

15455

MFN=26564

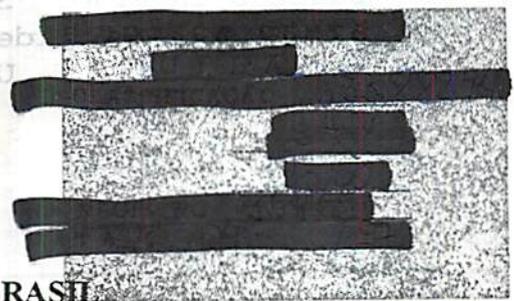
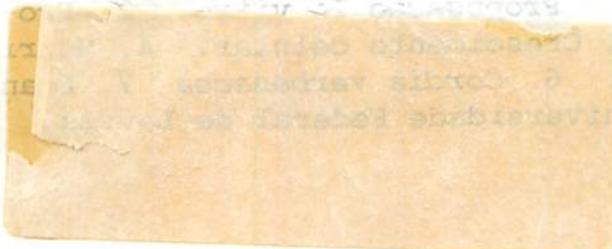
**OSMAR ALVES LAMEIRA**

**PROPAGAÇÃO IN VITRO E IN VIVO, DINÂMICA DE CRESCIMENTO  
DE CÉLULAS, NUTRIÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE FLAVONÓIDES  
EM ERVA-BALEEIRA (*Cordia verbenacea* L.).**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,  
como parte das exigências do Curso de Doutorado em  
Agronomia, área de concentração em Fitotecnia, para  
obtenção do título de "Doutor".

**Orientador**

Prof JOSÉ EDUARDO BRASIL PEREIRA PINTO



LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
1997

FICHA CATALOGRÁFICA PREPARADA PELA SEÇÃO DE CLASSIFICAÇÃO E  
CATALOGAÇÃO DA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFLA

Lameira, Osmar Alves

Propagação *in vitro* e *in vivo*, dinâmica de crescimento de células, nutrição e identificação de flavonóides em erva-baleeira (*Cordia verbenacea* L. / Osmar Alves Lameira. --Lavras : UFLA, 1997.

88 p. : il.

Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto.

Tese (Doutorado) - UFLA.

Bibliografia.

1. Erva-baleeira - Propagação *In vitro*. 2. Propagação *In vivo*. 3. Crescimento celular. 4. Nutrição. 5. Flavonóide. 6. *Cordia verbenacea* 7. Planta medicinal. I. Universidade Federal de Lavras.

II. Título.

CDD-633.88394

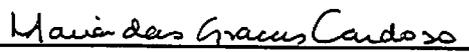
-583.394

**OSMAR ALVES LAMEIRA**

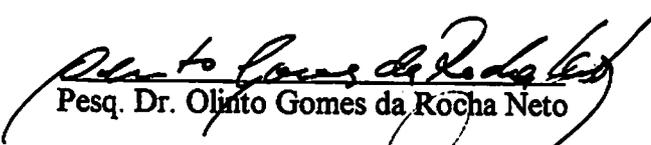
**PROPAGAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO*, DINÂMICA DE CRESCIMENTO  
DE CÉLULAS, NUTRIÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE FLAVONÓIDES EM  
ERVA-BALEEIRA (*Cordia verbenacea* L.).**

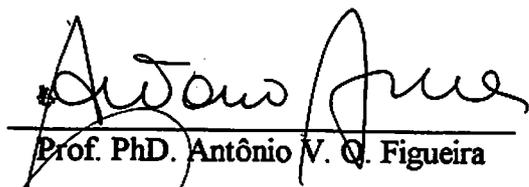
Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,  
como parte das exigências do Curso de Doutorado em  
Agronomia, área de concentração em Fitotecnia, para  
obtenção do título de "Doutor".

APROVADA em 14 de março de 1997

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Maria das Graças Cardoso

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Rubens José Guimarães

  
\_\_\_\_\_  
Pesq. Dr. Olinto Gomes da Rocha Neto

  
\_\_\_\_\_  
Prof. PhD. Antônio V. Q. Figueira

  
\_\_\_\_\_  
Prof. PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto  
(Orientador)

*Aos meus pais*

*João Lameira e Maria de Nazaré*

*e irmãos Mundinha, Valdo, Socorro, Conceição e Hozana*

*e a tia Flôr.*

**OFEREÇO**

**Sob a mão Divina  
as plantas medicinais  
podem curar.**

*À minha esposa Fátima*

*e aos meus filhos Jean, Pablo e Diego*

*e a memória de minha sogra Maria Florentina*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

À Deus por tudo

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA/CPATU pela liberação para a realização do curso.

À Universidade Federal de Lavras-UFLA, através do Departamento de Agricultura pelo aceite e condições oferecidas para realização do curso.

À CAPES pelo apoio financeiro

Ao professor José Eduardo Brasil Pereira Pinto pela valiosa orientação, apoio, convívio agradável e amizade antes e depois do curso.

À Professora Maria das Graças Cardoso pela valiosa orientação na parte fitoquímica e amizade.

Ao Professor Rubens José Guimarães pelas sugestões apresentadas na defesa de Tese e amizade.

Ao colega pesquisador Dr. Olinto Rocha da EMBRAPA-CPATU, pela amizade e participação na defesa de Tese.

Ao pesquisador Dr. Antonio Figueira da ESALQ pelas sugestões e participações na defesa de Tese.

Aos laboratórios de Biotecnologia, Química Orgânica, Anatomia e Morfologia de Plantas e Fisiologia da UFLA pelo espaço cedido para a realização das pesquisas.

Aos laboratórios de Agroindústria da EMBRAPA/CPATU e Química da UFMG e São Carlos, SP pelas análises realizadas.

Ao casal Arie e Fátima Blank por todo o apoio dado, amizade e agradável convívio.

Aos professores dos diferentes Departamentos da UFLA pelos ensinamentos adquiridos durante o curso.

Ao Prof. David Lee Nelson da UFMG, pelas sugestões nas análises realizadas.

Ao casal Ailton e Elaine, Brandão, Denize, Elizita, Ilka, Laura, Marly, Márcia e aos demais colegas pela amizade e agradável convívio durante o curso.

As estudantes Solange e Flávia pela amizade e apoio técnico.

Ao Edson Artiaga pelo apoio e amizade.

