcialmente sintéticos são muito elevados. Os trabalhos de pesquisa com plantas medicinais via de regra originam medicamentos em menor tempo, com custo muitas vezes inferior e, conseqüentemente, mais acessíveis à população, esta geralmente sem condições de arcar com os custos elevados da aquisição de medicamentos às vezes para o atendimento das necessidades primárias de saúde. Na maioria das vezes, as matérias-primas utilizadas na fabricação desses medicamentos são importadas o que aumenta ainda mais seu preço final (Martins et al., 1994).

O consumo mundial de medicamentos cresceu, em 1990, cerca de 173 bilhões de dólares, dos quais as plantas e seus derivados representam cerca de 25% dos fármacos consumidos (Estrella, 1993). Estas, então, constituem um enorme arsenal terapêutico já constatado cientificamente pelos estudos sistematizados de diversas famílias botânicas. Entre os diversos exemplos de substâncias oriundas de plantas e de importância, atualmente podemos mencionar as obtidas de *Echinodorus cf scaber* Rataj, que apresenta promissores efeitos depurativo, antiofídico, diurético, anti-reumático e antiinflamatório, sendo também utilizada na medicina popular com muita segurança para normalizar o ácido úrico, combatendo a gota e artrose, servindo ainda como base para a fabricação de refrigerantes (Corrêa, 1998). *Echinodorus cf scaber* Rataj, também conhecida como chapéu de couro, chá de mineiro, chá de campanha, congonha do brejo, erva de bugre, erva do pântano e chá de pobre é uma planta nativa amplamente dispersa por quase todo o território brasileiro, pertence à família Alismataceae. São herbáceas perenes, aquáticas emergentes, mantêm suas partes inferiores imersas e expõem suas folhas e inflorescências que

ocorreu principalmente nas margens de rios, lagos, canais de drenagem e baixadas pantanosas, conseguindo sobreviver totalmente imersas por um certo período, porém não florescem. Toleram curtos períodos de seca, suas flores são brancas com manchas amareladas na parte basal, apresentando infrutecências arredondadas de coloração castanha na maturação.

Os principais constituintes químicos encontrados nesta família foram taninos, flavonóides, triterpenos, glicosídeos, equinodorosídeos, essências e sais minerais (Martins et al., 1994; Lainetti et al, 1980). Na literatura há citações de que o princípio ativo da planta do chapéu de couro é desconhecido (Santos, 1988; Martins et al., 1994; Corrêa, 1998). Por tal motivo e por se tratar de uma espécie de grande interesse farmacológico, carente de informações científicas e técnicas adequadas de cultivo, são necessários estudos sobre a propagação da espécie e formas com as quais suas substâncias químicas sejam identificadas e produzidas em maior quantidade.

1.1 Objetivos

São objetivos do presente trabalho :

- Definir um meio de cultura no qual ocorra a multiplicação clonal *in vitro* de *Echinodorus cf scaber*
- Avaliar o efeito da influência de regulador de crescimento e sua atuação a nível celular
- Extrair e identificar os metabólitos secundários da espécie *Echinodorus cf scaber*

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos relacionados à caracterização botânica da espécie em estudo

As plantas da família Alismataceae caracterizam-se por serem ervas aquáticas ou brejosas, latescentes, sendo seus representantes encontrados essencialmente nas regiões tropicais e na região temperada do hemisfério norte com aproximadamente 10 gêneros, dos quais *Echinodorus* e *Sagittaria* são comuns no Brasil (Joly, 1993). O gênero *Echinodorus* apresenta flores hermafroditas, folhas com manchas translúcidas presentes ou não e carpelos não achatados lateralmente, multinervurados enquanto que o gênero *Sagittaria* apresenta flores unissexuais, folhas sem manchas translúcidas e carpelos achatados lateralmente sem nervuras (Kissmann, 1993). Segundo Rataj (1978), são reconhecidas 38 espécies de *Echinodorus* e 7 espécies de *Sagittaria*.

Apesar de muitas espécies deste gênero serem conhecidas, suas identificações são dificultadas por apresentarem características morfológicas muito próximas e por ocorrer cruzamento entre as mesmas, formando híbridos de diversas formas (Rataj, 1978).

O gênero *Echinodorus* é descrito como uma planta herbácea de folhas coriáceas cujo caule é substituído por grosso rizoma do qual se originam as folhas e a haste floral e que atinge cerca de 1m de altura. Na época da floração (verão), a planta emite um rácimo vertical com 50 a 150cm de altura e com 15mm de espessura, ornando flores brancas com manchas amareladas na parte basal com 10 a 20mm de comprimento por 10 a 15mm de largura que dão origem a frutos arredondados de 2 a 4mm de comprimento, tipo aquênios fusiformes de coloração castanha na maturação. As folhas são simples, eretas, basais, de forma muito variável, apresentando nervuras longitudinais curvas, proeminentes e abundantes linhas transversais; pontuações translúcidas; textura

coriácea; superfície de cor verde intensa, brilhante nas folhas novas; o pecíolo é cilíndrico, com 15 a 130cm de comprimento por até 2cm de espessura cujo tecido interno é esponjoso e retém água (Silva Júnior, 1994; Kissmann, 1993; Joly, 1993).



FIGURA 1. Planta de chapéu de couro. UFLA, Lavras/MG, 1999.

De acordo com a classificação de Engler in: (Joly, 1993), *Echinodorus* tem a seguinte posição sistemática:

Divisão: angiospermae

Classe: monocotiledoneae

Ordem: helobiae

Família: alismataceae

Gênero: *Echinodorus*

A classificação da espécie em estudo foi efetuada pelo professor Manuel Losada Gavilanes do Herbário ESAL (Herbário do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras) cuja exicata tem o N^o 15390.

2.2 Micropropagação

Uma planta íntegra é um sistema pluricelular altamente diversificado, originado de uma célula inicial única, o zigoto, com seu complemento genético característico. A partir das primeiras divisões, a diferenciação celular se estabelece em diferentes graus, culminando na planta adulta, num sistema de órgãos e tecidos especializados, em que apenas algumas células retêm a capacidade de divisão (Handro; Floh, 1990). A esta capacidade das células vegetais originarem plantas inteiras dá-se o nome de totipotência celular o que caracteriza a morfogênese e é no que se baseia a micropropagação.

A micropropagação ou propagação vegetativa *in vitro* é uma das técnicas mais bem sucedidas da cultura de tecidos. O seu uso é apropriado para clonar indivíduos melhorados, produzindo progênies homogêneas (Lameira, 1997). Os métodos disponíveis à propagação *in vitro* permitem obter milhares de plantas selecionadas através da multiplicação de brotos, gemas axilares, pela formação de brotos adventícios ou embriões somáticos adventícios. Segundo

George (1993), a maioria das plantas micropropagadas são obtidas pela multiplicação de brotos axilares.

A capacidade de regeneração e crescimento *in vitro* parece estar associada não apenas ao genótipo mas também à atividade fisiológica na planta matriz, sob o controle de diversos fatores endógenos (Caldas et al., 1990). Segundo Pinto (1997), as espécies respondem diferentemente e, dentro de uma mesma espécie, as cultivares apresentam exigências diferentes por isto, a sobrevivência do explante pode variar significativamente entre plantas.

A propagação clonal é altamente desejável ao processo de regeneração de espécies que apresentam alguma dificuldade na etapa de germinação de sementes e propagação vegetativa. Para um grande número de espécies, constata-se ser esta uma técnica promissora à preservação de fontes vegetais, como também na propagação comercial de plantas medicinais em que a micropropagação em muito tem contribuído para os avanços científicos, proporcionando certas vantagens sob os métodos de propagação convencionais, permitindo a obtenção em curto espaço de tempo de um grande número de plantas de boa qualidade fitossanitária e autenticidade varietal. Poucas são as informações a respeito da propagação de espécies nativas, o que dificulta o estabelecimento de generalizações sobre o comportamento das mesmas *in vitro* (Caldas, 1996).

Um grande número de espécies de plantas das quais podem derivar produtos medicinais, tem sido submetido a experimentos de micropropagação no qual é explorado o efeito da relação auxina/citocininas na regulação do crescimento de brotos sob condições controladas *in vitro* como *Cordia verbenacea* que atua como antiinflamatório e antiinfecioso devido a ação terapêutica da artemetina. Regenera-se esta planta a partir de explantes de segmento nodal e apical produzindo, em média, 2,7 propágulos por explantes (Lameira, 1997). Plantas de *Cephaelis ipecacuanha* largamente utilizadas nos

tratamentos contra amebíase também foram regeneradas *in vitro*; nestas utilizavam-se explantes de segmento nodal e internodal por um período de 8 a 10 semanas sob diferentes condições de cultivo (Costa, 1995). Plantas de *Cissus sicyoides* que possuem ação antidiabética obtiveram brotações através de métodos eficientes de regeneração e multiplicação clonal também utilizando segmento nodal (Abreu, 1998). Estudos feitos com *Bauhinia vahlii*, nos quais utilizavam-se segmentos nodais, foram conseguidos 96,20% de proliferação de brotos e multiplicação de 5,55 brotos/explante (Upreti e Dhar, 1996). A partir de sementes de *Brosimum guadichaudii*, obteve-se uma média de 3,5 brotos adventícios, com 68% de brotações (Fidelis, 1998).

O sucesso de um sistema de micropropagação depende do controle de um grande número de variáveis, os quais, através das investigações experimentais, conduzem para a determinação de protocolos ideais de micropropagação (Grattapaglia e Machado, 1990),

2.3 Meios nutritivos e reguladores de crescimento

O meio de cultura para o desenvolvimento e formação de uma nova planta é composto de várias substâncias essenciais que se baseiam nas exigências das plantas quanto aos nutrientes minerais, com algumas modificações para atender às necessidades específicas *in vitro*. Complementando as substâncias biossintetizadas pelas células, vários compostos orgânicos são adicionados ao meio para suprir as necessidades metabólicas, energéticas e estruturais das células (Caldas; Haridasan e Ferreira, 1990).

Todos os nutrientes do meio de cultura devem estar em concentrações otimizadas de forma a assegurar o crescimento dos explantes. As exigências em termos de meio de cultura são variáveis com a espécie, cultivar e explante utilizado, devendo ser experimentalmente definido para cada caso em particular.

Portanto, as pesquisas em cultura de tecidos se concentram na definição do meio de cultura para cada caso específico (Pinto e Pasqual, 1990).

Diversas formulações de meio têm sido utilizadas no cultivo *in vitro*. A diferença básica entre eles está na concentração dos sais utilizados. O meio de White (1943), considerado padrão por muitos anos embora pobre em nutrientes, passou por modificações principalmente no aumento de concentrações de sais em geral, diminuições de sódio e acréscimo do teor de nitrogênio na forma amoniacal para complementação do nitrato, dando origem em 1962 ao meio de Murashige e Skoog, hoje muito utilizado no estabelecimento, multiplicação e enraizamento de muitas mono e dicotiledôneas. O meio MS, assim denominado, é seguramente o mais amplamente utilizado, seguido pelo meio de Gamborg(B₅) (1968) (Grattapaglia e Machado, 1990).

A composição básica dos meios constitui-se de água, macro e micronutrientes, carboidratos, vitaminas, mioinositol, podendo ainda conter regulador de crescimento, misturas complexas como água de coco e extratos vegetais, e outros aditivos como os antioxidantes, antibióticos e aminoácidos. Se o meio a ser preparado for sólido acrescenta-se ágar.

Ao meio de cultura geralmente são adicionados reguladores de crescimento com o objetivo de suprir as possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes, estimulando respostas no crescimento, alongamento e multiplicação, dependendo do estado fisiológico dos explantes, que são influenciados pela época do ano e pelas condições gerais da planta matriz (Grattapaglia e Machado, 1990). Diferentes tipos de auxinas, citocininas, giberelinas e ácido abscísico são conhecidos por seus diferentes efeitos no crescimento e no metabolismo secundário (Sakuta e Komamine, 1987).

Indução de calos em *Quassia amara* foram conseguidos em diferentes ensaios em que foram utilizadas combinações de 2,4D (ácido-2,4-diclorofenoxiacético), cinetina e água de coco em meio B₅ (Lameira et al.,

1996). Segundo Maity et al. (1997), a multiplicação de *Dendrocalamus strictus* a partir de segmento nodal foi alcançado em experimentos com GA (ácido geberélico) e BAP em meio MS. Segmentos nodais de *Hopea odorata* a partir de sementes foram desenvolvidos sem diferença significativa em meios MS e B5 (Scott; Rao; Loh 1995).

A necessidade de selecionar o tipo de meio e, a adição ou não de regulador é completamente dependente do objetivo a ser alcançado, tipo de explante e da espécie, pois os seus efeitos se diferem. Ensaio específicos são imprescindíveis para estabelecer o meio ideal com suas combinações e concentrações de reguladores eficazes para induzir a resposta esperada.

2.3.1 Citocininas

As citocininas são substâncias derivadas da base púrica adenina que se caracterizam por promover o crescimento através da divisão celular. Estão divididas em dois grupos de acordo com sua composição química. Quando existe a presença de uma cadeia do grupo das purinas, denomina-se citocininas púricas; o outro grupo caracteriza-se pela ausência desta cadeia são as não púricas (Benier et al., 1977; Benier, 1988; Benier, Kinet e Sachs, 1981).

A primeira citocinina vegetal isolada foi a de sementes de milho e é conhecida por zeatina (Letham e Shannon, 1946). A era moderna de estudos com citocininas iniciou-se em 1955, com a separação do DNA do esperma de arenque. Os pesquisadores descobriram que apenas os DNAs de frascos envelhecidos induziam à divisão celular em cultura de tabaco enquanto o material mais fresco não apresentava nenhuma atividade e conseguiram isolar o fator de crescimento de uma dessas preparações de DNA envelhecido, o primeiro estimulante conhecido da divisão celular chamado de cinetina identificado como 6-furfurilaminopurina (Skoog e Miller, 1957).

A identificação da cinetina como uma variação no 6' amino purina permite a síntese de muitas substâncias análogas. Uma das citocininas sintéticas mais bem sucedidas é a 6-benzil amino purina (BAP) que, juntamente com a cinetina, são as citocininas mais usadas na agricultura (Horgan, 1984).

É comum a utilização do balanceamento de auxinas e citocininas no processo de diferenciação e acúmulo de metabólito nos estudos de plantas, inclusive naquelas com propriedades medicinais cultivadas *in vitro*. As auxinas têm uma larga variedade de efeitos no crescimento: promovem a divisão celular no caule, induzem o enraizamento mas podem inibir o alongamento da raiz e os botões laterais. As citocininas estão ligados à proliferação celular nos tecidos que a contêm ou são suplementados com um nível ótimo de auxina. Ambas participam na regulação do ciclo celular; enquanto a auxina regula os eventos conduzindo à replicação do DNA enquanto a citocinina age conduzindo à mitose (Jouanneau e Tandeau, 1973). Altos níveis de auxina relativos à citocinina estimulam a formação de raízes, enquanto níveis baixos induzem à formação de brotos; a um nível intermediário os tecidos crescem como calos não diferenciados (Skoog e Miller, 1965).

Várias espécies de plantas, das quais produtos medicinais podem ser derivados, têm sido submetidas a experimentos das técnicas da cultura *in vitro* em que os efeitos dos reguladores de crescimento na propagação e produção de metabólitos secundários são complexos e contraditórios (Abo-El- Nil, 1977; Bhojwani, 1980; Webb, Osifo e Henshaw, 1983; Sakuta e Komamine, 1987).

Plantas de *Mandevilla velutina* foram micropropagadas em meio MS suplementado com 1mg de BAP; seus calos foram obtidos com 1mg/litro cada de BAP, 2,4D (Ácido 2,4 diclorofenoxiacético), e KIN (cinetina). A partir dos calos obtidos de folhas, ramos de plantas *in vitro* em MS suplementado com 3mg/litro BAP, obteve-se suspensão celular (Amaral et al., 1997). Rizomas de *Acorus calamus* foram micropropagados em meio MS utilizando-se diferentes

concentrações de BAP, KIN, NAA sendo que o melhor resultado foi obtido com 0,5mg de BAP e 0,05mg de NAA (Harikrishnan et al., 1997). Em *Nigella sativa* ocorreu multiplicação clonal em meio MS adicionado de adenina e diferentes concentrações de BAP; a obtenção de embriogênese somática deu-se a partir de suspensão de células usando MS com L-glutamine (Sutapa et al., 1996).

Sakuta e Komamine (1987) confirmam que o uso de citocininas em cultura de calos de *Stizolobium hassjoo* estimularam o acúmulo de L-dopa. Mikula et al. (1996) estudaram o potencial morfogênico em *Gentiana cruciata* e *G. tibetica* em suspensão de células, obtendo calos em meio MS suplementado com 2,4 D, e KIN, os quais foram usados em suspensão de células, de onde surgiu a embriogênese somática a partir do meio MS com 1mg de dicamba, 0,1mg de NAA e 2mg de BAP. Observou-se o acúmulo de metabólitos secundários nas células do vacúolos confirmados por estudos microscópicos, porém Yoshikawa, Fukui e Tabata (1986) verificaram que o uso de Giberelina inibiu a produção de shikonina em cultura de calos de *Lithospermum*, não afetando no crescimento.

2.4 Metabolismo secundário

Os compostos secundários possuem estrutura relativamente complexa e distribuição restrita, características de fontes botânicas específicas, sendo produzidos por processos metabólicos primários (Taiz e Zeiger, 1991). Por serem sintetizados em células e tecidos específicos, participam ativamente nos processos de crescimento e desenvolvimento das plantas, sendo de grande importância para a sobrevivência das mesmas como um todo, ajudando na sua adaptação e inter-relação com o meio ambiente (Becker, 1996).

Os princípios ativos são classes do metabolismo secundário constituídos de uma substância ou conjunto de substâncias quimicamente bem definidas

produzidas por plantas que apresentam propriedades biológicas. Com poucas exceções, estes compostos são sempre sintetizados segundo a rota biossintética proveniente da via dos ácidos mevalônico, malônico e do chiquímico. Compostos sintetizados a partir do metabolismo primário, que podem ser utilizados farmacologicamente como polissacarídeos ácidos (mucilagem) e proteínas estão incluídos neste grupo (Swain, 1998). As classes mais bio-ativas dessas substâncias produzidas pelas plantas são: compostos terpênicos, compostos fenólicos e compostos contendo nitrogênio. O sítio de acúmulo destas substâncias em diferentes locais dos vegetais podem ocorrer nos mesmos órgãos em que foram sintetizados ou em outra parte da planta, porém, a concentração destes varia substancialmente e vai depender de suas características genéticas e dos estímulos externos (Wink, 1990; Martins et al., 1994; Clemente Filha, 1996).

Nem sempre os princípios ativos são conhecidos, o que não os impede de possuir ação medicinal satisfatória e serem consumidos atentando para possíveis efeitos tóxicos agudos ou crônicos (Di Stasi, 1996; Martins et al., 1994). Por se tratarem de estruturas complexas, com muitos centros essenciais às atividades biológicas das plantas, muitas dessas biomoléculas não podem ser sintetizadas economicamente em uma escala comercial, pois o rendimento é quase sempre extremamente baixo nas fontes vegetais e os métodos utilizados para extrair estes compostos são de alto custo. Calcula-se que 74% dos medicamentos de origem natural foram obtidos tendo por base a Etnomedicina (Raslan, 1997) como é o caso do Oncovin e Velban, drogas produzidas pelo Laboratório Lilly que atuam no tratamento de leucemia e tumores como linfoma. Ambos são baseados na estrutura de uma flor vulgarmente conhecida como Boa-Noite (*Catharantus roseus*). Baseados na estrutura do curare, substância extraída de uma planta de mesmo nome (*Chondodendro tomentosum*) os laboratórios Abbott, Wellcome e Squibb produzem os remédios Quelicin,

Anectine ou Sucostrin, utilizados como relaxante muscular, aplicados, principalmente, em cirurgias. A Merck extrai do jaborandi (*Pilocarpus jaborandi*) a pilocarpina, utilizada no tratamento de glaucoma e, assim, produz o remédio Pilocarpina. A partir da ação do veneno da jararaca (*Bothrops jararaca*) a Squibb produz o Capoten ou Captopril utilizado no tratamento de hipertensão arterial (Assumpção, 1997).

De acordo com a Associação Brasileira da Indústria Farmacêutica (1993), calcula-se que o total de plantas medicinais comercializado pela indústria atingiu cerca de 3 bilhões de dólares (Ming, 1996).

2.5 Análise e determinação fitoquímica

Uma planta com reconhecidas aplicações terapêuticas contém centenas de metabólitos secundários, mas apenas os compostos presentes em maior concentrações são geralmente isolados e estudados pela fitoquímica clássica. A análise de substâncias ativas é muito mais complexa e longa; geralmente, a multiplicidade dos constituintes químicos interessantes estão presentes em menor proporção na planta, concomitantemente com grandes quantidades de constituintes já conhecidos e muito comuns, ao lado de vários outros fatores interferentes que dificultam o trabalho de isolamento e purificação dos princípios imediatos desejados (Matos, 1988).

Quando se quer obter substâncias ativas em plantas, a seleção se baseia em informações da medicina popular, pois, é mais provável encontrar atividade biológica em plantas orientadas pela mesma do que aquelas escolhidas ao acaso. Deve-se, porém, dar sempre importância às informações botânico-taxonômicas e químico-taxonômicas (Montellan, 1975; Farnsworth, 1981; Unander, 1995; Ferri, 1996). Como a constituição química da maioria difere significativamente em relação às distintas partes da planta, parece mais viável estudar inicialmente

aquela empregada na medicina popular e posteriormente as outras partes da planta que também podem conter princípios ativos (Tortoriello, Meckes-Fischer e Vilarreal, 1995).

As dificuldades em se fazer as análises de substâncias ativas estão condicionadas à própria natureza da planta como ser vivo em constante dinamismo químico ou ao grau de precisão das técnicas utilizadas pelo pesquisador (Matos, 1988). A escolha por um determinado método de extração vai depender da textura e do conteúdo de água presente no material a ser extraído, bem como do tipo de substância que se deseja isolar (Ferri, 1996).

A preparação dos extratos brutos das plantas é o ponto de partida para se identificar, isolar e purificar os seus constituintes fixos (Matos, 1988). Entre os métodos modernos de análises, a cromatografia ocupa um lugar de destaque devido à sua facilidade em ser efetuada por si mesma ou em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise, como, por exemplo, a espectrofotometria (IV, UV) ou a espectrometria de massa (Collins, 1993).

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes da mistura, realizada através da distribuição destes compostos entre duas fases que estão em contato íntimo. Uma das fases permanece estacionária enquanto a outra move-se através dela. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos entre as duas fases de tal forma que cada um dos componentes é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferenciais destes compostos (Collins, 1993).

Os tipos de cromatografias diferem pela forma física do sistema que podem ser em coluna ou planar; pela fase móvel empregada: gasosa, líquida, supercrítica; pela fase estacionária utilizada: sólidas, líquidas e quimicamente ligadas; pelo modo de separação: adsorção, partição, troca iônica, exclusão ou misturas desses mecanismos (Degani, Cass e Vieira, 1998).

A cromatografia de camada delgada (CCD) é o método prático mais rápido, fácil e usado para julgar a pureza (a complexidade e, muitas vezes, a natureza) dos compostos orgânicos. Nesse caso, se trata de uma técnica líquido-sólido em que, a separação se dá pela diferença de afinidade dos componentes de uma mistura pela fase estacionária. O parâmetro mais importante a ser considerado em CCD é o fator de retenção (R_f), que é a razão entre a distância percorrida pela substância em questão e a distância percorrida pela fase móvel (Shriner et al., 1983; Degani, Cass e Vieira, 1998).