A Ana Hortência e Evaldo pela valiosa colaboração na execução de algumas pesquisas.

Aos estagiários do laboratório de Química Orgânica pelo agradável convívio.

A professora Janice Guedes e ao casal Pedro Hélio e Mary pela agradável amizade

Aos bibliotecários da UFLA pela atenção dispensada.

Enfim, a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, nossos agradecimentos.

## **BIOGRAFIA DO AUTOR**

Osmar Alves Lameira, filho de João Lameira e Maria de Nazaré Alves Lameira, nasceu em Belém,PA em 27.08.51. Eng.Agrônomo, graduado pela Faculdade de Ciências Agrárias do Pará em dezembro de 1976.

Trabalhou em Roraima pelo Serviço de Extensão Rural da ASTER-RR de 1977 a 1979. Em 1980 iniciou as suas atividades de pesquisa no Núcleo de Pesquisa Agropecuária de Roraima da EMBRAPA, posteriormente, em 1982 o Núcleo de Pesquisa passaria a UEPAT de Boa Vista-EMBRAPA.

Realizou o Curso de Pós-Graduação a nível de Mestrado na área de Cultura de Tecido de Plantas no período de março de 1986 a novembro de 1987 na Escola Superior de Agricultura de Lavras. Retornando a Roraima , trabalhou até 1989 quando foi transferido para o Centro de Pesquisa de Coco da EMBRAPA em Sergipe em janeiro de 1990, desenvolvendo suas atividades de pesquisa em Natal-RN até dezembro de 1990. Em janeiro de 1991, foi transferido para o Centro de Pesquisa Agropecuária da Amazônia Oriental-CPATU da EMBRAPA desenvolvendo pesquisas na área de Biotecnologia de plantas principalmente, com plantas medicinais.

Foi responsável pelo laboratório de Biotecnologia do CPATU de agosto de 1991 até janeiro de 1994.

Realizou curso de especialização em Biotecnologia de Plantas no Japão no período de março a junho de 1992.

Em fevereiro de 1994 foi liberado para realizar o curso de Pós-Graduação a nível de Doutorado em Biotecnologia de Plantas na Universidade Federal de Lavras, iniciando o curso em março de 1994 e concluindo em março de 1997.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS .....	x
LISTA DE FIGURAS .....	xi
RESUMO .....	xiv
ABSTRACT .....	xv
1 INTRODUÇÃO GERAL .....	1
1.1 Objetivos .....	5
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	7
2.1 Micropropagação .....	7
2.2 Crescimento celular × metabólitos secundários .....	9
2.3 Reguladores de crescimento × metabólitos secundários .....	11
2.4 Propagação vegetativa e nutrição .....	13
2.5 Flavonóides .....	14
2.6 Análise e determinação fitoquímica .....	16
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	18
4 CAPÍTULO I .....	23
MICROPROPAGAÇÃO DE <i>Cordia verbenacea</i> L. ....	23
RESUMO .....	23
ABSTRACT .....	24
4.1 INTRODUÇÃO .....	25
4.2 Micropropagação de <i>Cordia verbenacea</i> L. através de segmento apical e nodal .....	28
4.2.1 Material e Métodos .....	28
4.2.2 Resultados e Discussão .....	28
4.2.3 Conclusões .....	32
4.3 Efeito de compostos fenólicos, carvão ativado e do meio físico no desenvolvimento <i>in vitro</i> de segmento nodal de erva-baleeira .....	33
4.3.1 Material e Métodos .....	33
4.3.2 Resultados e Discussão .....	33
4.3.3 Conclusões .....	37

4.4 Efeitos da concentração de agar e sacarose na multiplicação <i>in vitro</i> de segmento nodal de erva-baleeira .....	38
4.4.1 Material e Métodos .....	38
4.4.2 Resultados e Discussão .....	39
4.4.3 Conclusão .....	42
4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	42
5 CAPÍTULO II .....	45
INDUÇÃO DE CALOS E ESTABELECIMENTO DA CURVA DE CRESCIMENTO CELULAR DE ERVA-BALEEIRA .....	45
RESUMO .....	45
ABSTRACT .....	46
5.1 INTRODUÇÃO .....	46
5.2 Efeito de thidiazuron na indução e manutenção de calos de erva-baleeira .....	48
5.2.1 Material e Métodos .....	48
5.2.2 Resultados e Discussão .....	49
5.2.3 Conclusões .....	52
5.3 Estabelecimento da curva de crescimento de calos e de células em suspensão de erva-baleeira .....	52
5.3.1 Material e Métodos .....	52
5.3.2 Resultados e Discussão .....	53
5.3.3 Conclusões .....	57
5.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	58
6 CAPÍTULO III .....	59
ENRAIZAMENTO DE MICROESTACAS E NUTRIÇÃO DE PLÂNTULAS DE ERVA-BALEEIRA .....	59
RESUMO .....	59
ABSTRACT .....	60
6.1 INTRODUÇÃO .....	60
6.2 Enraizamento de microestacas de erva-baleeira .....	61
6.2.1 Material e método .....	61
6.2.2 Resultados e Discussão .....	62
6.2.3 Conclusões .....	65
6.3 Efeito do meio nutritivo MS sobre o desenvolvimento de plântulas de erva-baleeira .....	65
6.3.1 Material e Métodos .....	65
6.3.2 Resultados e Discussão .....	67
6.3.3 Conclusões .....	72
6.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	72
7 CAPÍTULO IV .....	74
IDENTIFICAÇÃO DE FLAVONÓIDES EM ERVA-BALEEIRA .....	74
RESUMO .....	74
ABSTRACT .....	75
7.1 INTRODUÇÃO .....	75

	<b>Página</b>
<b>7.2 Extração, separação e identificação de flavonóides em erva-baleeira .....</b>	<b>76</b>
<b>7.2.1 Material e Métodos .....</b>	<b>76</b>
<b>7.2.2 Resultados e Discussão .....</b>	<b>78</b>
<b>7.2.3..Conclusões .....</b>	<b>86</b>
<b>7.3..REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>86</b>
<b>8 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....</b>	<b>88</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Metabólitos secundário produzidos em altos níveis por cultura de células de planta .....	10
2	Resumo do quadro de análise de variância do número e comprimento de propágulos de erva-baleeira .....	29
3	Resumo do quadro de análise de variância do número e comprimento de propágulos de erva-baleeira .....	39
4	Efeito de agar e sacarose sobre o número e comprimento de propágulos de erva-baleeira .....	40
5	Percentagem de indução, manutenção e peso fresco de calos em segmentos caulinares de <i>Cordia verbenacea</i> sob o efeito de TDZ .....	49
6	Resumo do quadro de análise de variância do percentual de enraizamento $\sqrt{x+5}$ , peso seco, número e comprimento de raiz $\sqrt{x+0,5}$ de microestacas de erva-baleeira .....	63
7	Composição química do meio MS e suas respectivas concentrações.....	66
8	Resumo do quadro de análise de variância do peso fresco e seco e comprimento de raiz e do peso fresco e seco e altura da parte aérea de plantas de erva-baleeira .....	67
9	Efeito da concentração de soluções nutritivas do meio MS sobre o rendimento da biomassa seca na parte aérea e no sistema radicular das plantas de erva-baleeira .....	71
10	Valores das $R_f$ obtidas na cromatografia planar sob vários solventes em extratos diluídos em metanol .....	79

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Fotografia ilustrativa da descrição botânica da planta de erva-baleeira .....	4
2	Estrutura molecular de 5-hidroxy-3,6,7,3',4' - pentametoxiflavona (artemetina) (Mabry, Markham e Thomas, 1970) .....	4
3	Rota biossintética dos flavonóides (Mabry, Markham e Thomas, 1970) .....	15
4	Estrutura molecular das principais classes de flavonóides. (I) Flavona, (II) Flavonol, (III) Isoflavona e (IV) Chalcona (Mabry, Markham e Thomas, 1970) .....	15
5	Efeito de explanate nodal (T1) e apical (T2) no desenvolvimento de propágulos de erva-baleeira .....	29
6	Efeito de cinetina sobre o número(A) e comprimento (B) de propágulos em erva-baleeira.....	31
7	Enraizamento (A) e estabelecimento (B) de plântulas de erva-baleeira .....	32
8	Efeito do meio de cultura MS suplementado com floroglucinol (T1), catecol (T2), ácido clorogênico (T3) e carvão ativado (T4) sobre o número de propágulos de erva-baleeira.....	34
9	Efeito do meio de cultura MS suplementado com floroglucinol (T1), catecol (T2), ácido clorogênico (T3) e carvão ativado (T4) sobre o comprimento de propágulos de erva-baleeira.....	35
10	Eficiência do meio líquido de cultivo sobre o meio sólido na formação e crescimento de propágulos de erva-baleeira .....	36

Figura	Página
11	Formação de calos (A) e vitrificação (B) de explantes de propágulos de erva-baleeira ..... 41
12	Percentual de área coberta com calos em diferentes concentrações de TDZ. 50
13	Efeito de TDZ no desenvolvimento de calos de erva-baleeira. (A), T1- 0,22 $\mu$ M; T2 - 0,68 $\mu$ M e T3 - 2,04 $\mu$ M e (B) calo friável em crescimento ..... 51
14	Curva de crescimento de calos de <i>Cordia verbenacea</i> a partir do peso fresco e seco (A) e do percentual de crescimento (B) ..... 54
15	Curva de crescimento de células em suspensão de <i>Cordia verbenacea</i> a partir do peso fresco e seco (A) e do percentual de crescimento (B) ..... 55
16	Fonte de explantes (A) e suas respectivas estruturas celulares. (B) Calo, (C) Segmento caulinar e (D) Folha ..... 57
17	Efeito de AIB sobre o enraizamento (A), peso seco (B), número (C) e comprimento de raiz em microestacas de erva-baleeira (D) ..... 63
18	Efeito de AIB na formação do sistema radicular de microestacas (A) T1- 250mg.L <sup>-1</sup> , T2- 500mg.L <sup>-1</sup> , T3- 750mg.L <sup>-1</sup> e T4- 0mg.L <sup>-1</sup> e (B) Estabelecimento de microestacas de erva-baleeira ..... 64
19	Efeito da solução nutritiva MS sobre o peso fresco e seco de raiz (A) e da parte aérea de plantas (B) de erva-baleeira ..... 68
20	Efeito da solução nutritiva MS sobre altura de plantas (A) e comprimento de raiz (B) de plantas de erva-baleeira ..... 69
21	Efeito da solução nutritiva do meio MS sobre a formação e crescimento do sistema radicular (A) e da parte aérea (B) de plantas de erva-baleeira ..... 70
22	Espectro de absorção de Ultravioleta em 100% de metanol ..... 80
23	Espectro de infravermelho de flavonóides em folha(A) e suspensão de células (B) de plantas de erva-baleeira..... 81

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
24	Espectro de RMN <sup>1</sup> H de flavonóides em folha (A) e suspensão de células (B) de erva-baleeira.....	82
25	Espectrometria de Massa de flavonóides em folha e suspensão de células de plantas de erva-baleeira.....	83
26	Estrutura molecular dos compostos 7,4'-diidroxí-3'-carboximetóxi isoflavona e 7,4'-diidroxí-3'-metil isoflavona de erva-baleeira.....	84
27	Fragmentos da estrutura do composto I.....	85
28	Fragmentos da estrutura do composto II.....	86

## RESUMO

LAMEIRA, Osmar Alves. **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 Agronomia, área Fitotecnia).\*

A utilização de plantas medicinais, tanto na farmacopéia como na medicina caseira, é praticada desde os primórdios da civilização humana. A partir da década de 80, elas passaram a ser novamente valorizadas como fonte de propriedades curativas de baixíssimo custo. Não existem relatos de trabalhos na literatura sobre a micropropagação da espécie de *Cordia verbenacea*. Neste trabalho técnicas in vitro e in vivo, estudos com soluções nutritivas e a influência de reguladores de crescimento sobre a formação e manutenção de calos e a correlação do crescimento celular com o teor de princípio ativo bem como a sua identificação foram aplicados. O segmento apical é a fonte de explante mais eficiente para micropropagação sob o meio de cultivo MS, suplementado com 5 $\mu$ M de cinetina + 0,01 $\mu$ M de ANA. O meio líquido de cultivo contendo ácido clorogênico mostraram eficiência na multiplicação de propágulos. A concentração a partir de 2,04 $\mu$ M de TDZ foi eficiente na formação de calos. A curva de crescimento celular de erva-baleeira apresentou cinco fases distintas. Houve influência significativa do AIB e da solução nutritiva do meio MS sobre o enraizamento e o crescimento de plântulas de erva-baleeira. Os flavonóides identificados foram 7,4'-diidroxí-5'-carboximetóxi isoflavona e 7,4'-diidroxí-5'-metil isoflavona.