A cromatografia líquida em coluna (CLC) é muito utilizada para isolamento de produtos naturais e purificação de produtos de reações químicas. Trata-se de um tipo de cromatografia na qual se usa uma coluna recheada com um sólido (fase estacionária) e uma fase móvel líquida, em que a adsorção refere-se a um aumento da concentração do material (que está em excesso na fase móvel) entre as superfícies das fases móvel e estacionária. As fases estacionárias mais utilizadas são sílica e alumina, que servem simplesmente como suporte para a fase estacionária líquida. Fases estacionárias sólidas levam à separação por adsorção e fase estacionária líquidas por partição. Suportes quimicamente modificados também têm sido usados, sendo o processo de separação misto (Collins, 1993; Degani, Cass e Vieira, 1998).

Na determinação da estrutura de novos compostos são utilizados vários métodos de espectrometria, como infravermelho (IV) e espectrometria de massa (EM). A análise em IV é muito sensível à multiplicidade de ligações e à composição atômica dos grupos funcionais. Sendo assim, em grande parte, com um ensaio dos grupos funcionais da molécula podem-se inferir algumas conclusões gerais sobre a sua estrutura e, através da espectrometria de massa, pode-se obter a fórmula molecular assim como o padrão de fragmentação da molécula (Shriner et al., 1983; Ferri, 1996).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- * ABO-EL-NIL, M.M Organogenesis and embriogênese in callus cultures of garlic (*Allium sativum* L) **Plant Science Letter**, Elsevier, v.9, n.1, 1977. 259-264p.
- ABREU, I.N. **Propagação in vivo e in vitro, calogênese, nutrição mineral e quantificação de mucilagem de *Cissus sicyoides***. Lavras: UFLA, 1998.113p. (Dissertação-Mestrado em Fisiologia Vegetal).
- AMARAL, J.B.S.; D'UTRA-VAZ, F.B.; CAETANO, L.C.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B.; SANT'ANA, A.E.G. Compostos diferentes do Velutinol presentes na cultura de tecidos de *Mandevilla velutina* (Apocynaceae) In: **Anais XIV Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, Florianópolis, SC, 1996**.
- ASSUMPÇÃO, J.C. **Floresta vira farmácia Jomal Folha de São Paulo**, Domingo 1º de Junho, 1997. 5-14 a 5-16p.
- BECKER, L. **Indução da síntese de metabólitos secundários in vitro** Seminário apresentado como exigência da disciplina Tópicos Especiais I, Lavras, 1996.
- BENIER, G. The control of floral evocation and morfogpogenesis. **Anunual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 39, 1988. 175-219p.
- BENIER, G.; KINET, J.M.; JACQMARD, A.; HAVELANGE, A.; BODSON, M. Cytokininin as a possible component of the floral stimulus in *sinapis alba*. **Plant Physiology**, Maryland, v.60,.1977. 282-285p.
- BENIER, G.; KINET, J.M.; SACHS, R.M. **The pysiology of flowering**, Boca Raton: CRC, 1981. v.1-3
- BHOJWANI, S.S. **In vitro propagation of garlic by shoot proliferation**. **Science Horticulture**, Amsterdan, v.13, 1980. 47-52p.
- CALDAS, L.S. **Micropropagação de Plantas Lenhosas do Cerrado**. IN: **Workshop Sobre Avanços na Propagação de Plantas Lenhosas**, LAVRAS: UFLA. 1996. 23-28p.

- CALDAS, L.S.; HARIDASAN,P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. IN: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S (eds.). *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 1990. p. 37-70
- CARDOSO JÚNIOR, E. L. Homens e plantas medicinais: passado, presente e futuro. In: *Anais II Seminário Mineiro de Plantas Medicinais*, Lavras: UFLA 1996. 1-4p.
- CLEMENTE FILHA, A.C. Aspectos fisiológicos e fitoquímicos de *Bauhinia forficata* Link e *Plantago major* L. Lavras: UFLA, 1996. 67p (Dissertação-Mestrado em Fisiologia Vegetal).
- COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. *Introdução a métodos cromatográficos*. 5ª ed. Campinas: Editora da Unicamp, 1993.143p.
- CORRÊA, A.D.; BATISTA,R.S; QUINTAS,L.E.M *Plantas Medicinais: do cultivo à terapêutica*. Vozes, 1998. 246p.
- CORRÊA, A.G. Taxol: da descoberta ao uso terapêutico. *Química Nova*, v.18, n.5, 460-467 p. Set/Out 1995.
- COSTA, M.P.da. *Desenvolvimento e teor de Alcalóides em plantas de Ipeca (Cephaelis ipecacuanha, A. Richard.) obtidas in vitro submetidas às condições nutricionais em casa de vegetação*. Lavras: UFLA, 1995. 61p (Dissertação-Mestrado em Fisiologia Vegetal).
- DEGANI, A.L.G.; CASS, Q.B.; VIEIRA, P.C. *Química Nova*, 1998, 7, 21p.
- DI STASI, L.C. *Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar* São Paulo: Editora da Universidade Estadual Paulista, 1996. 230p.
- ESTRELLA, E. *Utilização de plantas medicinais*. Seminário apresentado em Taller sobre utilização industrial de plantas medicinais – organizado por ONUDI, Guatemala, 1993.
- FARNSWORTH, N.R.; KAAS, C.J., J. *Ethnopharmacol*, 1981, 3, 85p.
- FERRI, P.H. *Química de produtos naturais: principais constituintes ativos*. In: DI STASSI, L.C. *Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudos interdisciplinar*. São Paulo: UNESP, 1996. Cap.10. 129-156p.

- GEORGE, E.F Plant propagation and micropropagation. In: GEORGE, E.F **Plant propagation by tissue culture: part 1 the technology**. 2ed. Somerset: Exegetics, 1993. Cap.2 p.37-66.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S(eds.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPq, 1990. p. 99-170.
- HANDRO, W.; FLOH, E.I.S. Aspectos Básicos do Controle da Morfogênese in vitro In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S (eds.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPq, 1990. 204-211 p.
- HARIKRISHNAN, KN; MARTIN, KP; ANAND, P.H.M.; HARIHARAN, M **Micropropagation of sweetflag (*Acorus calamus*) a medicinal plant**. *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences* 1997. 427-429p.
- JOLY, AB. **Botânica: Introdução à Taxonomia Vegetal**, 2 ed. São Paulo: Nacional, 1993. 739p.
- JOUANNEAU, J.P.; TANDEAU, M.N. Stepwise effects of cytokinin activity and DNA synthesis upon mitotic cycle events in partially synchronized tobacco cells. *Experimental Cell Research*, San Diego, v.77, 1973. 167-174p.
- KISSIMANN, K.G. **Plantas infestantes e nocivas**. São Paulo: BASF Brasileira S.A , 1991. v.1 602p.
- KOROLKOVAS, A. Planejamento de Fármacos, *Ciência e cultura*, 1989. v 41, 528-537p.
- LAINETTI, R.; BRITO, N.R.S.de. **A saúde pelas plantas e ervas do mundo inteiro**. Ediouro 1980.
- LAMEIRA, O. A. **Propagação in vitro e in vivo, dinâmica de crescimento de células, nutrição e identificação de flavonóides em erva baleeira (*Cordia verbenacea* L.)** Lavras: UFLA, 1997. 88p. (Tese-Doutorado em Fitotecnia).
- LAMEIRA, O.A; PINTO, J.E.B.P; CERQUEIRA, E.S.; ARRIGONE-BLANK, M. de F.; CASTRO, A.H.F. Indução de calos em Quina (*Quassia amara* L.). IN: **Anais II Seminário Mineiro de Plantas Mediciniais**, Lavras: UFLA 1996. 34p.

- LETHAM, D.S.; SHANNON, J.S ; McDONALD, I.R. The Structure of Zeatin, a factor inducing cell division. *Proc. Chem. Soc.(Iond.)*, 1946. 230p.
- MAITY, S.; GHOSH, A. Efficient plant regeneration from seeds and nodal segments of *Dendrocalamus strictus* using in vitro technique. *Cell and Tissue Culture, Indian-Forester* 1997. 313-318p.
- MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.de.; CASTELLANI, D.C.;DIAS, J.E. *Plantas Medicinais*. Viçosa: UFV, 1995. 220p.
- MATOS, F.J.A. *Formulário fitoterápico do professor Dias da Rocha*. Mossoró: ESAM, 1987. 222p (coleção ESAM, ano XX,v.18).
- MATOS, F.J.A. *Introdução à fitoquímica experimental*. Fortaleza: UFC, 1988. 126p.
- MIKULA, A; TYKARSKA, T; KURAS, M; IWANOWSKA, A; RYBCZNSKI, J; PANK, F Studies on the morphogenic potential of gentians in cell suspension *International symposium. Breeding research on medicinal and aromatic plants, Quedlinburg, Germany*. 1996. 290-295p.
- MING, L.C. Aspectos Agronômicos de Plantas Medicinais In: *Anais II Seminário Mineiro de Plantas Medicinais*, Lavras: UFLA 1996. 7-10p.
- MONTELLANO, O.B., *Science*, 1975, 188, 215p.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.15, p.473-479, 1962.
- PINTO, J.E.B.P. *Fatores que afetam o crescimento e a morfogênese*, LAVRAS: UFLA.1998. 6p. (Apostila).
- PINTO, J.E.B.P.;PASQUAL, M. *Introdução a Cultura de Tecidos*, LAVRAS: ESAL. 1990. 73p. (Apostila).
- RASLAN, D.S. *Plantas Medicinais Seminário apresentado no XI Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química – organizado pela Sociedade Brasileira de Química*, Lavras, 1997.
- RATAJ, KAREL *Alismatácea of Brazil*. *Acta Amazonica*, Manaus, 8 (1): Suplemento 1 Mar. 1978. 53p.

- SAKUTA, M ; KOMAMINE, A. Cell growth and acumulation of secondary. In: CONSTABEL, F.; VASIL, I.K.(eds.), **Cell culture and somatic cell genetics of plants: cell culture in phytochemistry**. San Diego: Academic Press, 1987. v 4, Cap.5, p.97-114.
- SAKUTA, M.; KOMAMINE, A. Cell growth and accumulation of secondary metabolites. IN: CONSTABEL, F.; VASIL, I.K. (eds), **Cell culture and somatic cell genetics of plants: cell culture in phytochemistry**. San Diego: Academic Press, v.4, cap.5, 1987. 97-114p.
- SANTOS, C.A de M.;TORRES,K.R.;LEONART, R. **Plantas Medicinais: herbarium flora et scientia**. 2ed. São Paulo: cone, 1988. 160p.
- SCOTT, D.E.G; FLETCHER, B.H.; STREET, H.E., Preliminary studies of micropropagation of *Hopea odorata*, a dipterocarp tree.**Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 41,1995. 193-196p.
- SHRINER, R.L.; FUSON, R.C.; CURTIN, D.Y.; MORRILL, T.C., **Identificação sistemática dos compostos orgânicos: manual de laboratório/Ralph**; Traduzido por Horácio Macedo. 6ª ed . Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1983 517p.
- SILVA JÚNIOR, A.A.; VIZZOTTO,V.J.; GIORGI, E.; MACEDO, S.G.; MARQUES,L.F. **Plantas Medicinais, caracterização e cultivo** Florianópolis:EPAGRI,1994.71p (EPAGRI.Boletim Técnico,68).
- SKOOG, F.; MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured in vitro .**Sympo.Soc.Exp.Biol.V.11**, 1957. 116-131p.
- SKOOG, F.; MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured in vitro. IN: **Molecular and celular aspects of development**, bell, E., pp. 481-494. Harper e Row, New York, 1965.
- SUTAPA, KUMAR; ROY, S.C; KUMAR, S. Rapid in vitro propagation of *Nigella sativa* by axillary bud multiplication and somatic embryogenesis. **Cytobios**. 1996. 99-106p.

- SWAIN, T. Secondary compounds a protective agents. Annual Review of Plant Physiology v.2, 1977, 479-501p. In: ABREU. **Propagação *in vivo* e *in vitro*, calogênese, nutrição mineral e quantificação de mucilagem de *Cissus sicyoides***. Lavras: UFLA, 1998. 113p. (Dissertação-Mestrado em Fisiologia Vegetal).
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. The Benjamin/Cummings publishing Company INC. 1991. 559p.
- TORTORIELLO, J.; MECKES-FISCHER, M.; VILARREAL, M.L.; BERLIN, B.; BERLIN, E., IN: CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. **Química nova**, 1998, 21, 99-105p.
- UNANDER, D.W.; WEBSTER, G.L.; BLUMBERG, B.S.; **J.Ethnopharmacol**, 1995, 45, 1p.
- WEBB, K.J.; OSIFO, E.O.; HENSHAW, G.G. Shoot regeneration from leaflet disc of six cultivars of potato (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*). **Plant Science Letter**, Elsevier, v.30, n.1, May 1983. 1-8p.
- WIJESKERA, R.O.B. Plant-derived medicines and their role in global health. IN: WIJESKERA, R.O.B. (ed.), **The medicinal plant industry**. Boca Raton: CRC Press, 1991. Cap.1 p.1-18.
- WINK, M. Physiology of secundar product formation in plants. In: CHARWOOD, B.; RHODES, M.J.C. **Secondary products from plants tissue culture**. Oxford: Clarendon Press, 1990. 23-42p.
- YOSHIKAWA, N.; FUKUI, H.; TABATA, M. Effect of gibberellin A₃ on shikonin production in *Lithospermum* callus cultures. **Phytochemistry**, Oxford, v.25, n.3, Mar 1986. 621-622p.

4 CAPÍTULO I

PROPAGAÇÃO IN VITRO DE *Echinodorus cf scaber* Rataj

RESUMO

Echinodorus cf scaber Rataj é uma espécie com propriedades medicinais conhecida popularmente como chapéu de couro. Devido a ação de seus princípios ativos é indicada como depurativo, antiofídico, diurético, anti-reumático e antiinflamatório sendo também utilizada para normalizar o ácido úrico contra gota e artrose. A reprodução usual ocorre através de sementes que podem trazer variação genética à espécie ou pelos seus rizomas que são muito sensíveis no plantio, podendo, às vezes secar as folhas de onde os princípios ativos são extraídos. Para evitar inconvenientes como estes, a micropropagação constitui uma alternativa eficaz para a multiplicação destas espécies, que apresentam interesse econômico. O objetivo proposto neste trabalho foi o de viabilizar a multiplicação in vitro do chapéu de couro e estabelecer um protocolo que permita a clonagem da mesma apresentando uma alternativa ao processo convencional de propagação. Para o estabelecimento in vitro, segmentos nodais provenientes de mudas crescidas no município de Lavras-MG, foram excisadas e inoculadas em meio MS (Murashige e Skoog, 1962) suplementado com $1,5\text{mg.L}^{-1}$ de BAP (6-benzil amino purina) e NAA (ácido naftaleno acético). As mudas então estabelecidas in vitro foram submetidas ao experimento no qual se utilizava o meio MS ausente de regulador de crescimento e suplementado com 6mg.L^{-1} BAP solidificado com ágar a 0,6%. Os explantes foram cultivados em fotoperíodo de 16 horas sob uma intensidade de luz de 2000 lux. Cada tratamento continha 15 explantes. Os parâmetros avaliados foram as repicagens realizadas com 30 e 60 dias de cultivo e o meio de cultura utilizado. Não houve diferença significativa quanto as repicagens realizadas. O maior número de raízes e altura dos propágulos foram obtidos no meio MS sem regulador.

*Orientadora: Maria das Graças Cardoso - UFLA, José Eduardo Brasil Pereira Pinto – UFLA (Co-orientador).

4 CHAPTER I

IN VITRO PROPAGATION OF *ECHINODORUS CF SCABER* RATAJ

ABSTRACT

Echinodorus cf scaber Rataj is a species with medicinal properties popularly known as leather hat. Due to action of its active principles it is prescribed as depurative, antiophidian, diuretic, antirheumatic, and antiinflammatory being also utilized for normalizing uric acid against both gout and artrosis. Usual reproduction occurs either through seeds may bring genetic variation within the species or by its rhizomes which are greatly sensitive at planting, being able, sometimes dry, the leaves from where active principles are extracted. To avoid such drawbacks as these, micropropagation constituted an effective alternative for multiplication of species like that which present economical value. The objective proposed in this work was to become viable the *in vitro* multiplication of leather hat and establish a protocol which enable its clonagem by presenting an alternative to the conventional process of propagation. For *in vitro* establishment, nodal segments from cuttings grown in the city of Lavras were excisadas and inoculated in MS medium (Murashige and Skoog, 1962) supplemented with 1,5 mg. L⁻¹ of BAP (6-benzil amino purina) and NAA (acid acetic naftaleno). The cutting then established *in vitro* were submitted to the experiment in which the MS medium without growth regulator and supplemented with 6 mg. L⁻¹ BAP solidified with ágar to 0,6%. The explantes were grown at photoperiod of 16 hour under a light intensity of of 2000 lux. Each treatment contained 15 explantes. The parameters evaluated were the transplants performed at 30 and 60 days' cultivation and the culture medium used. There were not significant difference as to the transplants realized. The greatest number of roots and height of the propágulos were obtained in the regulatorless MS medium.

*Adviser: Maria das Graças Cardoso - UFLA, José Eduardo Brasil Pereira Pinto - UFLA (Co-adviser).

4.1 Introdução

Echinodorus cf scaber Rataj é conhecida como chapéu de couro, chá de mineiro, chá de campanha, congonha do brejo, erva de bugre, erva do pântano e chá de pobre. São plantas nativas, pertencentes à família Alismataceae, herbáceas cujo caule é substituído por um grosso rizoma do qual se originam as folhas e a haste floral. São perenes, aquáticas emergentes, mantêm suas partes inferiores imersas e expõem suas folhas e inflorescências, ocorrendo principalmente nas margens de rios, lagos, canais de drenagem e baixadas pantanosas. Conseguem sobreviver totalmente imersas por um certo período, porém não florescem; toleram curtos períodos de seca. A reprodução usual desta espécie ocorre através de sementes, o que pode trazer variação genética entre os indivíduos da espécie ou pelos seus rizomas que são muito sensíveis no plantio, podendo, às vezes, secar as folhas que são a parte da planta de onde os princípios ativos são extraídos.

A multiplicação clonal através da cultura de tecidos constitui uma alternativa eficaz para a regeneração de espécies como esta e outras que apresentam interesse econômico. Além disso, elimina as dificuldades encontradas no processo convencional de reprodução, preserva espécies ameaçadas de extinção, comum em plantas medicinais devido a exploração irracional, evitando, portanto, a exposição a variações ambientais que trazem dificuldades à seleção de plantas saudáveis.

Várias técnicas de propagação clonal têm sido utilizadas para a micropropagação de plantas medicinais, sendo as mais comuns a regeneração de calos e multiplicação de brotos. A multiplicação clonal a partir de calos é questionável por proporcionar uma alta percentagem de variação somaclonal o que torna a multiplicação de brotos a partir de segmentos nodais, o método mais

utilizado e seguro quando se quer obter a produção de clones em larga escala (Einset, 1986).

O sucesso de um sistema de micropropagação depende do controle de um grande número de variáveis, como as condições em que a planta matriz foi conduzida na casa de vegetação, a posição do explante na planta e o nível endógeno de hormônio. Tais controles continuam em relação ao tamanho do explante, posição do mesmo no meio de cultivo, método de inoculação, fatores físicos de crescimento, tipo e adição de substâncias ao meio.

Uma gama de espécies de plantas das quais derivam produtos medicinais possui um protocolo já estabelecido para a sua multiplicação *in vitro*: *Lawsonia inermis*, *Azadirachta indica*, *Catharanthus roseus*, *Satureja obovata*, *Cleome gynandra*, *Artemisia annual*, *Ruta graveolens*, *Salvia miltiorrhiza*, *Andrographis paniculata*, *Yucca aloifolia*, *Alpinia galanga*, *Thumus piperella* (Bakkali et al., 1997; Zypman et al., 1997; Mujib et al., 1995; Arrebola et al., 1997; Naseem e Jha, 1997; Elhag et al., 1997; John et al., 1997; Buchwald e Pank, 1996; Prathanturarug et al., 1996; Atta e Van, 1997; Anand e Hariharan, 1997; Saez e Pank, 1996).

Não existem relatos disponíveis na literatura sobre a propagação *in vitro* de *Echinodorus cf scaber* Rataj. O objetivo proposto neste trabalho foi viabilizar a multiplicação *in vitro* e estabelecer um protocolo que permita a clonagem da mesma, sempre visando o teor do princípio ativo e apresentando uma alternativa ao processo convencional de propagação.

4.2 Material e Métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Como fonte de explante foram utilizados segmentos nodais provenientes de mudas crescidas no município de Lavras. Estes foram lavados e desinfetados em solução comercial contendo 0,6% de hipoclorito de sódio, $0,2\text{mg.L}^{-1}$ de Benlate e 0,2ml de quimicetina durante 30 minutos sob agitação. Em câmara de fluxo laminar, após a lavagem em água esterilizada, os segmentos foram excisados e inoculados em meio MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com $1,5\text{mg.L}^{-1}$ de BAP e ANA solidificado com ágar a 0,6%.

Mudas então estabelecidas *in vitro* foram submetidas ao experimento no qual segmentos nodais com aproximadamente 0,5cm de tamanho foram excisados e inoculados no meio de cultura em câmara de fluxo laminar. Dois tratamentos foram utilizados: o meio MS ausente de regulador de crescimento e MS suplementado com 6mgL^{-1} BAP solidificado com ágar a 0,6%. Os pHs dos meios foram ajustados para $5,7 \pm 0,1$ antes de serem autoclavados. Os explantes foram incubados a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ em um fotoperíodo de 16 horas-luz sob uma intensidade de luz de 2000 lux ($25\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$). Cada tratamento continha 15 explantes que foram subcultivados duas vezes em um intervalo de 30 dias, no mesmo meio de cultura em que foi avaliados número de raízes, tamanho e número dos propágulos. O delineamento estatístico foi em DIC (delineamento inteiramente casualizado) e teste F ao nível de 5 %.

Estas mesmas plantas, após os 60, dias foram transferidas das condições *in vitro* para a casa de vegetação do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em vasos plásticos com capacidade para 10 litros contendo, como substrato, a mistura da compostagem, Latossolo Vermelho, na proporção 2:1. A irrigação foi feita pelo sistema de nebulização

intermitente. A manutenção do nível de luz na casa de vegetação foi feita com sombrite a 50%. A temperatura na casa de vegetação ficou aproximadamente entre $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

4.3 Resultado e Discussão

O método de desinfestação utilizado foi satisfatório, pois 90% dos explantes foram esterilizados axenicamente.

Por não dispor de um protocolo estabelecido para o cultivo *in vitro* da espécie foi necessário utilizar tentativas. Em estudos preliminares, os segmentos nodais foram inoculados em meio MS suplementados com $1,5\text{mg l}^{-1}$ de BAP e ANA, no qual onde permaneceram durante 7 dias, sendo então transferidos para o meio MS suplementado com 6 mg.l^{-1} de BAP. Estas transferências foi feita por se dispor de uma pequena quantidade de segmentos nodais, com o intuito de obter -se um maior número possível de plântulas.

Nestes primeiros trabalhos considerados “experimentos pilotos” conseguiu-se que os segmentos nodais desenvolvessem-se formando plântulas com brotações desprovidas de raízes, as quais floriram *in vitro*.

A floração *in vitro* é um fenômeno raro, e pode ter ocorrido neste caso por terem sido utilizados segmentos nodais retirados da parte apical da planta matriz, que é mais pré-dispostas à floração. As folhas das plântulas *in vitro* apresentavam-se semelhantes às plantas matrizes: arredondadas e verdes, porém com leve coloração branca amarelada na borda do limbo das folhas jovens. As flores eram de cor branca. (Figura 2).

Os explantes inoculados em meio suplementado com BAP, organizavam-se em forma de rosetas, as quais estas foram individualizadas e transferidas para o mesmo meio de cultivo, em que obteve-se um número satisfatório das mesmas. Nas sucessivas repicagens observou-se que as folhas

das brotações estavam ficando amarelcidas, o que atribuiu-se à alta concentração de BAP que pode ter causado mudanças fisiológicas devido a um desbalanceamento hormonal.

Estas brotações foram então transferidas para o meio MS ausente de regulador de crescimento, onde recuperaram-se, desenvolveram-se normalmente e formaram raízes .

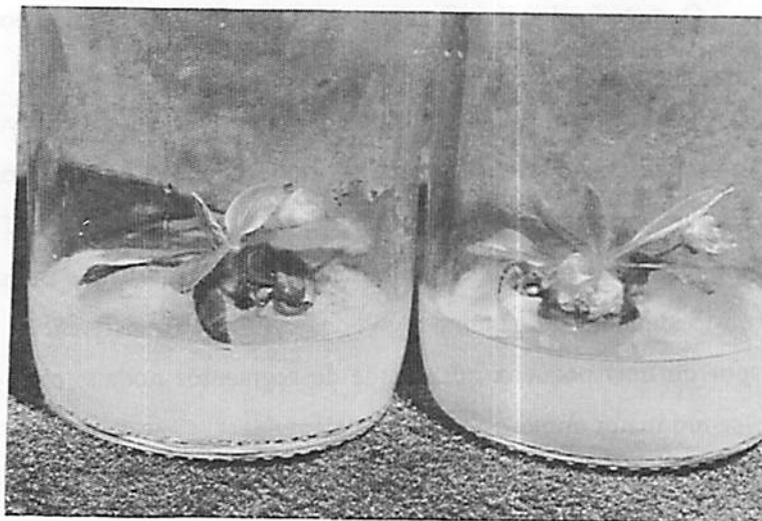


FIGURA 2. Plântulas de chapéu de couro floridas *in vitro*. UFLA, Lavras/MG, 1999.

Das mudas estabelecidas *in vitro* foram separadas trinta. Quinze segmentos nodais com aproximadamente 0,5cm de tamanho foram excisados em meio MS ausente de regulador de crescimento e quinze em meio MS suplementado com 6mg.L^{-1} BAP.

A fonte de variação testada foram as diferentes épocas de repicagens (30 e 60) e tipos de meio (MS e MS+BAP). Quanto à época de repicagem, desejava-se averiguar se as plântulas amareleciam com repicagens sucessivas e quantificar o número de brotações. Os resultados apresentado na Tabela 1 mostram que não houve uma interação significativa quanto às repicagens

efetuadas em diferentes épocas. Os explantes utilizados também mostram não ter havido uma interação significativa entre repicagens efetuadas em diferentes épocas. Os explantes utilizados forneceram plântulas saudáveis, mantiveram constante o tamanho dos explantes iniciais, das brotações fornecidas e do número de raízes.

TABELA 1. Valores de quadrado médio calculado pela análise de variância em função das características observadas (tamanho dos explantes (TE), tamanho médio dos explantes (TAMME), número médio de raízes (N^oMR) e número de raízes (N^oR). UFLA, LAVRAS/MG, 1999

F.V.	TE	TAMMB	N ^o MR	N ^o R
Repicagens	3,008 ^{ns}	0,010 ^{ns}	0,950 ^{ns}	15,391 ^{ns}

^{ns}. não significativo

Com relação ao tipo de meio de cultura o tratamento ausente de regulador de crescimento foi o que obteve maior número de raízes e maior altura dos explantes, os quais apresentavam-se vigorosos, sendo o maior do tamanho de 3,5cm e o menor, de 1,0cm. O maior número de raízes foi 18 e o menor 4. Neste tratamento não ocorreu a indução da formação de brotos.

A queda na altura dos brotos formados e a má formação de raízes no tratamento suplementado com regulador de crescimento foram influenciadas pelo nível de BAP utilizado. Neste tratamento, a partir do explante inoculado obtiveram-se brotações que organizavam-se em forma de roseta. O tamanho do explante após a inoculação atingiu 0,5cm a 1,5cm para o menor e maior tamanho, respectivamente, sendo de 1 a 7, o número de brotações conseguido. O maior número de raízes foi 7, sendo que algumas repetições apresentavam somente 1 e em alguns estavam ausentes (Tabela 2).

Segundo Pierik (1989), as citocininas usualmente promovem a divisão celular. Em altas concentrações ($1-10\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) induzem à formação de brotações mas geralmente inibem a formação de raízes Figura (3).

TABELA 2. Valores de quadrado médio calculados pela análise de variância em função das características observadas (tamanho médio dos explantes TAMME) e número de raízes (N°R). UFLA, LAVRAS/MG, 1999.

F.V.	TAMME	N°R
Meio de cultura	2,095 ^{SIG}	588,099 ^{SIG}
Repi * Meio	0,406 ^{NS}	

^{SIG}. Significativo ao nível de 5%, pelo teste F.

^{NS}. não significativo

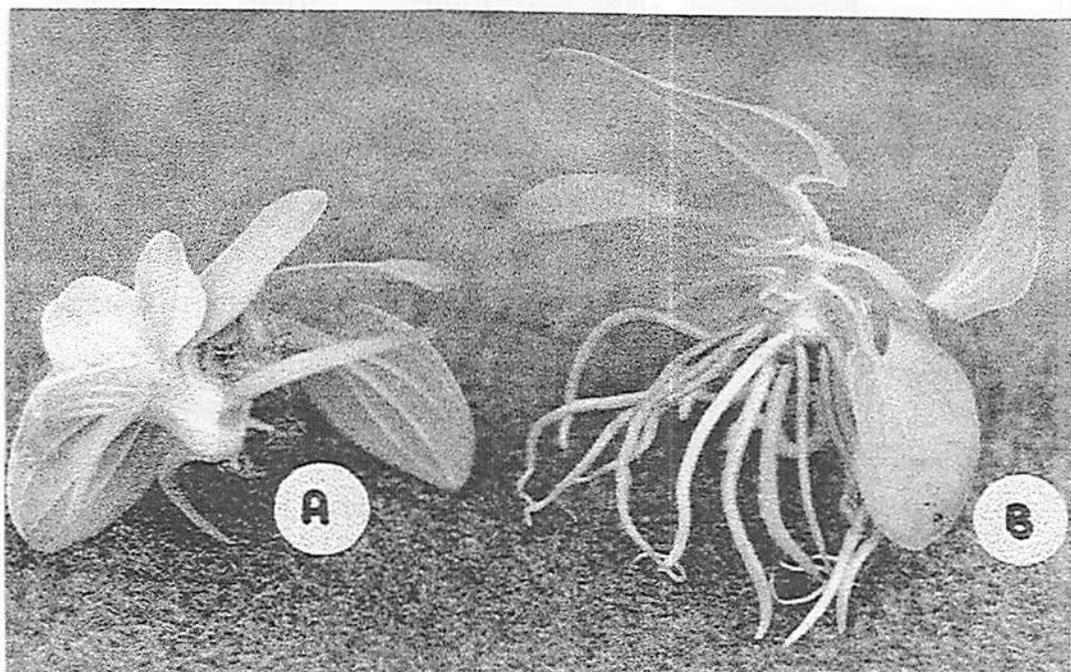


FIGURA 3. Efeito comparativo do meio de cultura MS sob a formação de propágulos de chapéu de couro: A) planta cultivada em meio MS+BAP; B) planta cultivada em meio MS. UFLA, Lavras/MG, 1999.



O crescimento e a morfogênese são fatores controlados pela interação e balanço entre os reguladores de crescimento adicionados ao meio de cultura e as substâncias de crescimento endógenas do explante (George, 1996). Certos genótipos de plantas possuem um balanço hormonal satisfatório, o que faz com que as células sejam predeterminadas a se desenvolverem e, sob certas circunstâncias, consegue-se a regeneração de plantas *in vitro* sem o acréscimo de regulador de crescimento ao meio de cultura. Argollo e Shepherd (1997) também comprovaram isto através de seus estudos quando, utilizando ápices caulinares de *Artemisia annua*, conseguiram um grande número de plantas bem desenvolvidas em meio MS básico.

Saleh e Shepherd (1997) obtiveram resultados semelhantes ao induzirem o desenvolvimento de plântulas de *Clusia nemorosa*; o mesmo ocorreu em estudos com plântulas de *Ipomoea batatas* em que obteve-se a melhor resposta no crescimento e desenvolvimento das mesmas, quando utilizava-se o meio MS sem regulador de crescimento (Martins, 1997).

Hussey e Stacy (1984) e Garner e Blake (1989) chegaram até a induzir o desenvolvimento de tubérculos de batata (*Solanum tuberosum*) em meio de cultura sem regulador de crescimento, modificando o teor de sacarose do meio, e o fotoperíodo.

Já, Lameira (1997) alcançou o melhor enraizamento de propágulos de *Cordia Verbenacea* aos 32 dias após a incubação inicial em meio MS também sem regulador de crescimento, enquanto que em *Strelitzia reginae*, o desenvolvimento radicular ocorre em meio MS, independente da presença de BAP, sem promover diferenças no tamanho das raízes (Paiva, 1998).

Contudo, em termos comerciais a obtenção satisfatória de plântulas *in vitro* sem a necessidade de adicionar regulador de crescimento ao meio de cultura é altamente desejável e vantajosa pois tende a diminuir os custos de produção.



Em decorrência do ambiente convencional necessário para se estabelecer uma planta *in vitro*, os brotos obtidos através de micropropagação apresentaram pequena taxa de crescimento, grande variação de forma, tamanho e estágio de desenvolvimento. A anatomia interna e a ultraestrutura das plantas regeneradas *in vitro* são geralmente diferentes daquelas crescidas em casa de vegetação ou no campo e apresentam vários distúrbios fisiológicos. Por isso depois das mudas terem formado raízes, elas são freqüentemente aclimatizadas antes de serem transferidas para o campo (Kozai e Jeomng, 1992-1994; Debergh e Zimmerman, 1991).

As Figuras 4 e 5 mostram que as plântulas aclimatadas aos 60 dias após o cultivo *in vitro* desenvolveram-se bem, com 100% de pegamento proporcionando mudas de alta qualidade. Consideramos ideais as condições as que foram submetidas, em que a irrigação pelo sistema de nebulização intermitente permitiu manter constantemente úmidos os vasos, figurando o seu habitat natural. A manutenção do nível de luz na casa de vegetação com sombrite a 50% foi eficiente para assegurar que a planta gradativamente pudesse desenvolver suas funções fisiológicas.



FIGURA 4. Plântulas de chapéu de couro aclimatadas após 60 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras/MG, 1999.



FIGURA 5. Plântulas de chapéu de couro, 76 dias após a aclimação. UFLA, Lavras/MG, 1999.

4.4 Conclusões

Nas condições em que o experimento foi conduzido conclui-se que:

- como fonte de explante, os segmentos nodais são eficientes para se estabelecer a planta *in vitro*;
- o meio MS ausente de regulador de crescimento foi o mais eficiente para induzir maior número de raízes e maior altura dos explantes;
- como não ocorreu diferença significativa nas repicagens feitas aos 30 e 60 dias, com 30 dias as plântulas podem ser transferidas para o processo de aclimação.

4.5 Referências Bibliográficas

- ANAND, P.H.M.; HARIHARAN, M. In vitro multiplication of greater galangal [*Alpinia galanga* (Linn.) Willd] - a medicinal plant, *Phytomorphology*, 1997, 45-50 p.
- ARGOLLO, D.M.; SHEPHERD, S.L.K., Cultura de ápices meristemáticos caulineares de *Artemisia annua* . III Jornada Paulista de Plantas Mediciniais, 1997, 72p.
- ARREBOLA, M.L.; SOCORRO, O.; MUNOZ, A.B.; PEREZ, E.S.; ALFARO, F.P. Micropropagation of *Satureja obovata* Lag. *HortScience*, 1997, 1278-1280 p.
- ATTA, H.A.; VAN, J.S. Micropropagation and establishment of *Yucca aloifolia*, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1997, 209-212 p.
- BAKKALI, A.T; JAZIRI, M.; FORIERS, A; VANHAELEN, M.; HOMES, J.; VANDER, HEYDEN-Y. Lawsone accumulation in normal and transformed cultures of henna, *Lawsonia inermis*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1997, 83-87p.
- BUCHWALD, W; PANK, F. Micropropagation and phenolic acids production of *Salvia miltiorrhiza* Bunge, *International symposium. Breeding research on medicinal and aromatic plants, Quedlinburg, Germany. 30 June-4 July, 1996*, 327-329 p.
- DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. *Micropropagation: Technology and Application*. Kluwer Academic Publishers, London, 1991.
- EINSET, J.W. A practical guide to woody plant micropropagation. *Arnoldia, Jamaica Plain*, v.46, 1986, 36-44p.
- ELHAG, H; ABDEL-SATTAR, E; EL-DOMIATY, M.M.; EL-OLEMY, M.M.; MOSSA, J.S. Selection and micropropagation of high artemisinin producing clones of *Artemisia annua* L. Part II. Follow up of the performance of the micropropagated clones, *Arab Gulf Journal of Scientific Research*. 1997, 683-693 p.

- GARNER, N.; BLAKE, J. The Induction and development of potato microtubers in vitro on media free of growth regulating substances. *Annals of Botany*, London, v.63, n.6, June 1989, 663-674p.
- GEORGE, E.F. *Plant propagation by tissue culture, part 1-The Technology*, 2ed. Edington: Exegetics Limited, 1996, 1574p.
- HUSSEY, G.; STACY, N.J. Factors affecting the formation of in vitro tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.) *Annals of Botany*, London, v.53, n.4, April 1984, 565-578p.
- JOHN, S.; ISSAC, C.G.; NAIR, G.M.; EDISON, S.; RAMANA, K.V.; SASIKUMAR, B.; BABU, K.N.; EAPEN, S.J. Micropropagation of *Ruta graveolens* L. through organogenesis and somatic embryogenesis. **Biotechnology of spices, medicinal & aromatic plants. Proceedings of the national seminar on biotechnology of spices and aromatic plants**, Calicut, India, 24-25 April, 1996. 1997, 70-78p.
- KOZAI, T.; JEONG, B.R. Environmental control in plant tissue culture and its applications for micropropagation. In: *Collected papers on environmental control in micropropagation*, v.2, 1992-1994, 518-539p.
- LAMEIRA, O. A. *Propagação in vitro e in vivo, dinâmica de crescimento de células, nutrição e identificação de flavonóides em erva baleeira (Cordia verbenacea L.)* Lavras: UFLA, 1997. 88p. (Tese-Doutorado em Fitotecnia).
- MARTINS, M. *Utilização de anticorpos para caracterização da síntese de esporamina em diferentes tecidos de Ipomoea batatas obtidos de plantas cultivadas in vivo e in vitro*. Lavras: UFLA, 1997. 71p. (Dissertação de mestrado em Fisiologia Vegetal).
- MUJIB, A.; DAS, S.; DEY, S.; BHATTACHARYA, B. Influence of agitation in in vitro cultivation of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don multiple shoot., *Phytomorphology*, 1995, 239-245p.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.15, p.473-479, 1962.
- NASEEM, M.; JHA, K.K. Rapid clonal multiplication of *Cleome gynandra* DC. through tissue culture, *Phytomorphology*, 1997 405-411 p.

- PAIVA, P.D.O, Estabelecimento *in vitro* de estrelícia (*Strelitzia reginae* Ait.) e controle de oxidação com identificação dos compostos liberados no meio de cultura. Lavras: UFLA, 1998. 86p.(Tese doutorado em agronomia)**
- PIERIK, R.L.M. In vitro culture of higher plants. Copyright. 1989, 344p.**
- PRATHANTURARUG, S; SCHAFFNER, W; BERGER, BUTER-K; PANK, F. In vitro propagation of the Thai medicinal plant *Andrographis paniculata* Nees, International symposium. Breeding research on medicinal and aromatic plants, Quedlinburg, Germany. 30 June-4 July, 1996, 304-306 p.**
- SAEZ, F.; PANK, F. Micropropagation of *Thymus piperella*. International symposium. Breeding research on medicinal and aromatic plants, Quedlinburg, Germany. 30 June-4 July, 1996, 311-314 p.**
- SALEH, E.O.L.; SHEPHERD, S.L.K., Estudos de germinação *in vitro* e *ex vitro* de *Clusia nemorosa* (Guttiferae). III Jornada Paulista de Plantas Mediciniais, 1997, 67p.**
- ZYPMAN, S.; ZIV, M.; APPLEBAUM,S.; ALTMAN, A. Tissue culture methods and cloning of the neem tree (*Azadirachta indica*) for bioinsecticide production. Proceedings of the third international ISHS symposium on *in vitro* culture and horticultural breeding, Jerusalem, Israel, 16-21 June, 1996. *Acta-Horticulturae*. 1997, No. 447, 235-236p.**

5 CAPÍTULO II

EFEITO DO REGULADOR DE CRESCIMENTO NA ANATOMIA DE FOLHAS DE *Echinodorus cf scaber* RATAJ *IN VITRO*.

RESUMO

A espécie *Echinodorus cf scaber* é uma planta nativa do Brasil conhecida popularmente como chapéu de couro. A utilização de suas folhas na forma de chá ou infusão tem eficiente ação diurética, antiofídica, antireumática e antiinflamatória. Pouco se sabe da anatomia de plântulas micropropagadas e de plantas transplantadas. Segmentos nodais de plantas *in vitro* foram excisadas e inoculadas em meio básico de MS suplementados com 0,0; 1,0; 2,0; e 4.0mg.L⁻¹ de BAP. Foi avaliado o número de brotações, raízes, folhas e tamanho do explante. O número de brotações e folhas aumentou com níveis de BAP, porém o tamanho de brotações e de raízes diminuiu. O tratamento mais eficiente foi com 1.0mg.L⁻¹ de BAP. As amostras de folhas destes tratamentos e de folhas de plantas cultivadas em casa de vegetação foram usadas para estudos anatômicos. Pela análise histológica mostrou diferenças entre os tratamentos.

*Orientadora: Maria das Graças Cardoso - UFLA, José Eduardo Brasil Pereira Pinto – UFLA (Co-orientador)

5 CHAPTER II

EFFECT OF THE GROWTH REGULATOR ON THE ANATOMY OF LEAVES OF *Echinodorus cf scaber* RATAJ *IN VITRO*.

ABSTRACT

The specie *Echinodorus cf scaber* is a plant native to Brazil popularly known as "leather hat". The use of its leaves as tea or infusion possesses diuretic, antiophidian, antirheumatic and antinflammatory. Little is known about the anatomy of micropropagated plants and of transplanted plants. Nodal segments of *in vitro* plants were inoculated in basic MS medium supplemented with 0.0; 1.0; 2.0; 4.0mg.L⁻¹ of BAP. Number of sproutings, roots, leaves and explant size. The shoot number and leaves increased with levels of BAP, but the size of shoot and number of roots decreased. The most efficient treatment was with 1.0 mg.L⁻¹ of BAP. The number of sproutings and leaves increased with BAP levels but the size of sprouts and roots decreased. The most efficient treatment was with 1,0mg.L⁻¹ of BAP. The leaf sample of these treatments and of leaves from plants grown in greenhouse were used for anatomical studies by histological analysis, differences among the treatments were shown.

*Adviser: Maria das Graças Cardoso - UFLA, José Eduardo Brasil Pereira Pinto - UFLA (Co-adviser)

5.1 Introdução

A propagação de plantas *in vitro* vem despontando como um método alternativo, altamente eficaz e vantajoso para a multiplicação de plantas. Destaca-se a sua aplicação para hibridização e desenvolvimento de novos cultivares, na recuperação de substâncias farmacêuticas, na multiplicação segura de cultivares desejáveis, na propagação rápida com alto coeficiente de multiplicação e como auxiliar na salvaguarda do patrimônio genético de plantas ameaçadas pela exploração humana.

Através das pesquisas em plantas propagadas *in vitro*, consegue-se a demonstração da totipotencialidade das células vegetativas, que auxilia estudos citogenéticos, possibilita investigações nos processos morfológicos, proporciona o estudo do desenvolvimento de órgãos isolados observando as influências correlativas de outros tecidos em desenvolvimento e ainda desempenha papel fundamental nas pesquisas dos reguladores de crescimento (Simões, 1988). Plantas propagadas *in vitro* são freqüentemente afetadas pela presença de vários fatores do meio de cultura que conduzem a degenerações metabólicas e morfológicas. Os requerimentos especiais para a proliferação de brotos *in vitro*, como a alta umidade, superfluxo de fatores nutricionais, alto níveis de reguladores de crescimento e baixa intensidade de luz induzem à má formação dos mesmos (Ziv, 1986; Gaspar et al. 1987). Assim, quase sempre é requerida a utilização dos reguladores de crescimento, pois estes controlam certas respostas em tecidos de plantas e muito estudos tem sido realizado sobre este fenômeno (Mantell, Matthews e Mckee, 1994). A utilização das citocininas visa promover a divisão celular. Em altas concentrações (1-10mg.L⁻¹) induzem à formação de brotações e, geralmente, inibem a formação de raízes (Pierik, 1989).

O estudo das estruturas internas das várias partes de um vegetal iniciou-se há 300 anos, com trabalho de Grew e Malpighi que faziam estudos

comparativos sazonais e de desenvolvimento da planta inteira (Carlquist, 1961). A anatomia vegetal comparativa se faz necessária em várias aplicações além da botânica ortodoxa, como em farmacognosia, medicina forense e arqueologia ou paleoetnobotânica (Cutter, 1987).

Pouco se sabe da anatomia de órgãos vegetativos de plântulas micropropagadas, como são afetadas pelas condições ambientais de cultivo ou como a anatomia de plantas transplantadas são modificadas durante a aclimação antes de serem levadas para ambientes de campo.

A família Alismataceae é constituída por plantas de hábito aquático ou brejoso. São reconhecidas 38 espécies de *Echinodorus*, cujas folhas são utilizadas com fins terapêuticos. Apesar de muitas espécies deste gênero serem conhecidas, sua identificação é dificultada por apresentar características morfológicas muito próximas e por ocorrer cruzamento entre as mesmas, formando híbridos de diversas formas (Rataj, 1978).

Observações anteriores sobre a descrição anatômica em plantas de *Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Micheli cultivadas *in vivo* indicaram a ausência de pêlos totores e glandulares na epiderme. Vistas de face, mostram-se formadas por células alongadas, de paredes finas e levemente sinuosas, apresentando numerosos estômatos circundados, geralmente, por quatro células. A epiderme das nervuras é formada por células retangulares, alongadas no sentido longitudinal e dispostas em filas paralelas. O mesofilo é constituído de parênquima frouxo, de células ovais ou arredondadas. Feixes vasculares delicados podem ser observados nesta região e a nervura mediana é constituída de vários feixes vasculares de contorno arredondado, envoltos por um parênquima fundamental, constituído de células isodiamétricas dispostas de modo a deixar grandes lacunas entre elas. O mesofilo e o tecido fundamental da nervura apresentam raros cristais prismáticos (Oliveira, 1991).

A finalidade do presente trabalho foi viabilizar a melhor dosagem de BAP para a multiplicação *in vitro* sem, no entanto, promover grandes alterações celulares, pois alterações ocorridas na morfologia foliar podem influenciar nos processos metabólicos e fisiológicos associados principalmente com a fotossíntese e transpiração, o que pode trazer alterações no princípio ativo.