---

\* Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto. Membros da Banca: Maria das Graças Cardoso, Rubens José Guimarães, Antônio V. O. Figueira, Olinto Gomes da Rocha Neto.

## ABSTRACT

### **PROPAGATION IN VITRO AND IN VIVO CELLS GROWTH DINAMIC, FLAVONOIDS NUTRITION AND IDENTIFICATION IN *Cordia verbenaceae* L.**

The medicinal plants use in farmacology and popularly medicine is practiced from human civilization early. Therefore early 80 decade it were newly valorized as source of curative proprietary of cust slower. There are no previous reports on micropropagation of any species of *Cordia verbenaceae*. In this study, in *vitro* and in *vivo* techniques, nutrition solution study, influence of growth regulators on callus formation and maintenance and cell growth correlation with active principle and it identification were applied. The treatment containing shoot tip cultured in 5 $\mu$ M Kin and 0.01 $\mu$ M NAA was more efficient. The liquid medium supplemented with chlorogenic acid show more ifficiency in propagule multiplication. The TDZ concentration over of 2.04 $\mu$ M was efficient to callus formation. The cell growth curve showed distincts five phasis. Thre is significtive effect of IBA and nutritive solution fo MS medium on plantlets rooting and growth of *Cordia verbenaceae*. The flavonoids identifieds were 7,4'-dihydroxy-5'-carboxymethoxy isoflavone and 7,4'-dihydroxy-5'-methyl isoflavone.

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A utilização de plantas medicinais, tanto na farmacopéia como na medicina caseira, é praticada desde os primórdios da civilização humana. Na década de 50 até a década de 70, as plantas medicinais foram marginalizadas em virtude do grande impulso que a química orgânica promoveu na medicina alopática. Entretanto, a partir da década de 80, elas passaram a ser novamente valorizadas como fonte de propriedades curativas de baixo custo (Matos, 1987).

O uso de plantas medicinais pela população mundial tem sido muito significativo nos últimos tempos. Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) mostram que cerca de 80% da população mundial fez uso de algum tipo de erva na busca de alívio de alguma sintomatologia dolorosa ou desagradável. Desse total, pelos menos 30% deu-se por indicação médica (Martins et al., 1995).

O consumo mundial de fármacos durante o ano de 1984 foi na ordem de 88,2 bilhões de dólares para uma população estimada em torno de 4,79 bilhões onde 75% vivia nos países em desenvolvimento. A África com menos de 10% da população mundial consumiu de 2 a 3% do total mundial com um consumo médio per capita de 3 dólares. Os países em desenvolvimento responsáveis por 74% da população mundial consumiram menos de 24% com uma média per capita de consumo de 3 dólares, enquanto o mundo desenvolvido compreendido por 25% da população, foi beneficiado com mais de 80% dos 88,2 bilhões de dólares consumidos pela população mundial em drogas, com uma média per capita de 34 dólares. Alguns países do

oeste europeu e os Estados Unidos tiveram um consumo médio per capita de 50 a 55 dólares (Wijesekera, 1991).

As estimativas demonstram que 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).

Nos últimos 25 anos nos países industrializados, 25% das prescrições de drogas contém princípio ativo que são extraídos de plantas superiores. Embora a química orgânica moderna tenha contribuído para um aumento de compostos sintéticos para uso na medicina, várias drogas importantes da medicina moderna são extraídas de plantas medicinais. Algumas destas plantas foram originalmente empregadas como remédios tradicionais, e algumas delas ainda são usadas na terapia tradicional sendo que 51% de todas as preparações nos países industrializados são provenientes de produtos naturais (Wijesekera, 1991).

Na Rússia mais de 33% das drogas são derivadas de plantas. Na França, as drogas de plantas tem um mercado de 60 a 65%. Digitoxin, quinina, atropina, emetina e pilocarpina são alguns dos exemplos que a medicina tradicional tem usado (Wijesekera, 1991).

A introdução e difusão de produtos oriundos da flora medicinal na indústria farmacêutica para a retomada do uso de plantas medicinais como medicamentos, favorece a população brasileira além de atender as recomendações da OMS, para países em desenvolvimento. (LINDA 1992)

Von Martius definiu bem a capacidade de nossas ervas medicinais com esta célebre frase: "As plantas medicinais brasileiras não curam apenas, fazem milagres". É bem provável que das cerca de 200.000 espécies vegetais que possam existir no Brasil, na opinião de alguns autores, pelo menos a metade pode ter alguma propriedade terapêutica útil à população, mas nem 1%

dessas espécies com potencial foi motivo de estudos adequados. As pesquisas com estas espécies devem receber apoio total do poder público, pois além do fator econômico, há que se destacar a importância para a segurança nacional e preservação dos ecossistemas onde existam tais espécies (Martins et al., 1995). Contudo, devido ao processo extrativo indiscriminado e a ocupação acelerada e desordenada de várias regiões brasileiras, provocada pelo intenso fluxo migratório e abertura de novas fronteiras agrícolas, muitas espécies de grande valor econômico estão em vias de extinção ou ameaçadas pela erosão genética. A grande demanda pelos fitoterápicos produzidos por diversas espécies vegetais e dentre estas, pela *Cordia verbenacea* tem provocado um acelerado processo extrativo dessa espécie nas áreas de ocorrência natural. Nessas condições, a regeneração é lenta e o processo de desmatamento tem causado a diminuição da oferta do produto bruto (raízes, lenho e folhas secas) no mercado.

*Cordia verbenacea*, uma Boraginaceae, popularmente conhecida como erva-baleeira, é um arbusto perene nativo que ocorre ao longo de todo o litoral brasileiro. É uma espécie heliófita encontrada nas restingas arenosas e úmidas da orla marítima. A planta apresenta um porte de 1 a 2m, podendo, excepcionalmente atingir até 3m. É muito ramosa e flexível, apresenta folhas tipicamente verrucosas aromáticas, inflorescência espigosa com flores brancas e o fruto vermelho (Figura 1) quando maduro (Silva Junior et al., 1995).