5.2 Material e Métodos

O experimento foi realizado no Departamento de Agricultura e no Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Utilizou-se a cultura nodal proveniente de explantes obtidos a partir plântulas *Echinodorus scaber* Rataj estabelecidas *in vitro* em meio MS sem regulador de crescimento. Em câmara de fluxo laminar as plântulas que foram classificadas como sendo grandes e verdes, grandes e amarelas, pequenas e amarelas foram excisadas e os segmentos nodais foram inoculados em meio MS suplementado com 0,0; 1,0; 2,0; 4,0mg.L⁻¹ de BAP, solidificado com ágar a 0,47% e pH 5,7 ± 0,1 antes de serem autoclavados.

Os explantes foram incubados a 26 ± 1°C em um fotoperíodo de 16 horas-luz sob uma intensidade de luz de 2000 lux (25µmol m⁻² s⁻¹) em sala de crescimento.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), sendo que em cada tratamento continha 15 repetições. Aos 30 dias avaliou-se o número de brotações, número de raízes, número de folhas e tamanho do explante.

Foram retiradas amostras para estudos anatômicos de folhas provenientes destes tratamentos e de folhas oriundas de plantas cultivadas em casa de vegetação que estavam plantadas em vasos com capacidade para 10

litros, contendo como substrato a mistura de compostagem e Latossolo vermelho na proporção 2:1. A irrigação foi feita pelo sistema de nebulização intermitente.

As folhas foram então colocadas para fixação em F.A.A (5%formol, 5%ácido acético e 90%de álcool etílico70%), durante 72 horas, sendo posteriormente desidratadas em álcool etílico, diafanizadas em xilol, embebidas e emblocadas em parafina (Joahansen, 1940; Sass, 1951; Beça e Paulete, 1976).

Para o preparo de lâminas permanentes foram utilizadas as técnicas usuais de inclusão em parafina após desidratação em série alcoólica etílica (Joahansen, 1940; Sass, 1951). Os cortes foram efetuados com o auxílio de micrótomo rotativo, em série oriundas transversalmente e submetidos ao processo de coloração com safranina-azul de astra. A montagem final foi feita utilizando-se a resina Entellan (Joahansen, 1940; Sass, 1951; Jensen, 1962).

Foram efetuados também cortes a mão livre, com auxílio de lâmina de barbear e inclusão do material em isopor, sendo estes submetidos à clarificação em solução de hipoclorito de sódio comercial a 20% de produto comercial por período de três a cinco minutos. Os cortes foram, em seguida, neutralizados em ácido acético a 5% por um minuto. A coloração se deu com imersão em corante verde iodo acético por dois a três minutos, seguindo-se três lavagens em água destilada e imersão em corante vermelho congo por três a cinco minutos, repetindo-se as lavagens.

Estes materiais foram fotografados e, a partir das análises visuais na região mediana das secções transversais da folha na nervura principal, podem-se observar as alterações ocorridas nas características citológicas.

5.3 Resultado e Discussão

Quando os explantes secundários foram inoculados em meio MS ausente de regulador de crescimento (T1), observou-se que não houve a formação de brotações. Segundo Pinto e Pasqual (1990), certos tecidos sintetizam as quantidades de reguladores que necessitam, enquanto outros são totalmente dependentes da adição exógena. O material vegetativo para multiplicar pode ser enquadrado em quatro categorias: ausente de regulador, presença de citocininas, presença de auxina, interação entre auxina e citocininas.

Neste caso, o material vegetativo necessitou da presença de citocinina para que ocorresse a proliferação de brotos. Os segmentos nodais cultivados em meio suplementado com BAP formaram brotações e estas foram induzidas em todos os tratamentos onde o BAP foi utilizado. O maior número de brotos foi obtido quando houve um acréscimo nos níveis de BAP (Figura 5).

Entre os tratamentos, o meio MS que continha $4,0\text{mg.L}^{-1}$ de BAP (T4) foi o que apresentou maior número de brotações; de 5 a 19. No tratamento que continha $1,0\text{mg.L}^{-1}$ de BAP (T2) constatou-se de 3 a 10 brotações; já no tratamento com $2,0\text{mg.L}^{-1}$ de BAP (T3) obteve-se de 1 a 14 brotações (Figura 6).

As plântulas utilizadas para montar o experimento foram selecionadas de acordo com o tamanho e coloração: grandes e verdes (GV) pois possuíam suas folhas verdes e tinham $\pm 1,5\text{cm}$; as grandes e amarelas (GA) possuíam suas folhas amarelas e tinham $\pm 1,5\text{cm}$; as pequenas e amarelas (PA) possuíam suas folhas amarelas e tinham $\pm 0,5\text{cm}$. Todas encontravam-se inoculadas em meio MS ausente de regulador de crescimento.

Observou-se que ocorreu significância na formação de brotos nas avaliações dos diferentes tipos de plântulas. Assim deduz-se que plantas grandes e verdes e grandes e amarelas proporcionaram o melhor desenvolvimento dos brotos, enquanto plântulas pequenas e amarelas foram menos satisfatórias. No

meio MS, que continha $4,0\text{mg.L}^{-1}$ de BAP (T4), a partir de uma plântula GV o maior número de brotações alcançado foi 19; em plântula GA, o maior número de brotações obtido foi 12; para plântula PA o maior número de brotações foi 6. No tratamento que continha $1,0\text{mg.L}^{-1}$ de BAP (T2) em plântula GV, o maior número de brotações alcançado foi 10; em plântula GA o maior número de brotações obtido foi 5; para plântula PA o maior número de brotações foi 5. Para o tratamento com $2,0\text{mg.L}^{-1}$ de BAP (T3) em plântula GV o maior número de brotações alcançado foi 14; em plântula GA o maior número de brotações obtido foi 13; para plântula PA o maior número de brotações foi 2 (Figura 7 e 8).

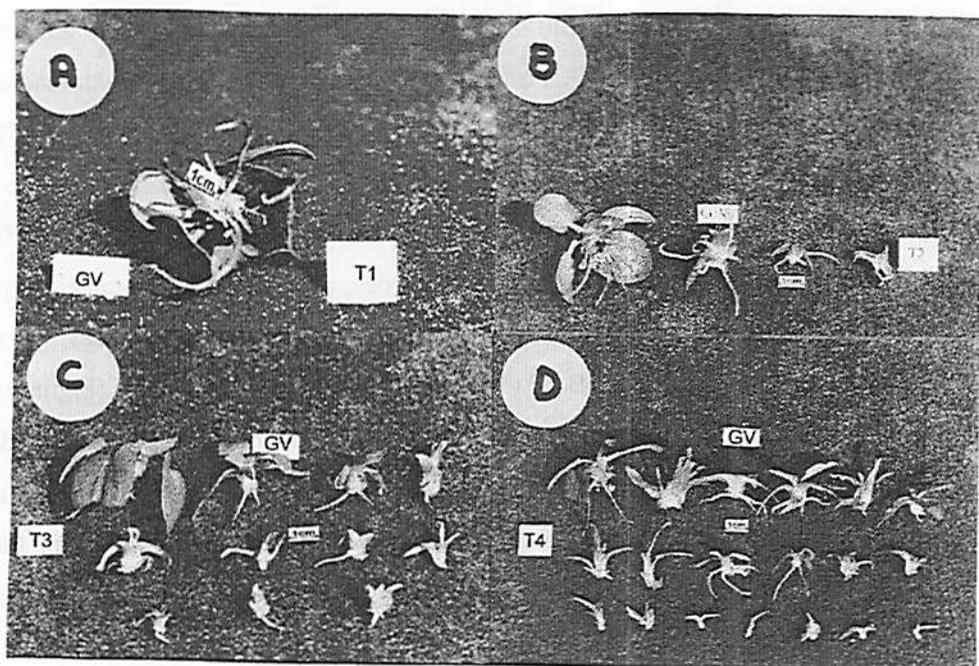


FIGURA 6. Número de brotações formadas a partir de segmentos nodais de chapéu de couro cultivados *in vitro* em diferentes concentrações do meio MS A) meio MS ausente de regulador de crescimento; B) meio MS+ $1,0\text{mg.L}^{-1}$; C) meio MS+ $2,0\text{mg.L}^{-1}$; D) Meio MS+ $4,0\text{mg.L}^{-1}$. UFLA, Lavras/MG, 1999.

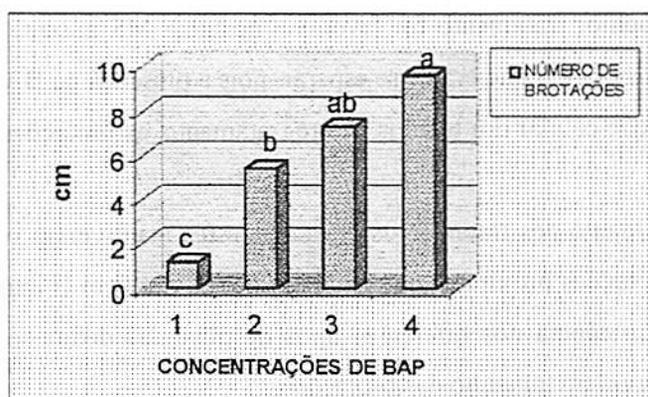


FIGURA 7. Efeito do BAP no desenvolvimento *in vitro* de brotações de chapéu de couro 1) meio MS ausente de regulador de crescimento; 2) meio MS+1,0mg.L⁻¹; 3) meio MS+2,0mg.L⁻¹; 4) meio MS+4,0mg.L⁻¹. UFLA, Lavras/MG, 1999.

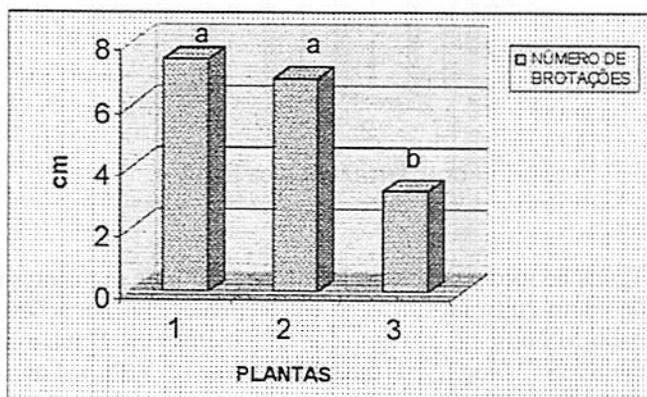


FIGURA 8. Efeito do BAP no desenvolvimento *in vitro* de brotações de chapéu de couro 1) grandes e verdes (GV); 2) grandes e amarelas (GA) 3) pequenas e amarelas (PA) UFLA, Lavras/MG, 1999.

O caráter tamanho médio das brotações teve efeito significativo, mostrando redução gradativa com a incorporação de doses crescentes de BAP no meio. O melhor tratamento foi favorável no meio MS ausente de regulador de crescimento (T1), o que era de se esperar, pois a presença de BAP no meio induz a proliferação celular dos tecidos. Neste tratamento, as brotações atingiam de 0,5 a 1,5cm.

Quanto aos tratamentos restantes, estes mantiveram o tamanho médio de suas brotações próximos, que atingiam de 0,2 a 1,0cm (Figura 9). Como não houve significância nos diferentes tipos de plântulas deduz-se que as mesmas não interferem no tamanho das brotações.

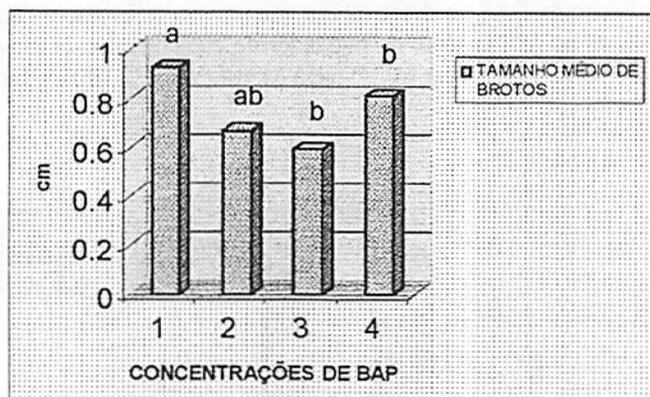


FIGURA 9. Tamanho médio de brotos formadas a partir de segmentos nodais de chapéu de couro cultivados *in vitro* em diferentes concentrações do meio MS. 1) meio MS ausente de regulador de crescimento; 2) meio MS+1,0mg.L⁻¹; 3) meio MS+2,0mg.L⁻¹; 4) meio MS+4,0mg.L⁻¹. UFLA, Lavras/MG, 1999.

Com relação ao número de folhas, o tratamento sem regulador de crescimento (T1) foi o que apresentou menos, porém estas eram maiores, de cor verde intenso, arredondadas, apresentando-se bem característica da espécie.

Neste tratamento o número de folhas contadas da planta toda chegou a ser de 4 a 15 para o menor e maior número, respectivamente.

Nos demais tratamentos, como ocorreu a formação de brotações e estas organizavam-se em forma de roseta, a tendência foi de um acréscimo no número de folhas, à medida em que se adicionou BAP no meio de cultivo. Contudo ocorreram modificações no formato das folhas que apresentavam-se alongadas, estreitas, pequenas e amarelecidas à medida em que se incorporava doses crescentes de BAP.

O tratamento que continha $4,0\text{mg.L}^{-1}$ de BAP (T4) e o tratamento com $2,0\text{mg.L}^{-1}$ de BAP (T3) foram o que apresentaram maior número de folhas. Nestes tratamento foram obtidas rosetas que continham 63 (T4) e 60 (T3) folhas para o maior número e 22 (T4) e 14 (T3) folhas para o menor número. Pode-se definir que o meio com $1,0\text{mg.L}^{-1}$ de BAP (T2) seja o tratamento intermediário, pois nele foram obtidas rosetas com 32 folhas para o maior número e 10 para o menor número

Não houve diferença significativa quanto aos diferentes tipos de plântulas utilizados. Infere-se que o tipo de plântula não compromete na formação de folhas, pois em todos os tratamentos houve a presença delas, ainda que deformadas, o que se atribui a divisões celulares provocadas pelo BAP (Figura 10).

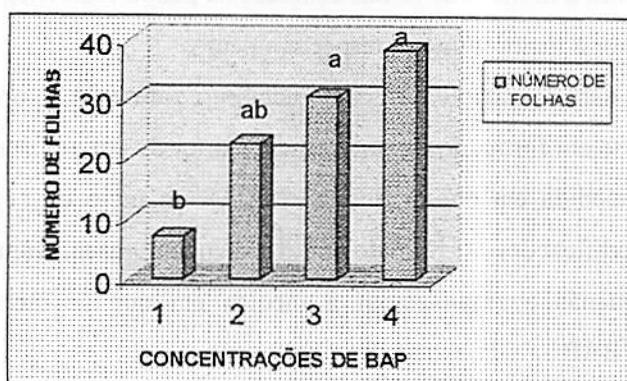


FIGURA 10. Número de folhas formadas em brotações de chapéu de couro cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações do meio MS. 1) meio MS ausente de regulador de crescimento; 2) meio MS+1,0mg.L⁻¹; 3) meio MS+2,0mg.L⁻¹; 4) meio MS+4,0mg.L⁻¹. UFLA, Lavras/MG,1999.

Para o caráter número de raízes, os tratamentos sem regulador de crescimento (T1) e o tratamento que continha 1,0mg.L⁻¹ de BAP (T2) foram os que promoveram o maior crescimento delas entretanto, o tratamento T2 foi mais eficiente, no qual o menor número de raízes obtido foi 5 e o maior 37; para o tratamento T1 o menor número de raízes obtido foi 6 e o maior 30. O esperado era que o meio ausente de regulador apresentasse a melhor resposta para esta variável. É provável que o BAP na concentração de 1,0mg.L⁻¹ (T2) seja o mais indicado para induzir a formação de raízes, pois estas mantiveram suas características morfológicas idênticas àquelas crescidas em meio MS ausente de regulador de crescimento (T1) (Figura 11).

À medida que o regulador de crescimento foi acrescido ao meio de cultivo, observou-se que o número de raízes tendeu a diminuir; no tratamento com 2,0mg.L⁻¹ de BAP (T3) o menor número de raízes obtido foi 7 e o maior 21; o tratamento com 4,0mg.L⁻¹ de BAP (T4) obteve 1 para o menor número de

raízes e o maior 12, mas na maioria das repetições deste tratamento apresentavam-se ausente de raízes.

Como não houve significância nos diferentes tipos de plântulas conclui-se que as mesmas não interferem na formação de raízes.

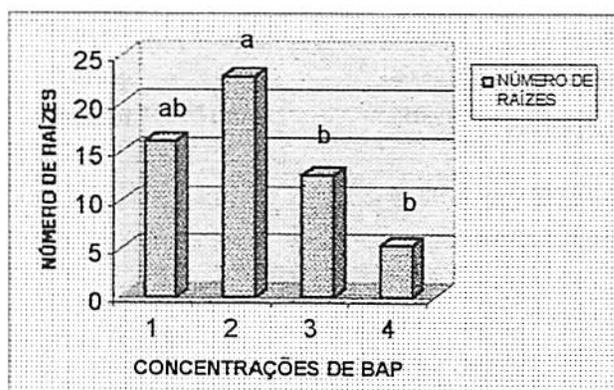


FIGURA 11. Número de raízes formadas em brotações de chapéu de couro cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações do meio MS. 1) meio MS ausente de regulador de crescimento; 2) meio MS+1,0mg.L⁻¹; 3) meio MS+2,0mg.L⁻¹; 4) meio MS+4,0mg.L⁻¹. UFLA, Lavras/MG, 1999.

Na Tabela 3 encontram-se os dados obtidos pela análise estatística realizada no experimento, o qual avaliou o efeito das diferentes concentrações de BAP (0; 1,0; 2,0; 4,0mg.L⁻¹), em meio MS para diferentes tipos de plântulas (GV, GA, PA). Observa-se que para o parâmetro que avaliou as diferentes concentrações, houve diferença significativa para as variáveis analisadas. Quanto ao tipo de plântula utilizada só houve significância para a variável número de brotações. Não houve diferença significativa quando se comparam as diferentes concentrações utilizadas com os diferentes tipos de meio. A partir dos dados da análise estatística, confirma-se o que foi descrito anteriormente.

TABELA 3. Valores de quadrado médio calculado pela análise de variância em função das características observadas (número de raízes (NR), número de folhas (NF), número de brotações (NB), tamanho médio dos brotos (TMB). UFLA, LAVRAS/MG, 1999.

Parâmetro	NR	NF	NB	TMB
Doses	304,634 ^{SIG}	1436,218 ^{SIG}	115,687 ^{SIG}	0,216 ^{SIG}
Plantas	108,681 ^{NS}	611,072 ^{NS}	58,610 ^{SIG}	0,012 ^{NS}
Doses*plantas	29,056 ^{NS}	233,241 ^{NS}	16,282 ^{NS}	0,045 ^{NS}

^{SIG}. Significativo ao nível de 5%

^{NS}. não significativo

Efeito do regulador de crescimento no desenvolvimento celular em folhas de chapéu de couro

A partir das análises dos cortes realizados na região mediana das seções transversais da folha (Tabela 4), observou-se a nervura principal de plantas provenientes de casa de vegetação, plântulas grandes e verdes (GV), grandes e amarelas (GA), pequenas e amarelas (PA), propagadas *in vitro* cultivadas em meio MS ausente de regulador de crescimento (T1); meio MS suplementado com 1,0mg.L⁻¹ (T2); meio MS suplementado com 2,0mg.L⁻¹ (T3); meio MS suplementado com 4,0mg.L⁻¹(T4).

TABELA 4. Análise dos cortes efetuados na região mediana das seções transversais em folhas de plântulas chapéu de couro cultivadas *in vitro* UFLA, LAVRAS/MG, 1999.

BAP mg.L ⁻¹	FEIXES ACESSÓRIOS			FEIXE CENTRAL			TOTAL FEIXES			AERÊNQUIMAS DESENVOLVIDOS
	GV	GA	PA	GV	GA	PA	GV	GA	PA	
0	1	3	3	1	1	1	2	4	4	++++
1	3	3	3	1	1	1	4	4	4	++++
2	2	1	1	1	1	1	3	2	2	++
4	1	-	-	1	1	1	2	1	1	+

+ Desenvolvimento de aerênquimas

Em plantas provenientes de casa de vegetação, a epiderme da nervura principal em qualquer das duas faces é unisseriada e não foram observados tricomas; após a epiderme, na face adaxial e abaxial, observamos células parenquimatosas de paredes finas com pequenos espaços intercelulares, apresentando um feixe vascular central e três feixes vasculares acessórios. Os feixes vasculares são do tipo colateral.

Plantas classificadas como sendo grandes e verdes, de modo geral, apresentaram epiderme unisseriada, ocorrendo diferenciação no tecido paliçádico e lacunoso: 1 camada de tecido paliçádico e 5-6 camadas de tecidos lacunoso, compacto e arredondado. Na maioria dos tratamentos não foi observada a presença de tricomas. Os feixes vasculares são do tipo colateral, entretanto, nas plantas deste mesmo porte inoculadas em meio MS ausente de regulador de crescimento, a epiderme da nervura principal apresentou dois feixes vasculares: 1 feixe central e 1 feixe acessório. Ocorreu a presença de aerênquima, estando bem desenvolvido, enquanto as plantas inoculadas em meio suplementados com $1,0\text{mg.L}^{-1}$ de BAP, a epiderme da nervura principal apresentou quatro feixes vasculares: 1 feixe central e 3 feixes acessórios. Ocorreu a presença de aerênquima, estando menos desenvolvido do que o anterior.

Nas plantas inoculadas em meio suplementado com $2,0\text{mg.L}^{-1}$ de BAP, a epiderme da nervura principal apresentou três feixes vasculares: 1 feixe central e 2 acessórios, constatando-se a presença de aerênquima menos volumoso que os anteriores. Em plantas inoculadas em meio suplementado com $4,0\text{mg.L}^{-1}$ de BAP, a epiderme da nervura principal apresentou dois feixes vasculares: 1 feixe central e 1 acessório. O aerênquima estava quase inexistente, porém em alguns pontos foram observados tricomas secretores.

Nas plantas classificadas como grandes e amarela, observa-se, em todas as concentrações, que a epiderme da nervura principal em qualquer das duas faces foi unisseriada; não foram observados tricomas. Após a epiderme, na face adaxial e abaxial, observamos células parenquimatosas de paredes finas, com pequenos espaços intercelulares. Foi observado o início de diferenciação dos tecidos fotossintetizantes com 1 camada de tecido paliçádico, 5-6 camadas de tecido lacunoso. Somente o tratamento com $2,0\text{mg.L}^{-1}$ de BAP apresentou 8 camadas de tecido lacunoso. Os feixes vasculares são do tipo colateral.

Folhas provenientes do tratamento ausente de regulador de crescimento e com 1mg.L^{-1} de BAP apresentaram: 1 feixe vascular central e 3 feixes vasculares acessórios. O tratamento com $2,0\text{mg.L}^{-1}$ de BAP apresentou 1 feixe vascular central e 1 feixe vascular acessório, enquanto que o tratamento com $4,0\text{mg.L}^{-1}$ de BAP apresentou apenas 1 feixe vascular central.

Na Figura 12(a), 12(b), 12(c) notam-se formações de aerênquimas bem desenvolvidos, apresentando diferenças somente quanto à forma mais arredondada em folhas provenientes de plantas cultivadas em casa de vegetação se comparadas com plantas *in vitro*. Observando a Figura 12(d), nota-se que esses tecidos apresentaram espaços intercelulares menos volumosos, enquanto que na Figura 12(e) o aerênquima apresentou-se quase que inexistente.

Para as plantas classificadas como pequenas e amarelas, respondeu da mesma maneira que uma planta grande amarela onde a epiderme da nervura principal em qualquer das duas faces foi unisseriada e não foi observada a presença de tricomas, havendo início de diferenciação dos tecidos. Na face adaxial e abaxial observamos células parenquimatosas de paredes finas com pequenos espaços intercelulares. Os feixes vasculares são do tipo colateral.

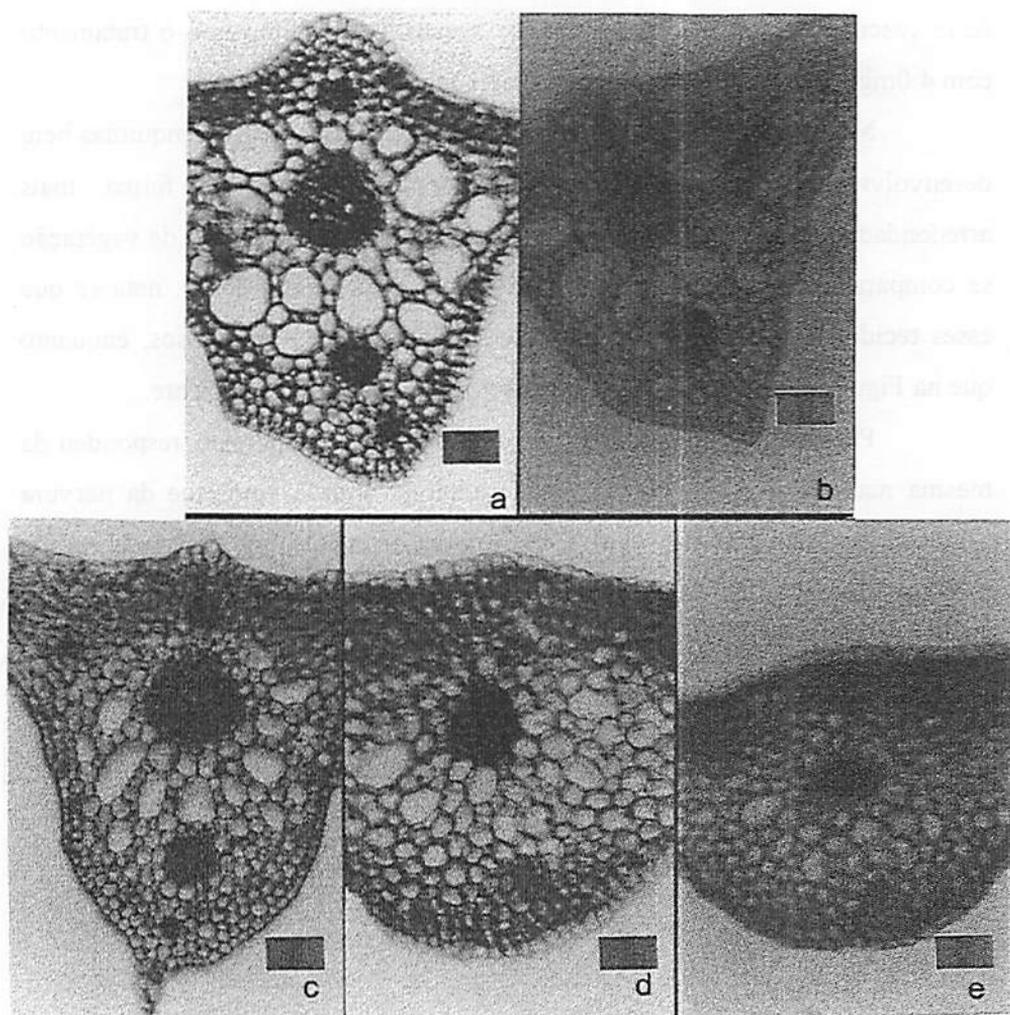


FIGURA 12. Corte transversal da lâmina foliar de chapéu de couro *in vitro*. Aspecto geral do mesofilo na região mediana. (escala=50 μm). a) folhas de plantas do campo; b) folhas de plantas cultivadas em meio MS sem regulador de crescimento; c) folhas de plantas cultivadas em meio MS+1mg.L⁻¹ d) folhas de plantas cultivadas em meio MS+2mg.L⁻¹ e) folhas de plantas cultivadas em meio MS+4mg.L⁻¹. Lavras/MG, 1999.

5.4 Conclusões

Nas condições em que os trabalhos foram realizados conclui-se que:

- a medida que se aumenta a concentração de BAP no meio de cultura os espaços intercelulares apresentavam-se menos volumosos e o aerênquima apresentava-se quase que inexistente o que se atribui a diminuição no tamanho das brotações, a má formação de raízes, e das folhas que conseqüentemente encontravam-se não funcionais;

- a concentração de $4,0\text{mg.L}^{-1}$ BAP no meio MS é a mais eficiente para se obter a taxa de multiplicação de brotos, porém, estes, antes de serem levados para a aclimação, devem ser repicados no meio MS sem regulador, para se obter um melhor desenvolvimento foliar e radicular das brotações tomando-as funcionais preparadas para serem aclimatadas. De forma comercial, o meio MS adicionado 1mg.L^{-1} BAP seria o mais indicado pois nele consegue-se um número satisfatório de brotações com uma boa formação das folhas e enraizadas, diminuindo assim os custos;

- independente do tipo de plântulas utilizadas, todas desenvolveram-se bem nas concentrações utilizadas, em que somente aquelas pequenas amarelas comprometeram a indução de brotações.

5.5 Referências Bibliográficas

- BEÇA, W.; PAULETTE, J. **Técnicas de citologia e histologia**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1976.v1, 305p.
- CUTTER, E.G.; **Anatomia Vegetal**. São Paulo: Livraria Rocca, 1987. Pt. 1-2.
- CARLQUIST, S., **Comparative Plant Anatomy**. Holt, Rinehart and Winston, New York.1961
- GASPAR, T.; KEVERS, C.; DEBERGH, P.; MAENE, L.; PAQUES, M.; BOXUS, P. Vitrification: Morphological, Pysiological and ecological aspects. In: Bonga J.M.; Durzan D.J.(eds) **Cell and Tissue Culture in Florestry**, v.1, Martinus Nijhoff Publ, Dordrecht, Holland, 1987, 152-166p.
- JENSEN, W.A. **Botanical microtechnique**. McGraw Hill, 1962. 408p.
- JOHANSEN, D.A. 1940. **Plant Microtechnique**. New York: McGraw Hill, 1940. 523 p.
- MANTELL, S.H.; MATTHEWS, J.A.; McKEE R.A.; **Principle of Plant Biotechnology Introduction to Genetic Engineering in Plants**. Copyright. 1994, 333p.
- MURASHIGE,T.; SKOOG, F.A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, 1962, 473-479 p.
- PIERIK, R.L.M. **In vitro culture of higher plants**. Copyright. 1989, 344p.
- PINTO, J.E.B.P.;PASQUAL, M. **Introdução a Cultura de Tecidos**, LAVRAS: ESAL. 1990. 73p. (Apostila).
- RATAJ, K. **Alismatácea of Brazil**. *Acta Amazonica*, Manaus, 8 (1): Suplemento 1 Mar. 1978. 53 p.
- SASS, J. **Botanical microtechnique**. Iowa College, 1951. 228 p.
- SIMÕES, M.O.M. **Ontogênese de gemas e raízes adventícias de *Citrus sinensis* (Linn.) Osbeck cv Pêra cultivadas in vitro**. Viçosa: UFV, 1988. 56 p (Dissertação Mestrado em Fisiologia Vegetal).

ZIV, M. In Vivo hardening and acclimatization of tissue culture plants. In Withers, L.A; Alderson, P.G. (eds.) Plant Tissue Culture and its Agricultural Applications. Butterworths, London. 1986. 187-196 p.

6 CAPÍTULO III

METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO, ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS EM PLANTAS DE *Echinodorus cf scaber* RATAJ

RESUMO

O chapéu de couro (*Echinodorus cf scaber* Rataj) é uma planta nativa que apresenta propriedades medicinais. Este trabalho teve por objetivo estabelecer um protocolo que permita identificar e isolar o seu princípio ativo através das técnicas de extrações cromatográficas (CCD e CLC), IV, CG/EM. O extrato hidroalcoólico foi obtido através de folhas verdes coletadas na região de Lavras, as quais foram maceradas e colocadas em metanol durante 6 dias. Concentrou-se em evaporador rotatório, sob pressão a 50°C. Posteriormente, o resíduo foi submetido a um processo de separação líquido - líquido com solventes de polaridades crescentes: hexano, clorofórmio, diclorometano, acetato de etila e butanol. As frações obtidas foram novamente concentradas e os resíduos foram dissolvidos em seus respectivos solventes de modo a se obter uma concentração que fosse possível aplicar em placas de sílica gel G 60 Merck (CCD). O desenvolvimento cromatográfico procedeu-se de forma unidimensional e ascendente nas várias misturas de solventes, cujo melhor resultado foi com clorofórmio/metanol (10:1). Posteriormente as mesmas frações foram submetidas a uma coluna cromatográfica em sílica gel 60, 70-230 mesh, eluída nos solventes: clorofórmio, acetato de etila, hexano, metanol, ácido acético e água. Coletaram-se frações de 30 ml, sendo que cada uma delas, após evaporação dos solventes, foi usada em CCD, utilizando-se diferentes proporções de metanol e clorofórmio na fase móvel, constatando a pureza das substâncias. As mesmas foram reunidas e enviadas para a análise em IV e CG/EM. Resultados :

Amostra 7: Solúvel em hexano, eluída em ácido acético

R_f: 0,74(98:2) metanol/clorofórmio. Revelação : Iodo

IV:νKBr (cm⁻¹): 3500-2900 , 1685-1654 , 1508 , 1022

EM: mz: 129 (100%); 57 (75%); 55 (64%); 70 (45%); 112 (28%); 147 (22%)

Amostra 12: Solúvel em acetato de etila, eluída em ácido acético

R_f: 0,76(98:2) metanol/clorofórmio. Revelação : Iodo

IV:νKBr (cm⁻¹): 3600-2900 , 1685-1654 , 1508 , 1024

EM: mz: 129 (100%); 77 (5,0%); 112 (4,0%); 149 (7,0%); 55 (3,2%); 147 (18%); 149 (73%)

Amostra 20 : Solúvel em hexano, eluída em água

R_f: 0,74(95:2) metanol/clorofórmio. Detectada em luz UV na faixa de 360 nm

IV:νKBr (cm⁻¹): 3600-3406 , 1654-1620 , 1167

EM: mz: 57 (100%); 55 (98%); 56 (66%); 71(42%); 69 (27%); 83 (29%); 82 (15%); 98 (8%)

***Orientadora: Maria das Graças Cardoso - UFLA, José Eduardo Brasil Pereira Pinto-UFLA (Co-orientador)**

6 CHAPTER III

METHODOLOGY OF EXTRACTION, ISOLATION AND IDENTIFICATION DOS CHEMICAL CONSTITUENTS IN PLANTS OF *Echinodorus cf scaber* RATAJ

ABSTRACT

Leather hat (*Echinodorus cf scaber* Rataj) is a native plant which presents medicinal properties. This work aimed to establish a protocol which enables to identify and isolate the active principle of the quated species species through the techniques of cromatographic extractions (TLD and LCC), IV, CG/EM. The alcoholic extract was obtained through green leaves collected in the region of Lavras. These ones were macerated and put into methanol for 6 days. These ones were concentrated in a rotatory evaporator, under pression at 50°C. Afterwards, the residue was submitted to separation process - liquid with rising polarities: hexane, chloroform, dichlorometane, ethyl acetate and butanol. The fractions obtained were again concentrated and the residues were dissolved in their respective solvents so as to obtain a concentration which might apply onto silic gel G 60 Merck (TLC). The cromatographic development proceeded in a rising and unidimensional way in the several mixtures of solvents, where the best result was with chloroform/methanol (10:1). After wards, the same fractions were submitted to cromatographic column in 60, 70-230 mesh silic gel, eluted in the solvents: chloroform, ethyl acetate, hexane, methanol, acetic acid and water. Fractions of 30 ml were collected, being that each of them after evaporation of the solvents, was used in TLC, by utilizing different ratios of methanol and chloroforme in the mobile phase verifying the purity of the substances. They were pooled and sent to the IV and CG/EM analysis. Results:

Sample 7: Soluble in hexane, eluted in acetic acid

Rf: 0,74 (98:2) methanol/chloroform. Revelation: Iodine

IV:nKBr (cm-1): 3500-2900, 1685-1654, 1508, 1022

EM: mz (%): 129 (100%); 57 (75%); 55 (64%); 70 (45%); 112 (28%); 147 (22%)

Sample 12: Soluble in ethile acetate, eluted in acetic acid

Rf: 0,76 (98:2) methanol/cloroform. Revelation: Iodine

IV:nKBr (cm-1): 3600-2900, 1685-1654, 1508, 1024

EM: mz: 129 (100%); 77 (5,0%); 112 (4,0%); 149 (7,0%); 55 (3,2%); 147 (18%); 149 (73%)



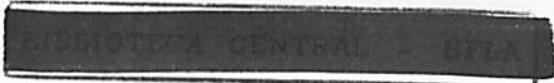
Sample 20: Soluble in hexane, eluted in water

Rf: 0,74 (95:2) methanol/cloroform. Detected in light UV in the band of 360 nm

IV:nKBr (cm-1): 3600-3406, 1654-1620, 1167

EM: mz: 57 (100%); 55 (98%); 56 (66%); 71(42%); 69 (27%); 83 (29%); 82 (15%); 98 (8%)

*Adviser: Maria das Graças Cardoso - UFLA, José Eduardo Brasil Pereira
Pinto - UFLA (co-adviser)



6.1 Introdução

A utilização da flora no tratamento de diversas enfermidades vem perpassando os tempos desde a mais remota antiguidade; a aplicação empírica adveio de sucessivas observações que compõem a vasta medicina popular. Com o passar dos tempos, as formas de utilização sofreram alterações mas a matéria-prima continua sendo a mesma: os vegetais.

A medicina alopática utiliza 119 drogas com estruturas definidas, que são extraídas de, aproximadamente 90 espécies de plantas superiores. A existência de cerca 250.000 espécies de plantas permite deduzir que muitas substâncias com atividades medicinais podem ser isoladas destes organismos vegetais e caracterizadas estruturalmente (Braz Filho, 1994).

↙ O uso de plantas consideradas medicinais é bastante difundido no Brasil. Estima-se que a metade das espécies nativas apresentem alguma propriedade medicinal, sendo que poucas foram estudadas adequadamente.

Embora uma planta possa conter centenas de metabólitos secundários, apenas os compostos presentes em maior concentração são geralmente isolados e estudados pela fitoquímica clássica. A análise de substâncias ativas é muito complexa e longa, geralmente os compostos presentes em menor proporção na planta são os que apresentam melhores efeitos biológicos (Cechinel Filho e Yunes, 1998). Sabe-se que quatro quintos dos cientistas e tecnólogos do mundo vivem na Europa, Estados Unidos da América do Norte e na Rússia onde atingiu um maior avanço das técnicas espectroscópicas, proporcionando um rápido progresso na identificação de estruturas moleculares complexas de constituintes naturais até pouco tempo difíceis de serem identificados.

Desta forma, o potencial químico dos organismos vivos estimulou o interesse das indústrias farmacêuticas a obter, como fonte de fármacos, produtos como o taxol, efedrina, agroquímicos produzidos a partir de fungicidas e

inseticidas naturais (rotenona) compostos usados para dar sabor e cor aos alimentos (mentol, ácido benzóico), e cosméticos de perfumes naturais (cânfora, cumarina, linalol) (Gottlieb e Kaplan, 1983; Braz Filho, 1994).

Existem várias metodologias descritas para a preparação de extratos vegetais visando o isolamento de seus constituintes químicos. Um método adequado para a análise químico-farmacológica se inicia com a preparação de um extrato hidroalcoólico, que é análogo às tinturas realizadas na cultura popular, em que se misturam as partes ativas das plantas com bebidas alcoólicas. Obtido o extrato hidroalcoólico, normalmente faz-se o fracionamento deste por solventes imiscíveis (líquido-líquido) de polaridades crescentes. A extração líquido-líquido visa uma semi-purificação das substâncias através da polaridade dos solventes utilizados (Cirilo, 1993).

Segundo Miguel (1996), o princípio da extração líquido-líquido é a distribuição do soluto entre dois líquidos em contato: qualquer substância solúvel em ambos sofrerá distribuição ou partição entre as duas fases na razão de suas solubilidades, não havendo reação com qualquer dos dois solventes e existindo na mesma forma em ambos. Em geral, um dos líquidos é a água e o outro um solvente orgânico.

Posteriormente, com as frações obtidas, o próximo passo envolve as diferentes técnicas cromatográficas em que as frações devem ser reunidas, segundo seu perfil cromatográfico. O uso em conjunto de técnicas espectrais, como UV, IR, RMN¹H e EM, aliado ao uso de técnicas sofisticadas de RMN, tem permitido propor com segurança a estrutura molecular de substâncias naturais. O resultado destes e, uso da difração por Raio-X permitem avaliar a estereoquímica real destas substâncias (Farnsworth, 1980; Kingston, 1991; Cordell, 1995; Kemp, 1987; Silverstain, Bassler; Morrill, 1994; Whiston, 1987).

A rotina para se conhecer a composição química de um extrato vegetal segue as etapas de isolamento e elucidação estrutural citadas anteriormente. Tais

procedimentos necessitam de uma grande quantidade de plantas, adsorventes, solventes e equipamentos de alto custos.

Vários autores citam a identificação de compostos puros através de estudos científicos utilizando-se as diversas técnicas de identificação aplicadas para cada caso em específico. Com isso, novos compostos como β -sitosterol e estigmasterol têm sido elucidados nas formas livres e glicosiladas, identificados por RMN¹H, IV e EM, a partir de cascas de *Bauhinia guianensis* Aublet., conhecida popularmente por escada de jaboti (Viana; Rosa e Santos, 1998). Nas partes aéreas de *Eugenia moraviana* Berg, conhecida por cambuí, as estruturas dos compostos identificados por espectros de IV, EM e RMN¹H foram caracterizadas como triterpeno ácido 6- α -hidroxibetulínico, nor-triterpeno ácido platânico e β - sitosterol (Lunardi; Peixoto e Vidotti, 1998). Em folhas de *Maytenus truncata*, ou espinheira santa, foram isolados, por Salazar et al. (1998), os triterpenos pentacíclicos α -friedelinol, β -fridelinol e friedelina e o poliol dulcitol, utilizando dados de espectrometria no IV e ponto de fusão misto, comparados com aqueles encontrados na literatura de amostra autêntica. Compostos identificados em folhas e células de *Cordia verbenacea* L. (erva baleeira) foram caracterizados como sendo flavonóides 7,4'-diidroxí-5'-carboximetóxiisoflavona e 7,4'-diidroxí-5'-metilisoflavona, através de espectrometria no IV, UV, EM e RMN¹H (Lameira, 1997).

A literatura descreve que os princípios ativos em plantas de chapéu de couro aqui descrita (*Equinodorus cf scaber*) ainda não foram estudados fitoquimicamente. Os principais constituintes químicos encontrados nesta família foram taninos, flavonóides, triterpenos, glicosídeos, equinodorosídeos, essências e sais minerais (Santos, Torres, Leonart, 1988; Martins et al., 1995; Corrêa, Batista, Quintas, 1998; Lainetti, Brito, 1980).

Por tal motivo e por se tratar de uma espécie de grande interesse farmacológico, carente de informações científicas, são necessários estudos da

espécie, de forma que suas substâncias químicas sejam identificadas, isoladas, caracterizadas e produzidas em maior quantidade.

6.2 Material e métodos

Os experimentos foram conduzidos no Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras (UFLA) e a classificação da espécie foi efetuada pelo professor Manuel Losada Gavilanes do Herbário Botânico da Universidade Federal de Lavras.

Folhas de chapéu de couro foram coletadas em estágio vegetativo adulto, crescidas no município de Lavras, em março de 1998. As mesmas foram trituradas com o auxílio de um triturador tipo politron. Posteriormente, foram pesadas cinco amostras de 496,30; 495,00; 472,00; 470,50; 230,26g e submetidas a extração a frio em 1,5L de metanol, durante 6 dias. As amostras foram juntadas obtendo-se assim uma única solução hidroalcoólica. Esta, de cor verde e, recebendo a denominação de extrato metanólico bruto, foi filtrada a vácuo, concentrada em evaporador rotatório, sob pressão reduzida a 50°C em banho-maria até completar a evaporação do solvente. Obteve-se assim um extrato que foi submetido a um processo de partição líquido-líquido, com solventes de polaridades crescentes, em um funil de separação, extraído, com 100ml dos solventes, hexano, clorofórmio, diclorometano, acetato de etila e butanol, obtendo-se uma semi-purificação das substâncias através de suas polaridades.

Em cada uma dessas extrações, houve a nítida visualização das linhas de separação dos solventes (Figuras 13 e 14). As frações semi-puras foram novamente concentradas em evaporador rotatório e as amostras foram dissolvidas em seus respectivos solventes, de modo a se obter uma concentração que fosse possível aplicar em placas de sílica gel G tipo 60 Merck (CCD). O

desenvolvimento cromatográfico procedeu de forma unidimensional e ascendente nas misturas dos solventes: clorofórmio/metanol (1:1; 1:2; 1:5; 1:10; 2:1; 3:1; 4:1; 5:1); clorofórmio/acetato de etila (1:1; 1:3); metanol/acetato de etila (1:1); clorofórmio/metanol/acetato de etila (3:1:1; 6:2:4); metanol/clorofórmio/acetato de etila (6:2:4; 3:1:1;); hexano/metanol/acetato de etila (6:2:4). O melhor resultado foi com a mistura binária: clorofórmio/metanol na proporção 10:1. Em seguida, as mesmas frações foram submetidas a uma coluna cromatográfica (com comprimento de 20cm e diâmetro interno de 2,5cm) em sílica gel 60, 70-230 mesh Merk (31,40 g) eluída com os seguintes solventes: hexano, clorofórmio, acetato de etila, metanol, ácido acético e água. Para calcular a quantidade de sílica a ser utilizada no preenchimento da coluna, foi utilizada a fórmula: $V = \pi \cdot R^2 \cdot h \cdot 20\%$, em que V= peso da sílica a ser utilizada, R= raio da coluna e h= altura do enchimento da coluna desejada. Coletaram-se frações de 30 ml no tempo de 15 minutos e 40 segundos cada, perfazendo um total de 116 frascos.

As amostras eluídas no mesmo solvente foram reunidas, obtendo-se 22 frações que, após evaporação dos solventes, foram analisadas por CCD, utilizando-se as seguintes proporções de metanol e clorofórmio na fase móvel: clorofórmio/metanol (2:3; 3:7; 5:1); metanol/clorofórmio (98:2; 95:5; 2:98; 5:95; 1:5; 7:1; 80:2).

As melhores manchas foram aquelas apresentadas pelas frações hexânicas eluídas em ácido acético (amostra 7), pelas frações acetato de etila eluída em ácido acético (amostra 12), ambas reveladas em vapor de iodo e da fase hexânica eluída em água (amostra 20), detectada com luz U.V na faixa de 360nm. Os valores de R_f foram calculados a partir da média dos resultados de três placas; as manchas reveladas nas placas foram raspadas e a estas adicionou-se 1 ml de seus respectivos solventes. Em seguida, foram filtradas a vácuo e levadas à estufa e os resíduos foram analisados em IV e CG/EM.