Os princípios ativos básicos da planta são os óleos essenciais e os flavonóides, neste caso, principalmente a artemetina (Figura 2). A principal ação terapêutica da artemetina, isolada por Sertie et al. (1990), é como antiinflamatório e antiinfecioso, para uso externo em ferimentos e contusões. Também é indicada para artrite, reumatismo e problemas de coluna, quando administrada internamente na forma de chá (Guia Rural, 1991).



FIGURA 1. Fotografia ilustrativa da descrição botânica da planta de erva-baleeira

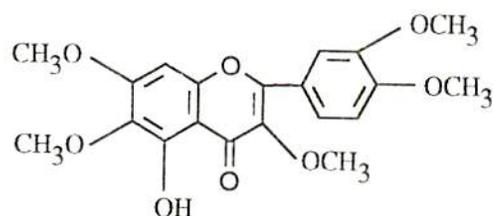


FIGURA 2. Estrutura molecular de 5-hidroxy-3,6,7,3',4'-pentametoxiflavona (artemetina) (Mabry, Markham e Thomas, 1970).

Uma grande quantidade de plantas superiores possuem a capacidade para produzir um grande número de compostos orgânicos de alta diversidade estrutural, chamado de metabólitos secundários e dentre estes, estão os compostos orgânicos produzidos da *Cordia verbenaceae*.

Segundo Tetenyi (1991), a variabilidade genética de plantas medicinais é mais extensiva do que de outras espécies. Populações encontradas em locais de crescimento espontâneo não apresentam um completo balanceamento nas suas características químicas e substâncias ativas. A propagação do material coletado é selecionado casualmente, sendo quase impossível garantir a herança das propriedades composicionais.

Para evitar estas inconveniências a cultura de tecido tem sido utilizada como uma técnica rápida e eficiente: na seleção e propagação de plantas com alto rendimento para o metabólito desejado, estabelecimento de uma linha celular a partir da planta selecionada, otimização do meio de cultura para induzir a síntese e a produção de produtos secundários.

A propagação vegetativa através da estaquia pode ser utilizada como uma outra alternativa para a multiplicação de plantas com características desejáveis particularmente, em espécies que apresentam dificuldades para regeneração através de técnicas *in vitro* (George, 1993). Em ambos os casos, o processo de domesticação da espécie sempre deve prever estudos agronômicos e fisiológicos na definição de um sistema de produção economicamente viável.

Desse modo, através destas técnicas é possível propagar e induzir a síntese e a produção de metabólitos secundários em plantas de erva-baleeira.

## 1.1 Objetivos

- a - Desenvolver um meio de cultura que permita a multiplicação clonal *in vitro* de *Cordia verbenacea*.
- b - Desenvolver um meio de cultura para obtenção de calos e cultivo de células em suspensão de *Cordia verbenacea*.
- c - Avaliar o relacionamento entre o crescimento celular.

- d - Avaliar o efeito de AIB na propagação por estacas de *Cordia verbenacea*.
- e - Avaliar o efeito da solução nutritiva do meio de cultura de Murashige e Skoog (1962) - MS, na formação de mudas de *Cordia verbenacea*.
- f - Extrair e identificar o princípio ativo de *Cordia verbenacea* através de folhas e suspensão de células.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Micropropagação

A seleção clonal é considerada por vários como um procedimento que predetermina a uniformidade das plantas descendentes. O uso da micropropagação de plantas é apropriada para clonar indivíduos melhorados produzindo progenies homogêneas.

Os métodos que estão disponíveis para a propagação *in vitro* de plantas são realizadas pela multiplicação de brotos a partir de gemas axilares e pela formação de brotos adventícios ou embriões somáticos adventícios. Na prática até o presente, as plantas micropropagadas são produzidas em sua maioria pela multiplicação de brotos axilares (George, 1993).

Várias espécies de plantas com propriedades medicinal e inseticida têm sido propagadas através da micropropagação. No Kenya e Equador o método de micropropagação por gemas axilares em pyrethrum (*Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis.) foi o preferido por ter sido o mais rápido na obtenção em grande escala de clones livres de nematóides (Levy, 1981 e Wambugu e Rangan, 1981).

Lakshmi Sita, Bammi e Randhawa (1976), desenvolveram um método rápido para regeneração de plantas em *Dioscorea floribunda* por cultura de segmentos nodais. Na cultura de *Dioscorea deltoidea*, Mascarenhas et al. (1976), usaram como fonte de explantes, broto apical,

segmentos caulinares, folha, tubérculos e raízes. Explantes de tubérculos desenvolveram múltiplos brotos em quatro semanas e os brotos enraizaram. As plântulas obtidas *in vitro* foram transferidas para potes contendo vermiculita e solo.

Mantell, Haque e Whitehall (1978), relatam a regeneração de plantas e a multiplicação clonal em *Dioscorea alata* e *D. rotundata* usando segmentos nodais de plantas crescida sob diferentes fotoperíodo (16 e 12 horas de luz), durante um período de 3 a 5 semanas. Dastoor et al. (1981), relatam o desenvolvimento de brotos e raízes a partir de explantes de folha e segmento na cultura de *Parthenium hysterophorus*.

Plantas de *Cinchona* são de interesse comercial porque contém os alcalóides quinina e quinidina, usados respectivamente, contra malária e arritmia cardíaca. Um método para propagação clonal *in vitro* de *C. ledgeriana* e *C. succirubra* foi desenvolvido através de meristemas apicais cultivados com cotilédones regeneraram inúmeros brotos (Sauerwein, Yoshimatsu e Shimomura, 1992).

Plantas de *Cephaelis ipecacuanha* tem sido regeneradas a partir de explantes de segmentos nodal e internodal por um período de 8 a 10 semanas de cultura sob diferentes condições de cultivo. Métodos eficientes de regeneração de brotos, formação de plântulas, aclimação e transferência para o solo foram desenvolvidos por Yoshimatsu e Shimomura (1991) e Lameira, Costa e Pinto (1994).