Os espectros no infravermelho foram registrados no Departamento de Química da UFLA, no espectrofotômetro modelo FTIR – 8201 A, do fabricante Shimadzu, utilizando-se pastilhas de KBr como suporte. As análises em CG/EM foram realizadas pela SINC do Brasil (Instrumentação Científica LTDA) em cromatógrafo a gás acoplado à espectrômetro de massa Shimadzu modelo QP 5050, acoplado a banco de dados. Foi usada uma coluna capilar do tipo DB5 com 30m de comprimento, 0,25 μ m de diâmetro interno e espessura do filme 0,25 μ m. O gás de arraste foi hélio e as separações foram realizadas com injetor a 250°C com a seguinte programação de temperatura: 60°C (temperatura inicial) aumentando 2°C por minuto até 280°C (temperatura final).

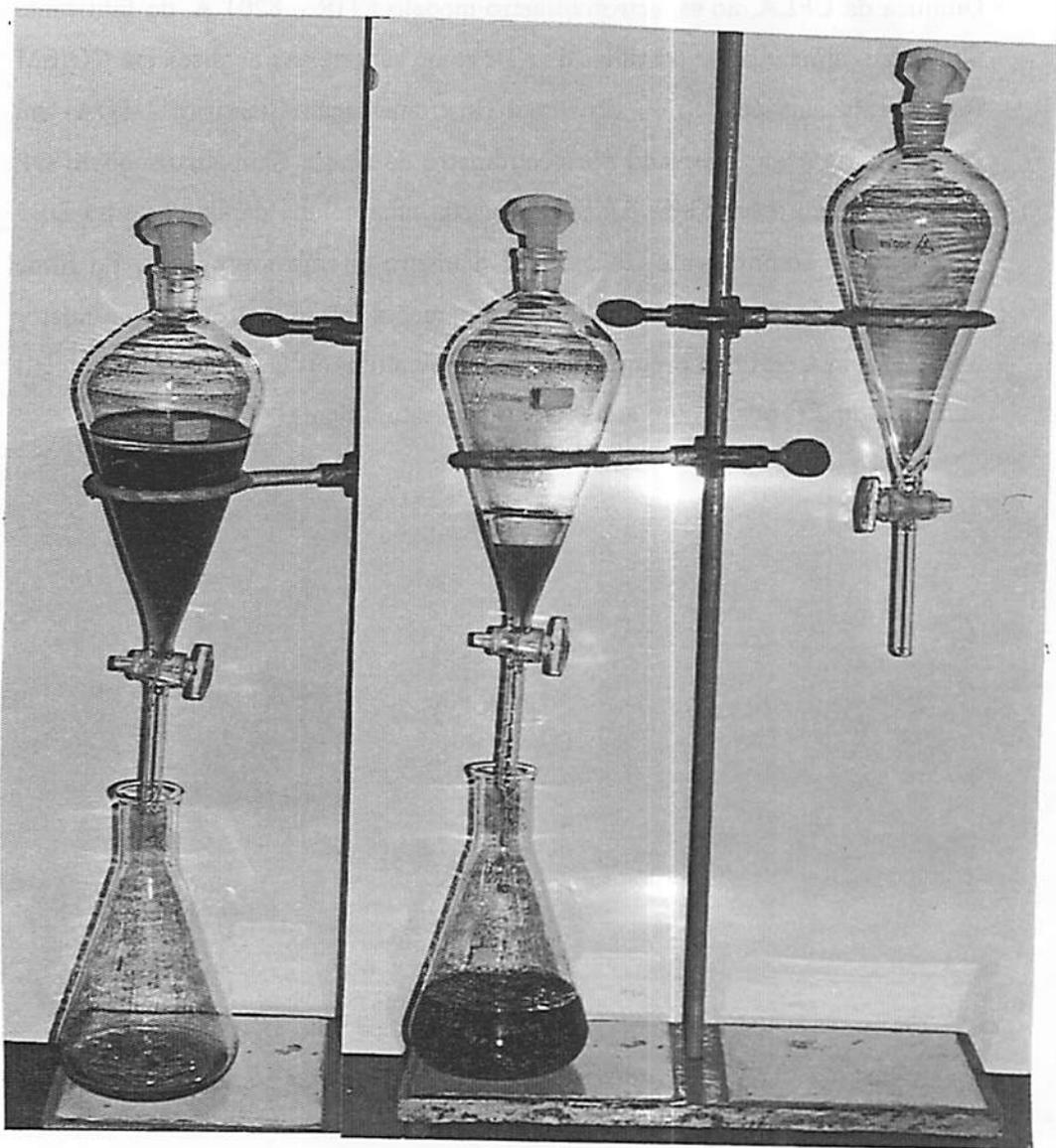


FIGURA 13. Processo de partição líquido-líquido com solventes de polaridades crescentes em funil de separação. UFLA, Lavras/MG, 1999

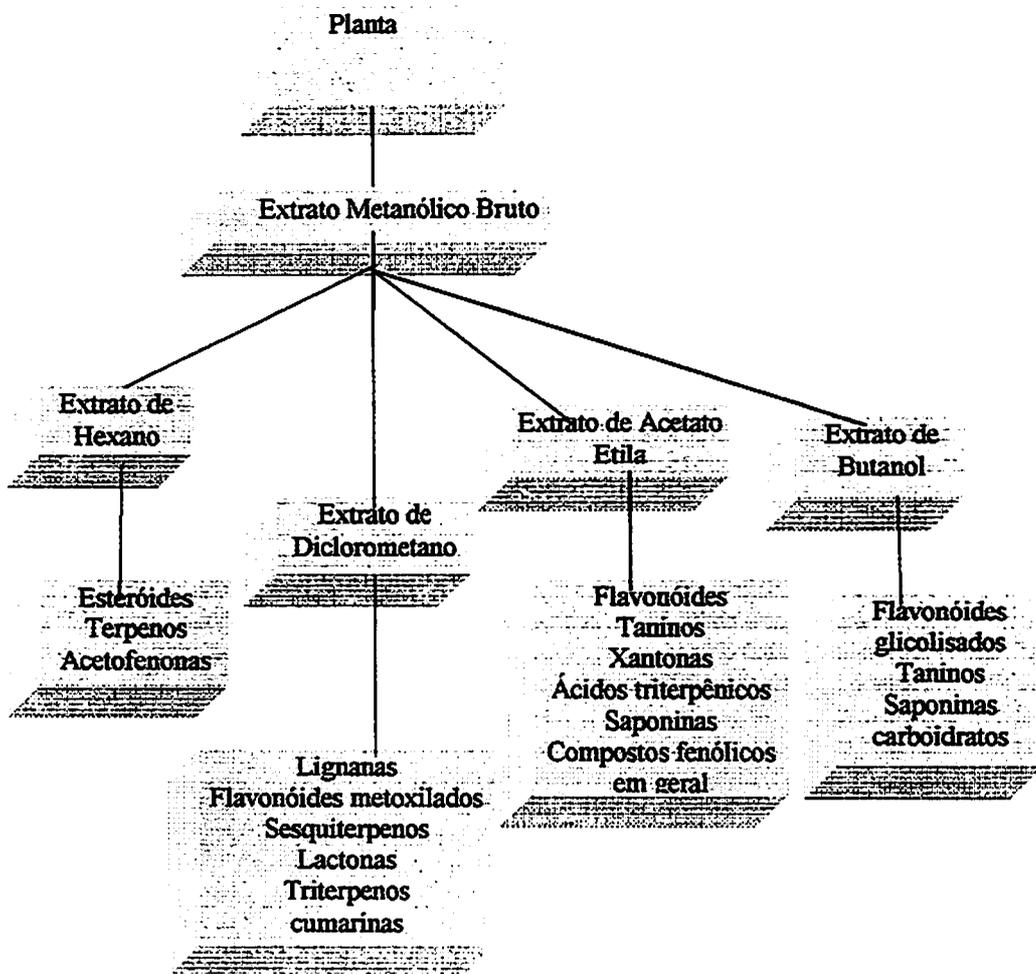


FIGURA 14. Esquema geral de partição e separação provável dos principais metabólitos secundários presentes em plantas. UFLA, Lavras/MG, 1999.

6.3 Resultado e Discussão

O fracionamento cromatográfico do extrato de folhas de chapéu de couro em coluna de sílica gel resultou na obtenção das frações descritas na Tabela (5).

Tabela 5. Fracionamento cromatográfico das amostras obtidas pelo sistema de partição líquido-líquido submetidos à cromatografia em coluna de sílica gel eluída em solventes de polaridades diferentes. UFLA, Lavras/MG, 1999.

Frações	Nº de frascos coletados	Eluentes
Hexano	6	Clorofórmio
Hexano	6	Acetato de Etila
Hexano	3	Hexano
Hexano	11	Acetato de Etila
Hexano	10	Metanol
Hexano	2	Ácido acético
Hexano	2	Água
Diclorometano	-	Clorofórmio
Diclorometano	5	Acetato de Etila
Diclorometano	9	Metanol
Butanol	-	Clorofórmio
Butanol	-	Acetato de Etila
Butanol	4	Metanol
Butanol	2	Ácido acético
Acetato de Etila	2	Clorofórmio
Acetato de Etila	2	Acetato de Etila
Acetato de Etila	21	Metanol
Acetato de Etila	4	Ácido acético
Bruto	-	Acetato de Etila
Bruto	23	Metanol
Bruto	4	Ácido acético
Bruto	-	Água

Através de CCD, verificou-se que a melhor combinação de solventes para separação dos componentes das amostras e que ofereceu manchas com maior definição foi a mistura binária metanol/clorofórmio. Uma única mancha foi detectada na fração hexânica eluída em ácido acético e hexânica eluída em

água designada amostra 7 e amostra 20, respectivamente. Essas frações apresentaram valores idênticos de R_f para o desenvolvimento em metanol/clorofórmio 98:2 para a amostra 7 e 95:2 para a amostra 20.

Para a amostra 12, solúvel em acetato de etila e eluída em ácido acético foram obtidos valores de R_f 0,76 para o desenvolvimento em metanol: clorofórmio 98:2 (Figura 15).

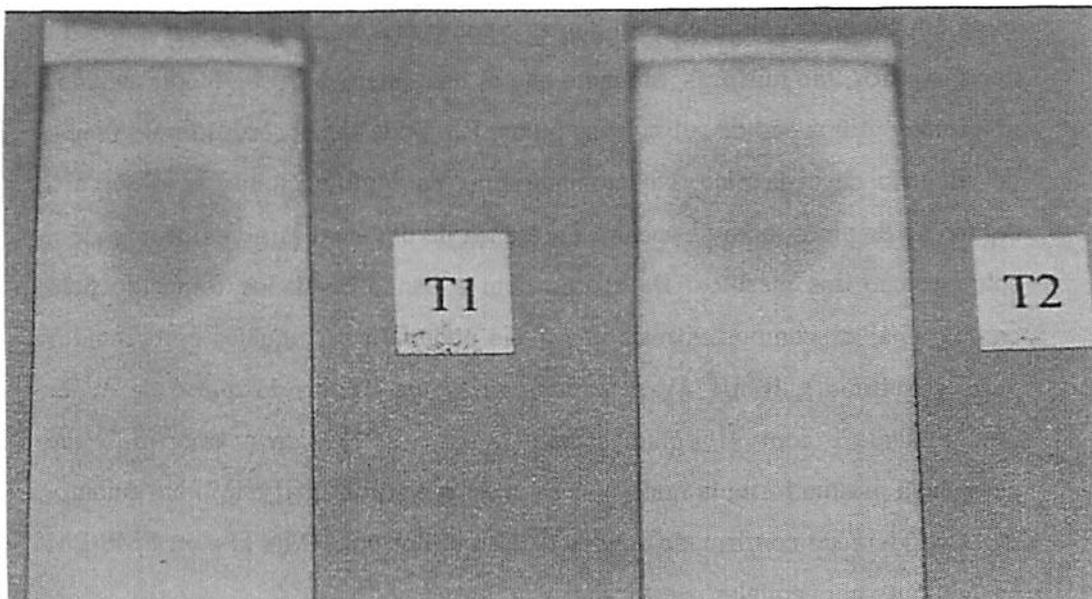


FIGURA 15. Cromatoplas das amostras 7 (T1) e 12 (T2) desenvolvidas em metanol e clorofórmio 98:2 e reveladas à exposição a vapores de iodo. UFLA, Lavras/MG, 1999.

Através das Figuras 16 e 17, podemos observar que os espectros de infravermelho correspondentes às amostras 7 e 12, respectivamente, são bem similares. Em ambos observa-se uma banda larga de $3500-2900\text{cm}^{-1}$, a qual é atribuída ao estiramento da ligação O-H sobreposto com estiramento da ligação C-H de grupos metilas ($-\text{CH}_3$), metilênicos ($-\text{CH}_2$) e metínicos ($-\text{CH}$) presentes.

Entre 1685cm^{-1} aparece uma banda larga associada com outra banda em 1508cm^{-1} , que é correspondente aos estiramentos do grupo carbonila ($-\text{C}=\text{O}$) conjugado com duplas ligações, os quais são confirmados pela presença do sinal acentuado, aproximadamente entre $1020\text{-}1024\text{ cm}^{-1}$, que corresponde ao estiramento ($-\text{C}-\text{O}$). Estes dados estão de acordo com aqueles obtidos pelos cromatogramas de CG/EM (Figura 18 e 19).

Com os dados citados na tabela (5) e (6) podemos descrever que trata-se de um composto alifático com duplas conjugadas: os picos 3 e 4 (Figura 20) não são puros, são misturas, enquanto que os de número 1, 2, 5 e 6 apresentados no cromatograma são de substâncias puras. Isto pode ser observado pelo tempo de retenção de cada pico. No cromatograma da Figura 21 não se observa a separação de picos, nota-se apenas a presença de um sinal largo evidenciando a sobreposição dos mesmos. De acordo com o banco de dados fornecido pelo cronograma, os compostos mais prováveis poderiam ser aqueles apresentados pelas estruturas I, II, III, IV mostrados na Figura 22, sendo que o de maior probabilidade é com 91% para a amostra 12 e, 92% para a amostra 7 que possuem a mesma fórmula molecular e a mesma estrutura (III e IV). No entanto, isto só poderá ser confirmado com os dados obtidos por RMN^1H e ou EMS/EM em conjunto com aqueles já estudados.

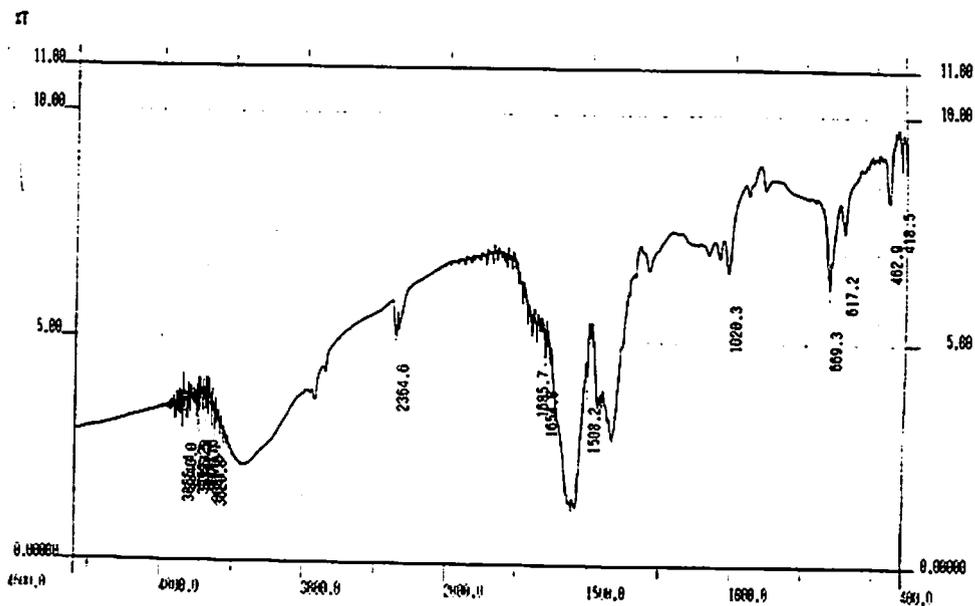


FIGURA 16. Espectro de infravermelho da amostra 7. UFLA, Lavras/MG, 1999.

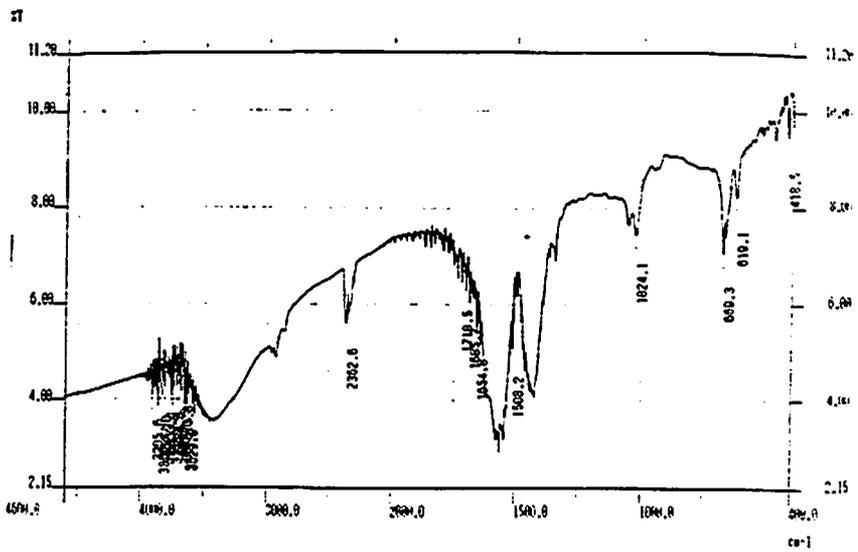


FIGURA 17. Espectro de infravermelho da amostra 12. UFLA, Lavras/MG, 1999.

Scan # : (1515 - 1519) B.G. Scan # : (1519 - 1526)
Mass Peak # : 162 Ret. Time : (17.617 - 17.650)
Base Peak : 129.05 (193758)

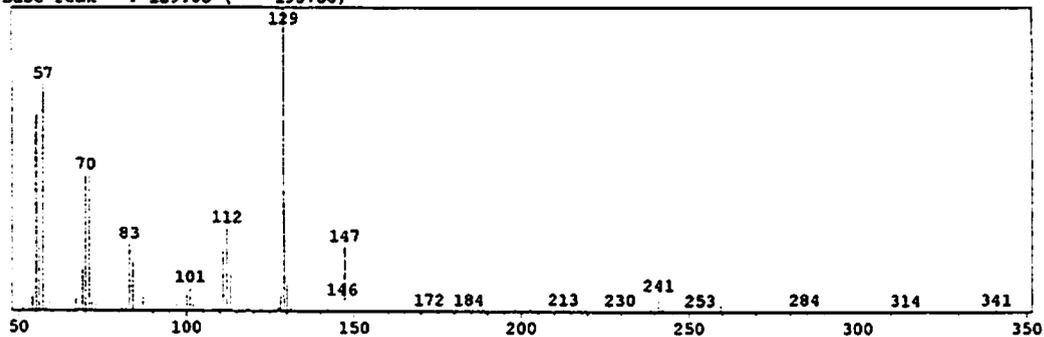


FIGURA 18. Espectro de massa da amostra 7. UFLA, Lavras/MG, 1999.

<Unknown Spectrum>

PKNO : 3 Mass Peak # : 237 Ret. Time : 14.300
Scan # : (1115 - 1129)
Base Peak : 97.00 (24553)

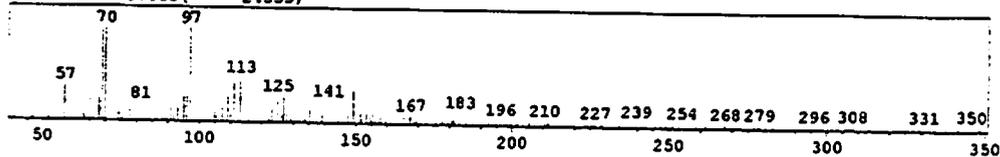


FIGURA 19. Espectro de massa da amostra 12. UFLA, Lavras/MG, 1999.

Tabela 5. Valores de fragmentos de massa, probabilidade, tempo de retenção e respectiva substância identificada da amostra 7. UFLA, LAVRAS/MG, 1999.

Sinais Nº	m/Z	*T. R. (minutos)	%	composto
1	57,15	17,61	92	Hexanedioic acid, dioctyl ester

*Tempo de retenção

Tabela 6. Valores de fragmentos de massa, probabilidade, tempo de retenção e respectivas substâncias identificadas da amostra 12. UFLA, LAVRAS/MG, 1999.

Sinais Nº	m/Z	*T. R. (minutos)	%	composto
1	77	13,15	78	Benzenesulfonamide, N-butyl
2	149	13,79	86	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis (2-methylpropyl) ester
3	97	14,30	90	Tritetracontane
4	149	14,41	84	1,2-Benzenedicarboxylic acid, ditridecyl ester
5	129	17,61	91	Hexanedioic acid,dioctylester
6	149	18,90	85	3',8'-Trimethoxy-3-piperidyl- 2,2'-binaphthyl-1,1',4,4'-tetrone
7	97	19,35	89	Acetamide, N-methyl-n-4- 4methoxy-1-hexahydropyridyl-2- butynyl

*Tempo de retenção

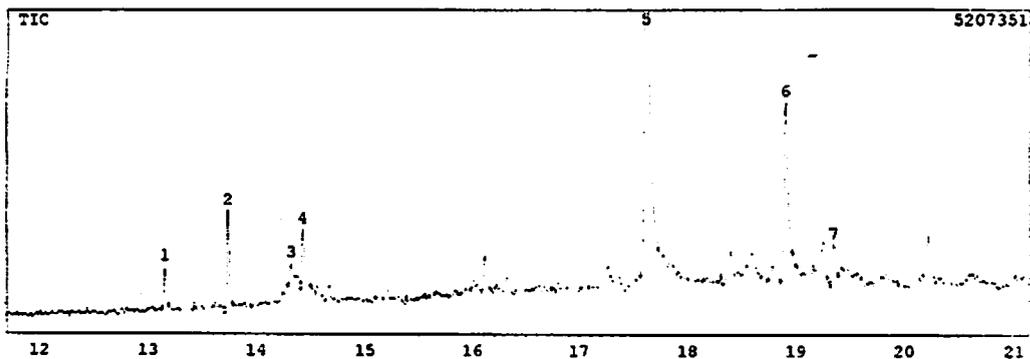


FIGURA 20. Cromatograma obtido em CG da amostra 12, extraída de folhas de chapéu de couro cultivadas na região de Lavras. UFLA, Lavras/MG, 1999 (coluna com fase estacionária SE-54).

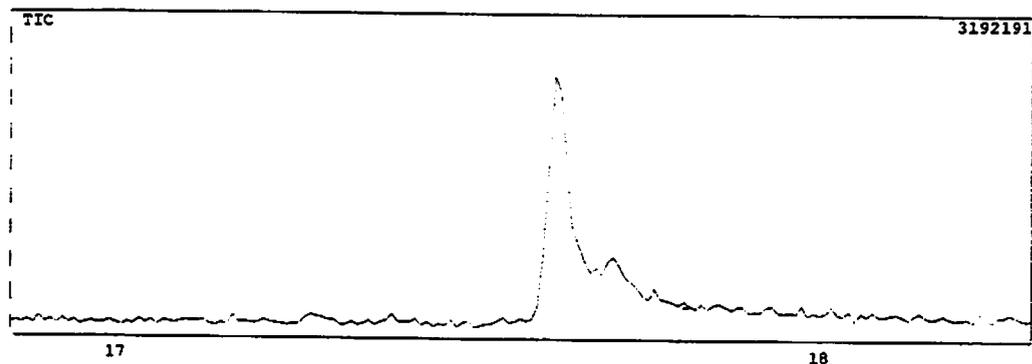
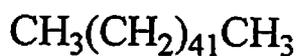
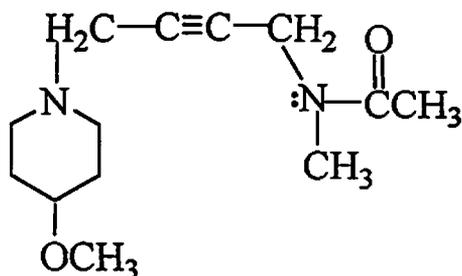


FIGURA 21. Cromatograma da amostra 7 extraída de folhas de chapéu de couro cultivadas na região de Lavras. UFLA, Lavras/MG, 1999 (coluna com fase estacionária SE-54).



I

Tritetracontane
(Amostra 12)



II

N-methyl-N-4,4-methoxy-1-hexahydropyridyl-2-butynyl-acetamidic
(Amostra 12)

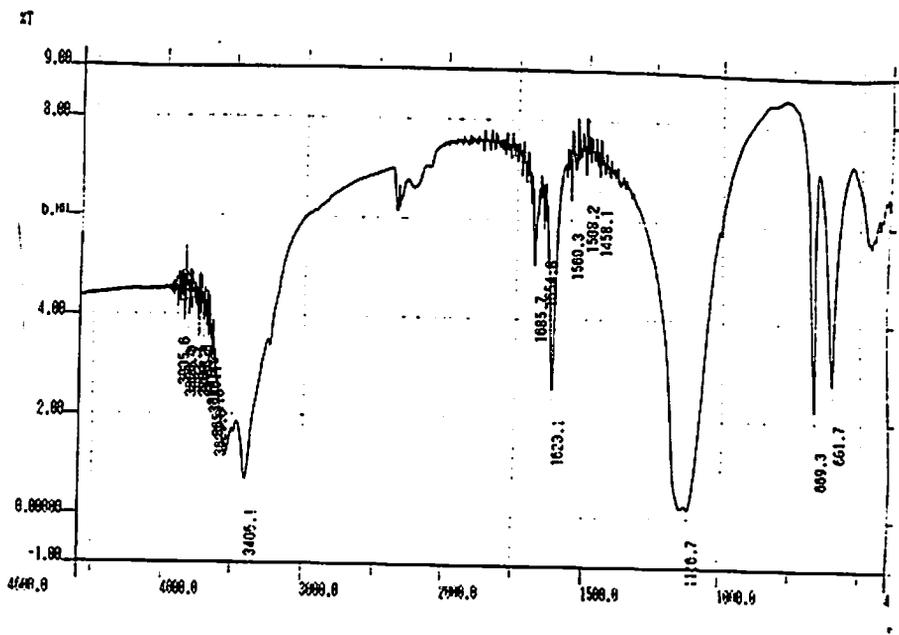


III e IV

Hexanodióico dioctil éster
(Amostra 7 e 12)

FIGURA 22. Prováveis estruturas químicas das amostras 7 e 12. UFLA, Lavras/MG, 1999.

O espectro da amostra 20 representado na Figura 23 indica tratar-se de um composto alifático que poderá ser um derivado oxigenado, mas não carbonilado. Isto pode ser confirmado pela presença de uma banda larga situada em 1167cm^{-1} a qual é atribuída ao estiramento da ligação -C-O. Nota-se também a presença de uma banda fina compreendida entre 1620cm^{-1} que pode ser atribuída a alquenos, evidenciando a presença de duplas ligações. De acordo com o cromatograma obtido por CG/EM, representado pela Figura 24, observa-se que a substância não está totalmente pura e que os prováveis constituintes são álcoois ou éter de cadeia longa. Não se observa a separação de picos, apenas a presença de um sinal largo evidenciando a sobreposição dos mesmos (Figura 25). Pelo banco de dado fornecido pelo computador através do cromatograma, podemos inferir que se trata de um composto ou metabolito apresentado na Tabela 7 representado pela estrutura V (Figura 26).



Scan # : (22 - 31) B.G. Scan # : (12 - 20)
Mass Peak # : 163 Ret. Time : (5.175 - 5.250)
Base Peak : 57.10 (268781)

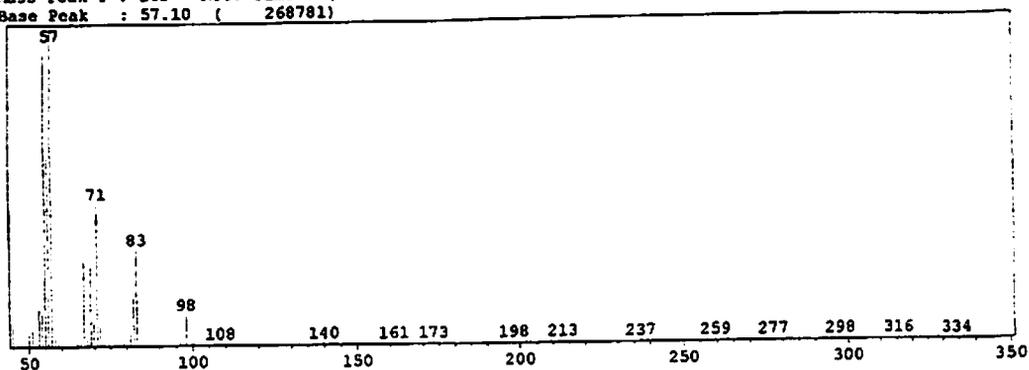


FIGURA 24. Espectro de massa da amostra 20. UFLA, Lavras/MG, 1999.

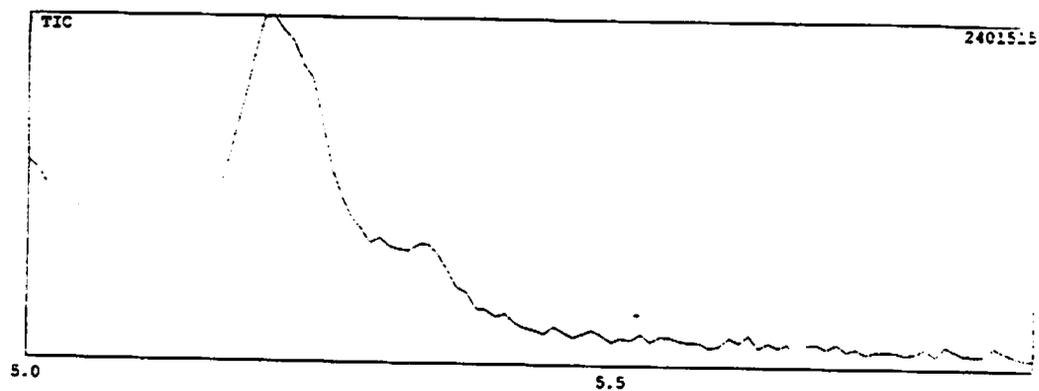


FIGURA 25. Cromatograma obtido em CG da amostra 20, extraída de folhas de chapéu de couro cultivadas na região de Lavras. UFLA, Lavras/MG, 1999 (coluna com fase estacionária SE-54).

Tabela 7. Valores de fragmentos de massa, probabilidade, tempo de retenção e respectiva substância identificada da amostra 20. UFLA, LAVRAS/MG, 1999.

Sinais Nº	m/Z	*T. R. (minutos)	%	composto
1	57,10	5,16	86	Oxirane,(tetradecyloxy) metyl

*Tempo de retenção

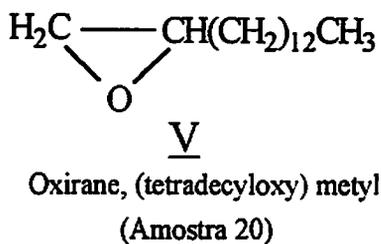


FIGURA 26. Provável estrutura química da amostra 20. UFLA, Lavras/MG, 1999.

6.4 Conclusões

Através de interpretação e comparação visual dos parâmetros obtidos no IV e no CG/EM, acredita-se que os componentes presentes nas amostras 7 e 12 tenham a mesma estrutura, sendo que a mais provável deverá ser o hexanodioic acid, dioctily éster ou um metabólito muito próximo deste. Isto é confirmado através da porcentagem de probabilidade obtida no cromatograma em CG/EM e do mesmo ser encontrado com 92% para a amostra 7 e 91% para a amostra 12. Já para a amostra 20, o mais provável é que seja Oxirane, (tetradecyloxy) metyl com 86% ou um metabólito muito próximo deste.

6.5 Referências Bibliográficas

- BRAZ-FILHO, R. Química de produtos naturais: importância, interdisciplinaridade, dificuldades e perspectivas. A peregrinação de um pacatubano, *Química Nova*, 1994. v.17, 405-445 p.
- CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade, *Química Nova*, 1998. v.21, 99-105 p.
- CIRILO, V.K. *Manual de plantas medicinais*, ed Assessorar, Francisco Beltrão, Paraná, 1993. 12 p.
- CORDELL, G.A. *Phytochemistry*, 1995. v.40, 1585 p.
- CORRÊA, A.D.; BATISTA, R.S; QUINTAS, L.E.M *Plantas Medicinais: do cultivo à terapêutica* Vozes, 1998. 246p.
- FARNSWORTH, N.R.J. *Ethnopharmacol*, 1980. v.2, 173 p.
- GOTTLIEB, O.R.; KAPLAN, M.A.C. *A importância dos produtos naturais para o homem*, SINPRONAT, ed UFPb, 1983.
- KEMP, W. *Organic Spectroscopy*, 2ª ed, Macmillan Education Ltda, Hong Kong 1987.
- KINGSTON, D.G.I. *Pharmac. Ther*, 1991. 52 p.
- LAINETTI, R.; BRITO, N.R.S.de. *A saúde pelas plantas e ervas do mundo inteiro*. Ediouro 1980.
- LAMEIRA, O. A. *Propagação in vitro e in vivo, dinâmica de crescimento de células, nutrição e identificação de flavonóides em erva baleeira (Cordia verbenacea L.)* Lavras: UFLA, 1997. 88p. (Tese-Doutorado em Fitotecnia).
- LUNARDI, I.; PEIXOTO, J.L.B.; VIDOTTI, G.J. Constituintes químicos das partes aéreas da espécie vegetal *Eugenia moraviana*, In: 21ª Reunião anual da sociedade brasileira de química, 25 a 28 maio, Poços de Caldas-MG, 1998. v.2, 124 P.N.

- MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.de.; CASTELLANI, D.C.;DIAS, J.E. **Plantas Medicinais**. Viçosa: UFV, 1995. 220 p.
- MIGUEL, O.G. **Estudos químicos e farmacológicos das espécies *Phyllanthus sellowianus*, *Phyllanthus fraternus* e *Siphocampylus verticillatus***, Florianópolis: UFSC, 1996. 219 p.(Tese de doutorado em Química).
- SALAZAR, G.D.C.M.; SILVA, G.D.F; SUZUKI, Y.; FIGUEIREDO, R.C.; FREITAS, J.S. **Constituintes químicos de folhas de *Maytenus truncata***, In: **XII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química**, 28 a 30 de Outubro, Ouro Preto-MG, 1998, 135 p.
- SANTOS, C.A de M.; TORRES, K.R.; LEONART, R. **Plantas Medicinais: herbarium flora et scientia**. 2ed. São Paulo: cone, 1988. 160p.
- SILVERSTAIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRIL, T.C.; **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**, 5ª ed, Ed. Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 1994.
- VIANA, E.P.; ROSA, R.S.S.; SANTOS, L.S. **Esteróides glicosilados de *Bauhinia guianensis***, In: **21ª Reunião anual da sociedade brasileira de química**, 25 a 28 maio, Poços de Caldas-MG, 1998, v.2, 103 P.N.
- WHISTON, C.; Prichard, F.E., . **X-ray methods** ed John Wiley e Sons, London, 1987.

7 CAPÍTULO IV

IDENTIFICAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Echinodorus cf scaber* Rataj

RESUMO

Nos óleos essenciais estão os princípios ativos mais conhecidos, produzidos pelas plantas em resposta às necessidades biológicas e para o seu desenvolvimento. Geralmente são pouco solúveis em água, e por serem substâncias voláteis, evaporam-se com facilidade quando submetidas ao calor. A estes compostos são atribuídas várias ações genéricas farmacológicas que se modificam de acordo com as características de cada espécie. A espécie *Echinodorus cf scaber* Rataj é uma planta nativa que pertence à família Alismataceae, conhecida popularmente por 'chapéu de couro'. Devido a ação de seus princípios ativos, suas folhas são utilizadas como diurético, antiofídico, depurativo, antireumático, antiinflamatório e para normalizar ácido úrico, combatendo a gota e artrose. O estudo do óleo essencial desta planta objetivou a extração e o estudo da composição química de suas folhas através das técnicas de cromatografia de camada delgada (CCD), IV, EM/CG. O material vegetal selecionado foi cultivado em casa de vegetação do Departamento de Agricultura da UFLA. O óleo essencial das folhas frescas de chapéu de couro foi obtido por destilação de arraste a vapor, extraído com 3 porções de cloreto de metileno. Reuniram-se as frações orgânicas, evaporou-se o solvente, secou-se com sulfato de magnésio anidro; o produto final apresentou um aspecto esbranquiçado de odor agradável. Este foi analisado por (CCD), no qual desenvolvimento cromatográfico nas várias misturas submetidas, comportou-se de forma unidimensional e ascendente, sendo que o melhor resultado obtido com a mistura binária metanol/clorofórmio (98:2). Posteriormente, frações do isolado foram levadas para análise no IV e no EM/CG.

Resultados:

Aspecto: óleo esbranquiçado, odor agradável

Solubilidade: cloreto de metileno

R_f: 0,86 (98:2) metanol/clorofórmio. Revelação : Iodo

IV: ν_{NaCl} (cm⁻¹): 3060; 2958-2856; 1728; 1600-1581; 1490; 1286-1274; 1122-1072; 802cm⁻¹

EM: m_z (%) 149 (100%); 57 (62%); 149 (52%); 57 (13%); 105 (16%); 149 (77%)

*Orientadora: Maria das Graças Cardoso - UFLA, José Eduardo Brasil Pereira
Pinto - UFLA (Co-orientador)

7 CHAPTER IV

IDENTIFICATION OF THE CHEMICAL COMPOSITION OF THE ESSENTIAL OIL OF *Echinodorus cf scaber* RATAJ

ABSTRACT

In essential oils lie the best known active principles; they are produced by the plants in response to the biological needs and to their development. Generally, they are poorly water soluble, and for being volatile substances, they evaporate easily when submitted to the heat. To these compound, are ascribed a number of generic pharmacological actions which modify according to the characteristics of each species. The species *Echinodorus cf scaber* Rataj, is a native plant belonging to the family Alismataceae, and is popularly known for 'leather hat'. Due to the action of its active principles, its leaves utilized as diuretic, antiophidian, depurative, antirheumatic, antiinflammatory, and for normalizing uric acid, combating both gout and arthrosis. The study of the essential oil of this plant aimed at the extraction and study of their leaves' chemical composition through the techniques of thin cromatography (TLC), IV, CG /EM. The plant material seleted was grown in greenhouse of the Agricultural Department of the UFLA. The essential oil in the fresh leaves of leather hat was obtained by steam drag distillation. It was extracted with three portions of methylene chloride. Organic fractions, were pooled, the solvent evaporated it was dried with anhydrous magnesium sulphate; the final product presented a whitish aspect with agreeable odor. This was analyzed by (TLC), where the cromatographic development in the several mixtures submitted, procceded in the unidimensional and rising fashion being that the best result obtained was with the binary metanol/clorofórmio (98:2). Afterwards fractions of the isolate were taken to the analysis in IV and in CG/EM.

Results:

Aspect: whitish oil, agreeable odor

Solubility: methylene chloride

Rf: 0,86 (98:2) methanol/cloroform. Revelation: Iodine

IV: nNaCl (cm-1): 3060; 2958-2856; 1728; 1600-1581; 1490; 1286 -
1274; 1122-1072; 802cm-1

EM: mz (%) 149 (100%); 57 (62%); 149 (52%); 57 (13%); 105 (16%); 149
(77%)

*Advisor: Maria das Graças Cardoso - UFLA, José Eduardo Brasil Pereira
Pinto - UFLA (Co-advisor)

7.1 Introdução

Nos óleos essenciais estão os princípios ativos mais conhecidos e eles são produzidos pelas plantas em resposta às necessidades biológicas e para o seu desenvolvimento. O fato de os óleos essenciais serem produtos do funcionamento do metabolismo secundário das plantas pode implicar em grandes variações em termos de quantidade e composição, de acordo com fatores como: parte da planta, horário e época de colheita, ataque de patógenos e ou, pragas, regime hídrico, dentre outros (Castro, 1998).

A estes compostos são atribuídas várias ações genéricas farmacológicas que modificam-se de acordo com as características de cada espécie, tais como as de antivirótico, antiespasmódico, analgésico, bactericida, cicatrizante, expectorante, relaxante, vermífugo, etc. Altas doses de óleo essencial podem provocar, em geral, nefrites e hematúrias (Martins et al, 1995).

A constituição química dos óleos essenciais é muito complexa, chegando alguns a centenas de compostos com diferentes funções orgânicas: hidrocarbonetos, álcoois, cetonas, éteres, ésteres e fenóis. Geralmente, são pouco solúveis em água, possuem aroma quase sempre agradável e, por serem substâncias voláteis evaporam-se com facilidade quando submetidas ao calor.

Vários são os métodos utilizados para a extração destes óleos, que devem ser escolhidos de acordo com as características de cada espécie. O processo mais utilizado para realização das extrações é o arraste por vapor d'água que apresenta extrema simplicidade, baixo custo, bom rendimento e facilidade de execução. O método consiste em triturar ou moer o material a ser extraído e colocar em um recipiente através do qual se faz passar uma corrente de vapor d'água, com ou sem pressão. O vapor d'água arrasta os produtos voláteis existentes no material e a mistura de vapores é conduzida a um condensador em que os vapores voltam ao estado líquido, sendo este recolhido

em um balão. O óleo essencial, que é uma mistura de substâncias orgânicas imiscíveis em água, separa-se desta, formando um sistema de duas camadas ou fases. A operação seguinte consiste na retirada do óleo pelo processo de decantação; após, o que está pronto para o uso. Dependendo do tipo de planta, as condições de extração podem variar quanto à duração do processo e quanto à pressão ou temperatura do vapor d'água utilizado (Craveiro et al., 1981).

A identificação dos constituintes que aparecem no cromatograma de um óleo essencial envolve o uso de técnicas espectrométricas de análise, dentre as quais as mais frequentes são espectroscopia ultravioleta, infravermelho, de ressonância magnética nuclear de prótons e de carbono 13 e espectrometria de massa (Craveiro et al., 1981).

Há varias citações na literatura de trabalhos visando a identificação de óleo essencial em diversas plantas. Tais identificações permitem inferir as diferenças qualitativa e quantitativa do óleo extraído das espécies, como é o caso da *Cymbopogon citratus* stapf (erva cidreira) e *Cymbopogon nardus* (citronela). A extração de seus componentes voláteis foi feita através do sistema de arraste a vapor e a caracterização por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM), a qual indicou três compostos principais na erva cidreira: E-citral, Z-citral, β -mirceno, em ordem decrescente de abundância. Na citronela foram obtidos quatro compostos principais e outros de menor proporção. Os principais, em ordem decrescente de abundância são: citronela, trans-geraniol, β -citronelol e 1-metil-4-(metiletenil) cicloexeno (Nascimento; Chang; Queiroz, 1998). O estudo do óleo essencial de *Anemia tormentosa* var *anthriscifolia*, conhecida popularmente como patchouli, indicou a presença de praticamente um componente, que representa uma porção de 76% da composição total do óleo bruto. Análise em espectrometria de massa (CG-EM) equipada com um banco de dados, por ^1H RMN e por ^{13}C RMN, determinou a estrutura do álcool de patchouli. Este é um artigo de comércio e um importante

produto da perfumaria, sendo que *Posgostemon patchouli* é a única fonte natural para a destilação comercial do óleo (Carvalho et al., 1998).

O estudo do óleo essencial em *Echinodorus cf scaber* Rataj, conhecido popularmente por chapéu de couro, objetivou a extração e o estudo da composição química de suas folhas através das técnicas de cromatografia de camada delgada (CCD), IV, CG/EM.

7.2 Material e Métodos

O material vegetal selecionado foi cultivado em casa de vegetação do Departamento de Agricultura da UFLA onde a classificação da espécie foi efetuada pelo professor Manuel Losada Gavilanes, do Herbário Botânico da Universidade Federal de Lavras.

Folhas verdes de chapéu de couro (62,66 gramas) previamente fragmentadas foram submetidas ao processo de arraste a vapor por 5 horas. O líquido coletado foi colocado em um funil de separação e a extração feita pela adição de 100mL de cloreto de metileno (3 vezes), o óleo solubilizou na fase orgânica e a fase aquosa foi descartada. Acrescentou-se sulfato de magnésio anidro ao óleo para retirar a umidade, filtrando-se o material e concentrando-o em evaporador rotatório. Os componentes do óleo essencial foram isoladas por CCD, cujo desenvolvimento cromatográfico nas várias misturas submetidas ocorreu de forma unidimensional e ascendente, sendo que o melhor resultado obtido foi com a mistura binária metanol/clorofórmio (98:2). Posteriormente, frações do isolado foram levadas para análise no IV e no CG/EM.

7.3 Resultado e Discussão

Considera-se que o melhor resultado obtido por CCD foi o que utilizou a mistura binária metanol/clorofórmio (98:2), obtendo-se um valor de R_f :0,86 reveladas sob vapores de iodo (Figura 28).

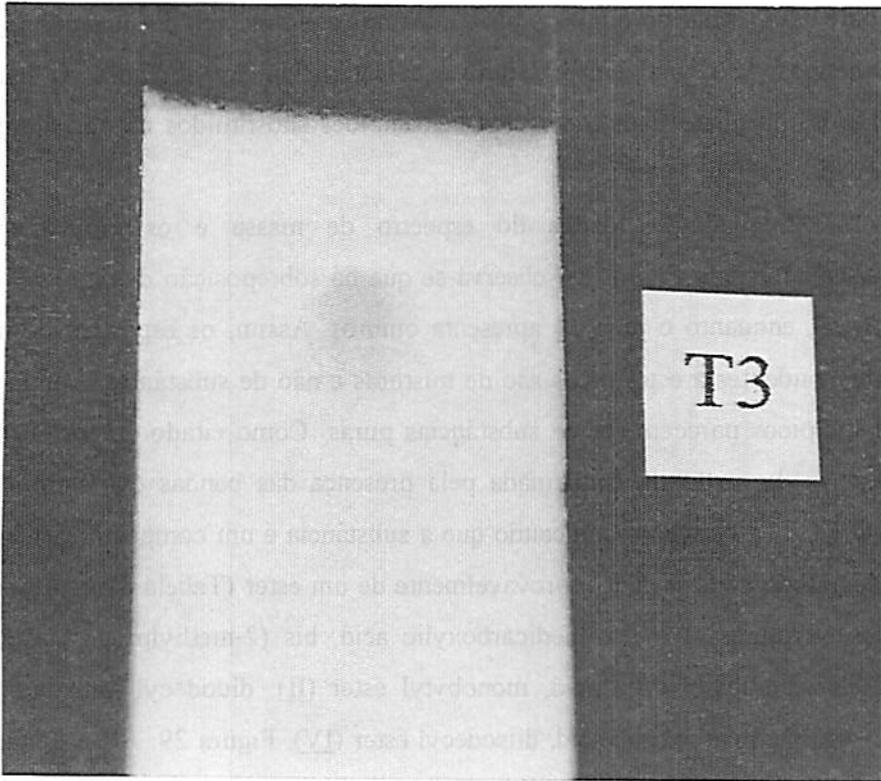


FIGURA 26. Cromatoplasca da amostra do óleo essencial de chapéu de couro desenvolvidas em metanol/clorofórmio 98:2 e reveladas sob exposição a vapores de iodo. UFLA, Lavras/MG, 1999.