Várias espécies de plantas dos quais produtos medicinais podem ser derivados tem sido submetidas a experimentos de micropropagação (Abo-El-Nil, 1977; Bhojwani, 1980; Webb, Osifo e Henshaw, 1983 e Lameira, Costa e Pinto, 1994).

## 2.2 Crescimento celular × metabólitos secundários

O metabolismo secundário manifesta-se em células e tecidos específicos em determinados estágios de crescimento das plantas superiores, sugerindo que a expressão deste metabolismo está intimamente correlacionado com o crescimento e a diferenciação morfológica de células. Segundo Wink (1987) muito esforço tem sido investigado na produção biotecnológica de metabólitos secundários por cultura de células de plantas, destacando-se a produção de alcalóides cancericidas nas culturas de *Catharanthus roseus* (vincristina e vimblastina); *Cephaelis ipecacuanha*, amebicidas (emetina e cefalina); e *Cinchona* spp., maláricos (quinina e quinidina).

Nos últimos anos, a cultura em suspensão de células de plantas tem sido usada como um sistema modelo para o estudo do mecanismo regulatório do metabolismo secundário em plantas superiores. Através deste modelo é possível analisar a relação entre a produção de metabólito secundário e o crescimento em termos de número e morfologia celular (Sakuta e Komamine, 1987). A Tabela 1 mostra a produção de metabólitos secundários através da cultura de células de planta em algumas espécies (Misawa, 1994).

Relativamente pouca atenção tem sido enfocada sobre o relacionamento entre crescimento celular e a acumulação de metabólitos secundários. Para entender o mecanismo regulador do metabolismo secundário, é essencial o estudo cinético do crescimento celular e a formação de metabólitos secundários.

Dois tipos da acumulação de metabólito secundário em relação ao crescimento tem sido observados: (1) acumulação durante a fase estacionária com um relacionamento inverso entre crescimento e acumulação, como visto na acumulação de antocianina em cultura de *Daucus carota* (Noé, Langebartels e Seitz, 1980) e de alcalóides em várias espécies de solanaceas (Lindsey e Yeoman, 1983). A acumulação do maior número de produtos secundários alcança um

máximo durante a fase estacionária da cultura de células, por exemplo, berberine em *Thalictrum minus* (Nakagawa, Fukui e Tabata, 1986) e fenólicos na cultura de *Acer pseudoplatanus* (Phillips e Henshaw, 1977), (2) acumulação durante a fase logarítmica tal como acumulação de betacianina em *Phytolacca americana*, cuja acumulação está associada com a divisão celular (Sakuta, Takagi e Komamine, 1986).

TABELA 1. Metabólitos secundários produzidos em altos níveis por cultura de células de planta.

Composto	Espécies de Plantas	Produtividade (% peso seco)		Tipo de Cultura
		Cultura	Planta	
Ácido rosmarínico	<i>Coleus blumeli</i>	15	3	s
Ajmalicina	<i>Catharanthus roseus</i>	1	0,3	s
Antraquinona	<i>Morinda citrifolia</i>	18	0,3	s
Antraquinona	<i>Galium verum</i>	5,4	1,2	s
Antraquinona	<i>Galium aparine</i>	3,8	0,2	s
Benzilisoquinolina	<i>Coptis japonica</i>	11	5-10	s
Berberina	<i>Thalictrum minor</i>	10	0,01	s
Berberina	<i>Coptis japonica</i>	10	2-4	s
Bisoclaurina	<i>Stephania cepharantha</i>	2,3	0,8	s
Diosgenina	<i>Dioscorea deltoides</i>	2	2	s
Ginsenoside	<i>Panax ginseng</i>	27	4,5	c
Nicotina	<i>Nicotiana tabacum</i>	3,4	2	c
Shikonina	<i>Lithospermum erythorhizon</i>	20	1,5	s
Tripdiolide	<i>Tripterygium wilfordii</i>	0,05	0,001	s
Ubiquinona	<i>Nicotiana tabacum</i>	0,036	0,003	s

\*s- suspensão de células c- calos

A cultura em suspensão de células de plantas, ultimamente tem sido usada mais frequentemente do que a cultura de calos para estudos metabólicos por razões de homogeneidade e taxa superior de crescimento. Peso fresco, peso seco, volume celular sedimentado e número de células são largamente usados como parâmetros de crescimento para a cultura em suspensão de células de plantas. O crescimento da cultura em suspensão exibe um crescimento sigmoidal em três

fases: a fase lag, a fase exponencial ou logarítmica e a fase estacionária. O modelo de crescimento e o comprimento de cada fase depende em grande parte do intervalo da subcultura e do tamanho do inóculo. Quando as células na fase estacionária são subcultivadas, a cultura passa através das fases lag e logarítmica e entra então uma fase estacionária. Quando as células na fase logarítmica são transferidas para um meio fresco, elas imediatamente iniciam o crescimento exponencial evitando a fase lag (Nash e Davies, 1972 e Sakuta e Komamine, 1987).

Segundo Shimizu et al. (1977) a fase lag pode ser considerada como uma fase produtora de energia e a fase logarítmica como a fase biossintética. Em cultura de suspensão de células de *Pogostemon cablin* Benth. (Patchouli) o peso fresco e seco apresentaram uma curva normal de crescimento sigmóide. A fase lag foi pouco proeminente, enquanto a fase logarítmica apresentou um crescimento exponencial por um período de 16 dias, seguido por um declínio normal na fase estacionária (Jones, Barrett e Gopal, 1973).

### 2.3 Reguladores de crescimento × metabólitos secundários

O metabolismo secundário em plantas superiores é fortemente influenciado por fatores ambientais. Em cultura de suspensão de células, reguladores de crescimento de plantas afetam a produção de metabólitos secundários bem como o crescimento. Diferentes tipos de reguladores de crescimento como auxina, citocinina, giberelina e ácido abscísico, apresentam efeitos diferentes sobre o crescimento e o metabolismo secundário. Vários efeitos de auxinas sobre o metabolismo secundário tem sido relatado; em muitos casos, auxinas sintética, especialmente o 2,4-D inibiu a síntese de nicotina na cultura de *Nicotiana tabacum* (Furuya, Kojima e Syono, 1971 e Tabata et al., 1971), derivados de shikonina em cultura de *Lithospermum erythrorhizon* (Tabata et al., 1974) e compostos fenólicos em cultura de *Acer pseudoplatanus* (Phillips e Henshaw,

1977). Em contraste, a estimulação da síntese de carotenóide na cultura de *Daucus carota* por 2,4-D foi relatado por Mok, Gabelman e Skoog (1976). A produção de berberine em cultura em suspensão de *Thalictrum minus* aumentou com 2,4-D e ANA (Nakagawa et al., 1984).