De acordo com o espectro de IV apresentado pela Figura 27, observa-se uma banda situada em 3060cm^{-1} que pode ser atribuída ao estiramento da ligação C-H de aromáticos. Entre 2958 e 2856cm^{-1} observa-se uma banda, que é atribuída ao estiramento da ligação C-H dos grupos metilas ($-\text{CH}_3$), metilênicos ($-\text{CH}_2$) e metínicos ($-\text{CH}$). Em 1728 observa-se uma banda forte, evidenciando a presença do grupo carbonílico ($-\text{C}=\text{O}$), o qual é também confirmado pela banda que aparece em 1303cm^{-1} atribuído a estiramentos ($-\text{C}-\text{O}$). Em torno de 1490cm^{-1} , aparece um sinal ao qual são atribuídos aos estiramentos de ligações C-H de aromáticos. Um sinal em 802cm^{-1} é característico de vibrações de ligações C-H fora do plano para compostos benzenóides substituídos na posição orto e para.

Segundo os dados do espectro de massa e os cromatogramas apresentados pela Figura 28, observa-se que há sobreposição dos picos 9 e 10; 17 e 18, enquanto o pico 19 apresenta ombros. Assim, os espectros de massa correspondentes a estes picos são de misturas e não de substâncias simples. Os demais picos parecem ser de substâncias puras. Como citado anteriormente, a presença da carbonila confirmada pela presença das bandas dos estiramentos $\text{C}=\text{O}$ e $\text{C}-\text{O}$ é marcante, indicando que a substância é um composto carbonilado e, de acordo com os dados, provavelmente de um éster (Tabela 8), representado pelas estruturas: 1,2-benzenedicarboxylic acid, bis (2-methylpropyl) éster (I); 1,2-benzenedicarboxylic acid, monobutyl éster (II); didodecyl phthalate (III), 1,2-benzenedicarboxylic acid, diisodecyl éster (IV). Figura 29. Além da mistura complexa de ésteres benzenóides, observou-se a ocorrência de compostos benzenóides alifáticos que podem ter uma ou mais das seguintes estruturas: Benzene,(1-butyloctyl) (V), Benzene,(1-propylnonyl) (VI), Benzene, (1-ethyldecyl) (VII), Benzene,(1-methylundecyl) (VIII), Benzene,(1-propylheptadecyl) (IX) da Figura 30.

O composto hexanodioic acid, dioctyl éster (X), predominante nas frações 7 e 12, encontra-se também no óleo da Figura 31.

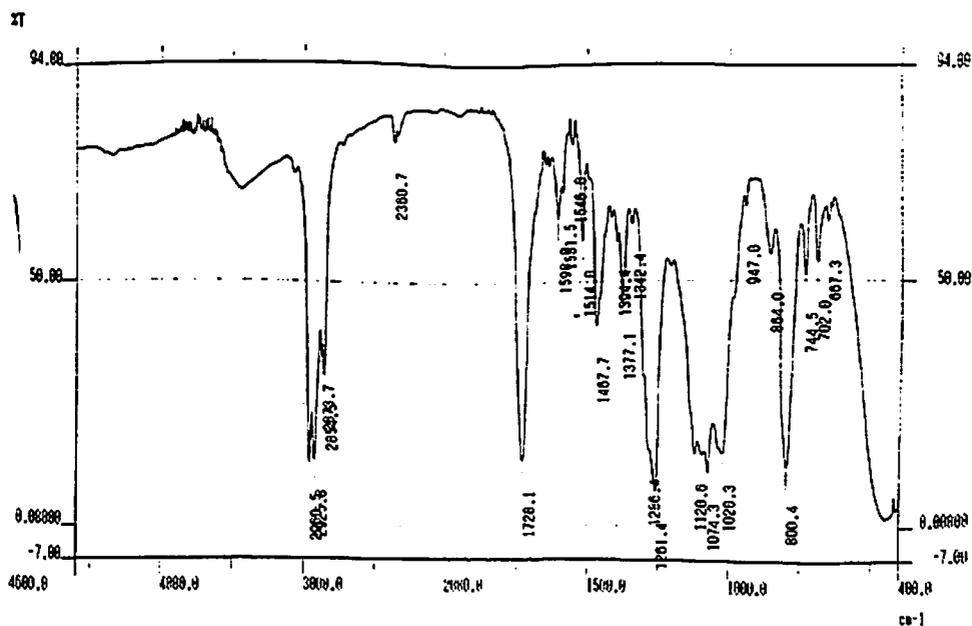
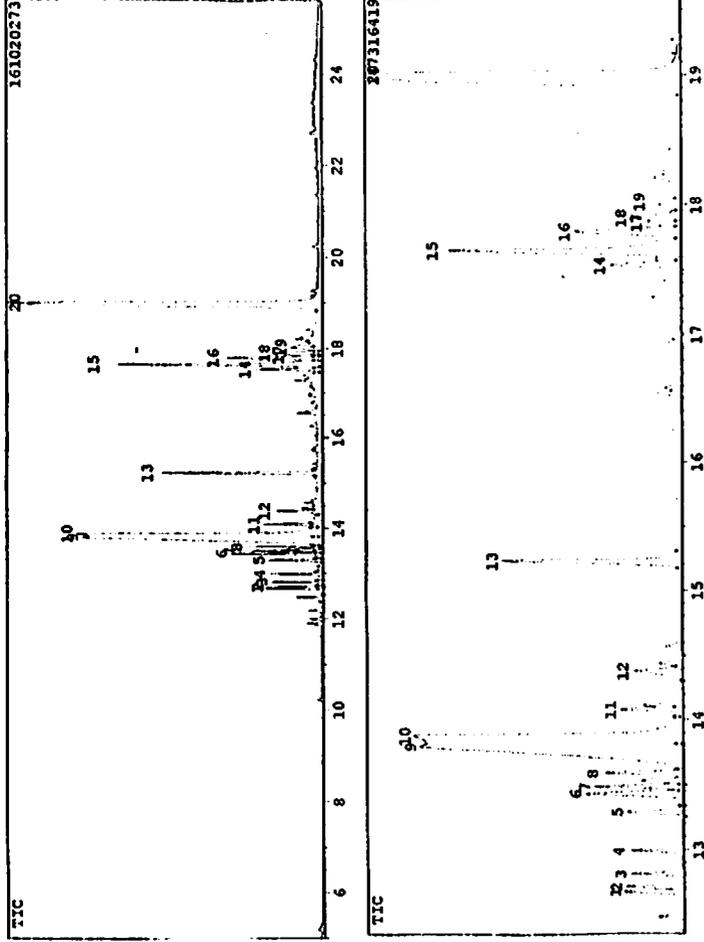


FIGURA 27. Espectro de infravermelho do óleo essencial de chapéu de couro. UFLA, Lavras/MG, 1999.



<Unknown Spectrum>
 PKNO : 15 Mass Peak # : 294 Ret .Time : 17.650
 Scan # : (1513 - 1530)
 Base Peak : 57.00 (4409807)

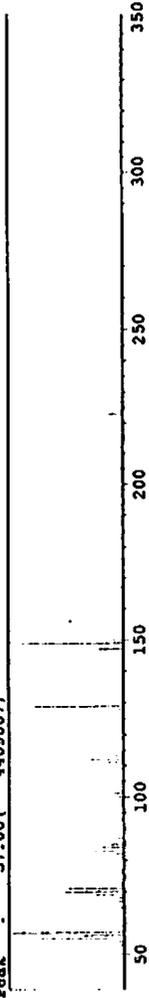


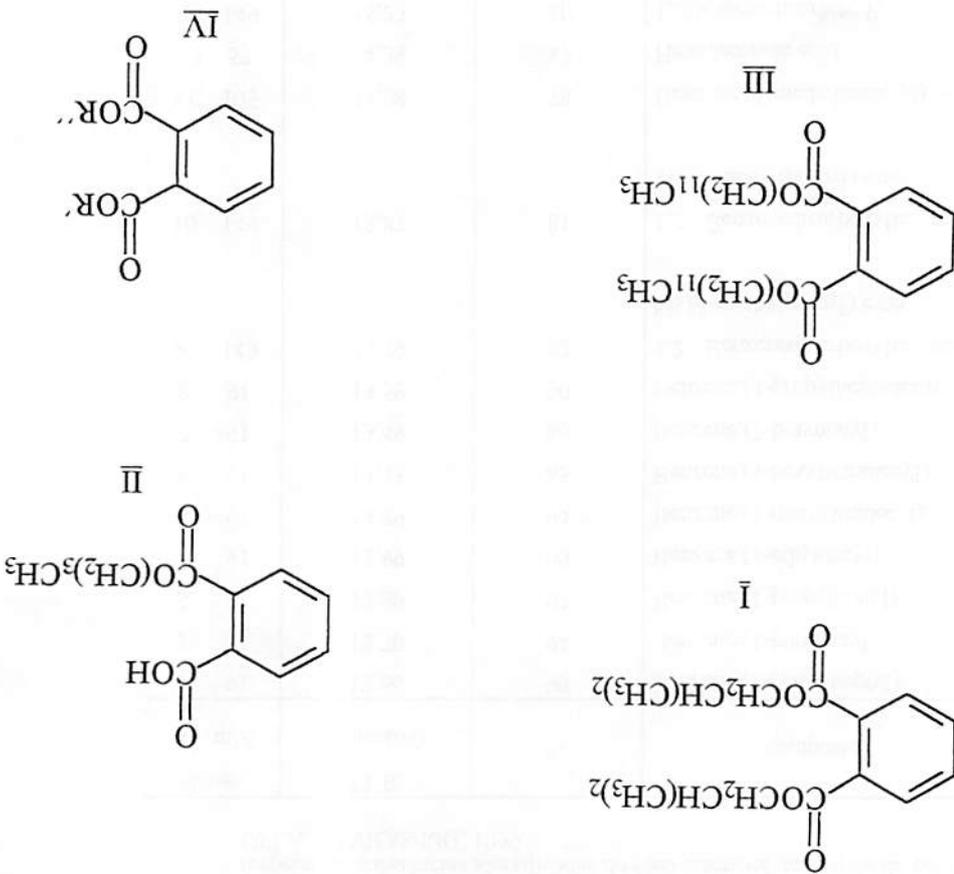
FIGURA 28. Espectro de massa do óleo essencial de chapéu de couro UFLA,
 Lavras/MG, 1999

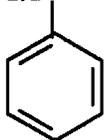
Tabela 8. Valores de fragmentos de massa, probabilidade, tempo de retenção e respectivas substâncias identificadas do óleo essencial de chapéu de couro. UFLA, LAVRAS/MG, 1999.

Sinais Nº m/Z	*T.R. (minutos)	%	composto
1. 91	12,66	90	Benzene,(1-pentylheptyl)
2. 91	12,70	94	Benzene,(1-butylloctyl)
3. 91	12,80	92	Benzene,(1-propylnonyl)
4. 91	12,99	90	Benzene,(1-ethyldecyl)
5. 91	13,29	94	Benzene,(1-methylundecyl)
6. 91	13,43	85	Benzene,(1-hexyltetradecyl)
7. 91	13,49	86	Benzene,(1-butynonyl)
8. 91	13,59	90	Benzene,(1-propylheptadecyl)
9. 149	13,79	82	1,2 Benzenedicarboxylic acid, bis (2-methylpropyl) ester
10. 149	13,87	81	1,2 Benzenedicarboxylic acid, bis (2-methylpropyl) ester
11. 105	14,08	78	Benzene,(1-methylundecyl)
12. 57	14,38	87	Hexadecanoic acid
13. 149	15,23	80	1,2Benzenedicarboxylic acid,mono(2-ethylhexyl) ester
14. 149	17,54	88	Didodecyl phthalate
15. 57	17,65	84	Hexanedioic acid, dioctyl ester
16. 149	17,80	88	Didodecyl phthalate
17. 149	17,85	88	Didodecyl phthalate
18. 149	17,90	88	Didodecyl phthalate
19. 149	18,02	87	Didodecyl phthalate
20. 149	19,00	86	Di-n- octyl phthalate

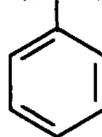
* Tempo de retenção

FIGURA 29. Prováveis estruturas majoritárias encontradas no óleo essencial de chapêu de couro. UFLA, Lavras/MG, 1999.

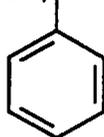




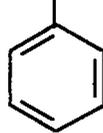
V



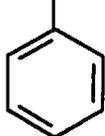
VI



VII

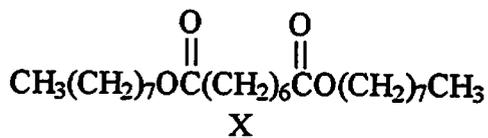


VIII



IX

FIGURA 30. Prováveis estruturas majoritárias das misturas complexas do óleo essencial de chapéu de couro. UFLA, Lavras/MG, 1999.



X
Hexanodióico dioctil éster
(Amostra 7, 12 e óleo)

FIGURA 31. Provável estrutura química presente no óleo essencial e no extrato de folhas de chapéu de couro. UFLA, Lavras/MG, 1999.

7.4 Conclusões

Baseando-se na interpretação e comparação visual dos parâmetros obtidos no IV e no CG/EM, as estruturas sugeridas (pelo computador) presentes no óleo de folhas de chapéu de couro podem ser ésteres benzenóides. A partir dos dados apresentados pelo banco de dados, confirma-se que o óleo essencial é quimicamente composto por uma mistura complexa de ésteres benzenóides de cadeia longa, sendo que entre aqueles apresentados na Tabela 8, os majoritários são: 1,2-benzenedicarboxylic acid, bis (2 metylpropyl) éster; 1,2-benzenedicarboxylic acid, monobutyl éster; didodecyl phthalate; 1,2-benzenedicarboxylic acid; didodecyl éster; 1,2-benzenedicarboxylic acid, diisodecyl éster; phthalic acid, diisodecyl éster; hexanodioc acid, dioctyl éster.

Além desta mistura complexa, observou-se a ocorrência de compostos benzenóides alifáticos que podem ter uma ou mais das seguintes estruturas: benzene,(1-butyloctyl), benzene,(1-propylnonyl), benzene, (1-ethyldecyl), benzene,(1-methylundecyl), benzene,(1-propylheptadecyl). O composto hexanodioic acid, dioctyl éster, predominante nas frações 7 e 12, encontra-se também no óleo, portanto conclui-se que este deve ser um dos componentes responsáveis pelo princípio ativo da planta.

Neste trabalho, apenas alguns compostos puderam ser identificados, havendo, assim, a necessidade de que sejam realizados novos estudos para identificar um maior número deles, tendo em vista que todas as análises realizadas indicaram ser este óleo constituído de dezenas de elementos. Assim, um estudo detalhado com dados obtidos por RMN¹H e RMN¹³C em conjunto com aqueles obtidos, elucidaria claramente as estruturas dos compostos.

7.5 Referências Bibliográficas

- CARVALHO, E.S.; SANTOS, M.G.; FEVEREIRO, P.C.A.; ROCHA, L.M. Investigação da composição química do óleo essencial de *anemia tomentosa* (Savigny) Swartz var *anthriscifolia* (Schrader) Michkel (Schizaeaceae-Pteridophyta) uma nova fonte de álcool de Patchouli In: 21ª Reunião anual da sociedade brasileira de química, 25 a 28 maio, Poços de Caldas-MG, 1998. v.2, 144 P.N.
- CASTRO, D.M. Caracterização isozimática da anatomia foliar, do óleo essencial e germinação de *Leonurus sibiricus* L. Viçosa: UFV, 1998. 96p. (Tese mestrado em Fitotecnia)
- CRAVEIRO, A.A; FERNANDES, A.G.; ANDRADE, C.H.S.; MATOS, F.J.A.; ALENCAR, J.W.; MACHADO, M.I.L. Óleos essenciais de plantas do nordeste, Fortaleza, ed UFC, 1981. 210 p.
- MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M. de.; CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E. *Plantas Medicinais*. Viçosa: UFV, 1995. 220 p.
- NASCIMENTO, E.A.; CHANG, R.; QUEIROS, C.R.A.A. Estudos dos óleos essenciais da erva cidreira e da citronela, In: XII Encontro Regional da sociedade brasileira de química, 28 a 30 de Outubro, Ouro Preto-MG, 1998, 133 p.

ANEXO I

Item	Descrição	Quantidade	Valor Unitário	Valor Total
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100

ANEXO

Item	Descrição	Quantidade	Valor Unitário	Valor Total
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100

Item	Descrição	Quantidade	Valor Unitário	Valor Total
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100

Item	Descrição	Quantidade	Valor Unitário	Valor Total
1
2
3
4
5
6</

Experimento 1

Dependent Variable: B

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
REPIC	1	3.0085470	3.0085470	0.99	0.3325
Error	20	60.9914530	3.0495726		
Corrected Total	21	64.0000000			
	R-Square	C.V.	Root MSE		B Mean
	0.047009	43.65756	1.7403		4.0000
	REPIC	B			
		LSMEAN			
	1	4.30769231			
	2	3.55555556			

Dependent Variable: TAMB

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
REPIC	1	0.0102640	0.0102640	0.27	0.6079
Error	20	0.7554632	0.0377732		
Corrected Total	21	0.7657273			
	R-Square	C.V.	Root MSE		TAMB Mean
	0.013404	28.09310	0.1944		0.6918
	REPIC	TAMB			
		LSMEAN			
	1	0.67384615			
	2	0.71777778			

Dependent Variable: NMR

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
REPIC	1	0.9506944	0.9506944	0.64	0.4477
Error	8	11.9305556	1.4913194		
Corrected Total	9	12.8812500			
	R-Square	C.V.	Root MSE		NMR Mean
	0.073005	39.71369	1.2212		3.0750
	REPIC	NMR			
		LSMEAN			
	1	2.97222222			
	2	4.00000000			

Dependent Variable: NR

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
REPIC	1	15.391026	15.391026	0.77	0.3907
Error	23	462.608974	20.113434		
Corrected Total	24	478.000000			

R-Square	C.V.	Root MSE	NR Mean
0.032199	39.66207	4.4048	11.600

REPIC	NR LSMEAN
1	10.8461538
2	12.4166667

Dependent Variable: NR

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
ME10	1	588.09919	588.09919	41.13	0.0001
Error	36	514.76923	14.29915		
Corrected Total	37	1102.86842			

R-Square	C.V.	Root MSE	NR Mean
0.533245	43.15135	3.7814	8.7632

ME10	NR LSMEAN
1	11.6000000 a
2	3.3076923 b

Dependent Variable: TAMEX

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
REPIC	1	0.2374962	0.2374962	1.07	0.3060
MEIO	1	2.0953205	2.0953205	9.47	0.0036
REPIC*MEIO	1	0.4069050	0.4069050	1.84	0.1821
Error	43	9.5158120	0.2212980		
Corrected Total	46	12.4574460			

R-Square	C.V.	Root MSE	TAMEX Mean
0.236135	37.60185	0.4704	1.2511

REPIC	TAMEX LSMEAN
1	1.30769231 a
2	1.16388889 a

MEIO	TAMEX LSMEAN
1	1.44935887 a
2	1.02222222 b

REPIC	MEIO	TAMEX LSMEAN
1	1	1.61538462 a
1	2	1.00000000 a
2	1	1.28333333 a
2	2	1.04444444 a

Experimento 2

Dependent Variable: NR

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F. Value	Pr > F	
DOSE	3	913.90252	304.63417	5.22	0.0068	Si
PLANTAS	2	217.36209	108.68104	1.86	0.1782	Si
DOSE*PLANTAS	6	174.33710	29.05618	0.50	0.8036	Si
Error	23	1343.4500	58.4109			
Corrected Total	34	3012.5714				

R-Square	C.V.	Root MSE	NR Mean
0.554052	43.85156	7.6427	17.429

DOSE	NR LSMEAN	
2	22.9000000	a
1	16.0833333	a b
3	12.6333333	b
4	5.3333333	b

PLANTAS	NR LSMEAN	
1	15.6375000	a
2	17.2000000	a
3	9.8750000	a

DOSE	PLANTAS	NR LSMEAN	
1	1	15.7500000	a
1	2	23.0000000	a
1	3	9.5000000	a
2	1	21.8000000	a
2	2	28.4000000	a
2	3	18.5000000	a
3	1	13.0000000	a
3	2	14.4000000	a
3	3	10.5000000	a
4	1	12.0000000	a
4	2	3.0000000	a
4	3	1.0000000	a

Dependent Variable: HF

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
DOSE	3	4308.6556	1436.2185	6.79	0.0015
PLANTAS	2	1222.1445	611.0723	2.89	0.0728
DOSE*PLANTAS	6	1309.4509	218.2418	1.10	0.3861
Error	27	5707.4667	211.3877		
Corrected Total	38	13272.3590			

R-Square	C.V.	Root MSE	HF Mean
0.569973	57.85999	14.539	25.128

DOSE	HF LSMEAN
4	38.333333 a
3	30.377778 a
2	22.466667 a b
1	7.166667 b

PLANTAS	HF LSMEAN
1	28.045833 a
2	30.087500 a
3	15.625000 a

DOSE	PLANTAS	HF LSMEAN
1	1	6.250000 a
1	2	9.750000 a
1	3	5.500000 a
2	1	33.600000 a
2	2	21.800000 a
2	3	12.000000 a
3	1	41.333333 a
3	2	38.800000 a
3	3	11.000000 a
4	1	31.000000 a
4	2	50.000000 a
4	3	34.000000 a

Dependent Variable: NB

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
D	3	347.06285	115.68762	14.36	0.0001
Pt	2	117.22171	58.61085	7.28	0.0027
DOSE*PLANTAS	6	97.69538	16.28256	2.02	0.0849
Error	29	233.60000	8.05517		
Corrected Total	40	813.21951			

R-Square	C.V.	Root MSE	NB Mean
0.712747	50.15720	2.8387	5.6585

DOSE	NB LSMEAN
4	9.5555556 a
3	7.2000000 a b
2	5.4000000 b
1	1.1666667 c

PLANTAS	NB LSMEAN
1	7.4583333 a
2	6.8500000 a
3	3.2500000 b

DOSE	PLANTAS	NB LSMEAN
1	1	1.0000000 a
1	2	1.5000000 a
1	3	1.0000000 a
2	1	7.0000000 a
2	2	5.2000000 a
2	3	4.0000000 a
3	1	10.3333333 a
3	2	10.2000000 a
3	3	1.3333333 a
4	1	11.5000000 a
4	2	10.5000000 a
4	3	6.6666667 a

Dependent Variable: TMB

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F	
DOSE	3	0.6491916	0.2163972	5.15	0.0060	Siti
PLANTAS	2	0.0247960	0.0123980	0.30	0.7468	43
DOSE*PLANTAS	6	0.2718400	0.0453067	1.08	0.3997	43
Error	27	1.1341383	0.0420051			
Corrected Total	38	2.1813436				
	R-Square	C.V.	Root MSE	TMB Mean		
	0.480074	27.91885	0.2050	0.7341		

DOSE	TMB LSMEAN	
1	0.92555556	a
4	0.81277778	a b
2	0.66916667	b
3	0.59177778	b

PLANTAS	TMB LSMEAN	
1	0.71291667	a
2	0.76570833	a
3	0.77083333	a

DOSE	PLANTAS	TMB LSMEAN	
1	1	1.00000000	a
1	2	0.94333333	a
1	3	0.83333333	a
2	1	0.67000000	a
2	2	0.58750000	a
2	3	0.75000000	a
3	1	0.57666667	a
3	2	0.53200000	a
3	3	0.66666667	a
4	1	0.60500000	a
4	2	1.00000000	a
4	3	0.83333333	a