As citocininas tem efeitos diferentes dependendo do tipo de metabólito e da espécie interessada. Por exemplo, Cinetina estimulou o acúmulo de L-dopa em cultura de calos de *Stizolobium hassjoo* (Obata-Sasamoto e Komamine, 1983). A produção de berberine em cultura em suspensão de *Thalictrum minus* foi promovida por 6-benziladenina (BA) e cinetina. Em contraste, a cinetina inibiu a síntese de carotenóides em cultura de células de cenoura (Mok, Gabelman e Skoog, 1976). A giberelina inibiu a produção de shikonina em cultura de calos de *Lithospermum* mas não afetou o crescimento (Yoshikawa, Fukui e Tabata, 1986).

Os efeitos dos reguladores de crescimento de plantas sobre a produção de metabólitos secundários são complexos e um pouco contraditórios. Estes efeitos contraditórios são difíceis de se explicar, mas os níveis endógenos de reguladores de crescimento em plantas nas células cultivadas devem ser considerados. Grandes agregados de células contém níveis mais elevados de citocininas endógenas do que pequenos agregados (Kinnersley e Dougall, 1980 e Ozeki e Komamine, 1981).

Cultura de calos e suspensão de células tem sido usado para determinar a quantidade de rotenoide em *Derris elliptica* e *Tephrosia vogelli* a partir do meio MS líquido contendo diferentes combinações de 2,4-D e cinetina conforme citações de Kudakasseril e Staba (1988).

Sauerwein, Yoshimatsu e Shimomura, 1992 citam vários exemplos sobre a influência de reguladores de crescimento na produção de compostos secundários. A cultura de células de *Fossombronia pussilla* é conhecida por produzir uma grande variedade de terpenos, alguns de interesse biológico devido as suas atividades inseticida e inibidora de tumor. A adição de

vitamina B<sub>12</sub> no meio de cultura líquido B5, estimulou o crescimento e a produção de terpenos após 32 dias de cultivo. Em cultura de suspensão de células transformadas de *Cinchona ledgeriana* foram liberadas 75% dos alcalóides quinina e quinidina no meio de cultura adicionado de 2,4-D e BA. Na cultura de *Cephaelis ipecacuanha*, uma Rubiáceae da Amazônia, calos induzido de hipocótilo sobre o meio MS contendo 2,4-D e ANA acumularam 0,35 e 0,93% em relação ao peso seco de emetina e cefalina, respectivamente, após 3 a 4 semanas de cultura.

#### 2.4. Propagação vegetativa e nutrição

Na propagação vegetativa, as plantas originadas são geneticamente iguais à planta-mãe e o ciclo do plantio à colheita mais rápido. Uma grande quantidade de plantas lenhosas e herbáceas são propagadas por esse método. Essa técnica tradicional tem sido empregada principalmente, pela pesquisa moderna hortícola e frutífera. (George, 1993).

Dentre os diferentes métodos de propagação vegetativa, destaca-se a estaquia, que utiliza relativamente uma pequena parte da planta-mãe. Esse material é submetido ao enraizamento para, posteriormente, ser plantado em recipientes ou diretamente no local definitivo (Martins et al., 1995).

A estaquia foi utilizada com sucesso por Lameira et al. (1993) em raízes de ipeca (*Cephaelis ipecacuanha*), uma planta medicinal perene, herbácea que cresce nas regiões húmidas brasileiras.

A nutrição mineral é um dos fatores de "stress" que pode interferir na composição química de uma planta. A deficiência e, ou, o excesso de nutrientes podem promover maior ou menor produção de fármacos na planta. O nitrogênio, por exemplo, tem ação bem controversa: quando em déficit, provoca em papoula (*Papaver somniferum*) e beladona (*Atropa beladonna*)

aumento da concentração dos alcalóides, enquanto na lobélia (*Lobelia inflata*) há redução. (Martins et al., 1995)

O fósforo contribui para o aumento da concentração de alcalóides na beladona e de substâncias aromáticas no coentro (*Coriandrum sativum*) e no funcho (*Foeniculum vulgare*). O seu déficit no solo reduz a concentração de cumarinas em chambá (*Justicia pectoralis var stenophylla*), mas o efeito mais negativo é a redução da produção de biomassa, podendo reduzir a produção total de princípio ativo (Barros, Andrade e Silva, 1992 e Martins et al., 1995).

## 2.5 Flavonóides

Os flavonóides tem uma importância potencial na medicina como inibidor de AMPc-fosfodiesterase, e na agricultura, desde que os isoflavonóides e rotenóides sejam considerados como fitoalexinas (Botta e Manache, 1993)

Como derivados das vias biossintéticas do acetato e chiquimato (Figura 3), os flavonóides compreendem uma série de compostos secundários que ocorrem exclusivamente em plantas superiores, sendo responsáveis, na planta, pela coloração das flores. Também denominados pigmentos, os flavonóides possuem unidade básica de 15 carbonos, que inclui dois anéis aromáticos hidroxilados, ligados entre si por um fragmento de 3 carbonos. Na figura 4 estão ilustradas as principais classes de flavonóides (Mabry, Markham e Thomas, 1970).

Inúmeros desses compostos possuem atividades farmacológicas, destacando-se a artemetina, apigenina, taxifolina, morina, naringerina, genisteína e epicatequina. A artemetina é utilizada como antiinflamatório e a naringerina reúne atividades indutora da formação de hemoglobina, antiespasmódica e anti-hepatotóxica (Di Stasi, 1996).

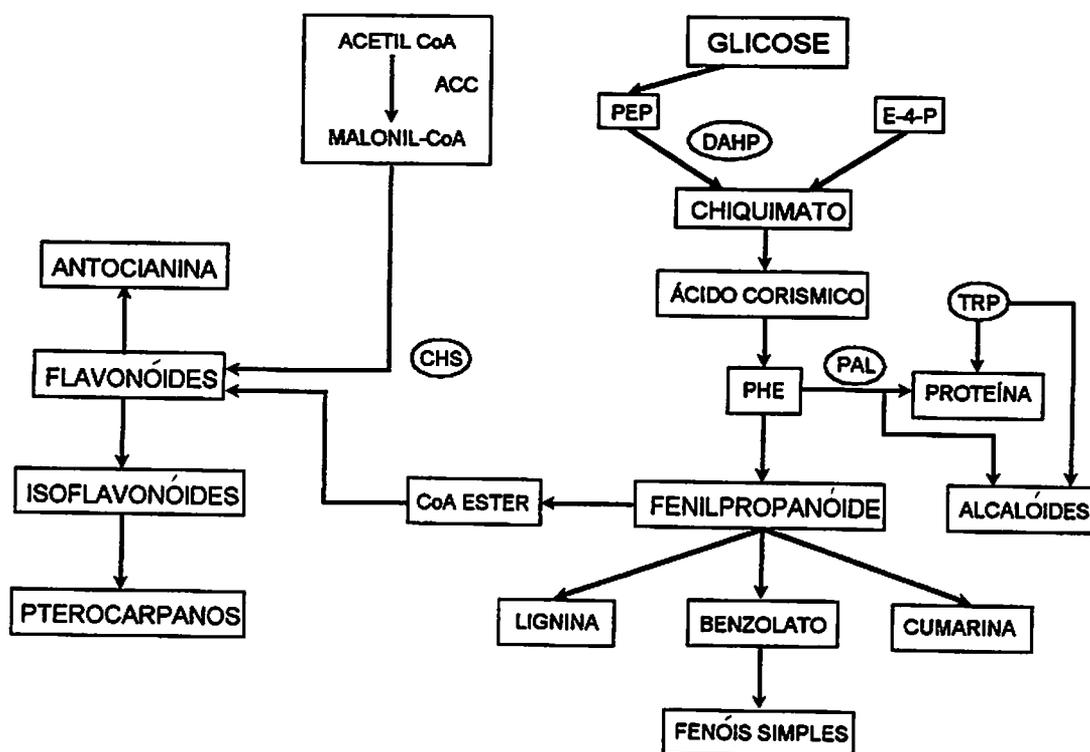


FIGURA 3. Rota biossintética simplificada dos flavonóides (Mabry, Markham e Thomas, 1970).

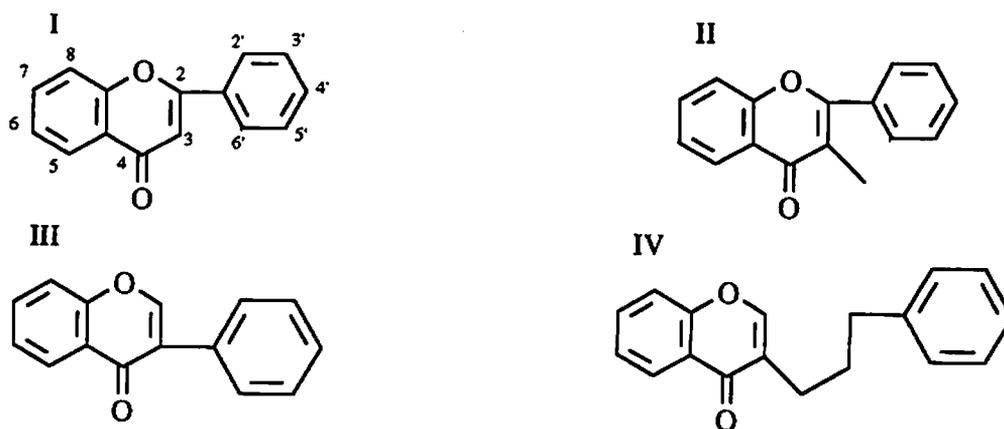


FIGURA 4. Estrutura molecular das principais classes de flavonóides. (I) Flavona, (II) Flavonol, (III) Isoflavona e (IV) Chalcona (Mabry, Markham e Thomas, 1970).

Os flavonóides concentram-se mais na parte aérea das plantas, ocorrendo em menor proporção nas raízes e nos rizomas. São os metabólitos secundários mais difundidos no reino vegetal, encontrando-se em maior quantidade nas famílias Leguminosae e Compositae. A grande vantagem dos flavonóides é a sua baixíssima toxicidade. São essenciais para a completa absorção de vitamina C, ocorrendo normalmente onde quer que haja esta vitamina (Martins et al., 1995).

## 2.6 Análise e determinação fitoquímica

Na análise dos extratos obtidos de plantas medicinais várias técnicas tem sido utilizadas. A separação e a purificação dos constituintes químicos são efetuadas utilizando uma ou mais técnicas cromatográficas. A cromatografia é a técnica na qual dois ou mais compostos em misturas são separados fisicamente pela suas distribuições entre duas fases, uma estacionária, que pode ser um sólido ou um líquido suportado sobre um sólido e uma fase móvel, um gás ou um líquido, que flui continuamente pela fase estacionária (Harbone, 1984).

Dentre as diversas técnicas cromatográficas, a cromatografia de camada delgada e a cromatografia líquida em coluna por gravidade ou adsorção são processos de separação dos componentes de uma mistura, por migração diferencial, no qual a propriedade do soluto responsável pela competição é a polaridade (Matos, 1988 e Ferri, 1996).

A cromatografia líquida de alta performance (HPLC), é um dos métodos cromatográficos que permite análises direta dos extratos aquosos com um limite de detecção de 1 a 10 ng (Karlsen, 1991 e Vervoot, Maris e Hindriks, 1992).

Na determinação da estrutura de novos compostos são utilizados vários métodos de espectrometria, como Infravermelho, Espectrometria de Massa, Ressonância Magnética Nuclear de próton e carbono (RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ ). Os grupos funcionais da molécula podem ser

obtidos através dos espectros de infravermelho. Normalmente, por meio da espectrometria de massa pode-se obter a fórmula molecular, assim como o padrão de fragmentação da molécula. A associação dessas informações com os dados obtidos a partir da determinação dos ambientes que circulam os núcleos de hidrogênio e carbono da molécula, obtidos respectivamente, pela RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ , podem ser suficientes para elucidar uma determinada estrutura. Muitas vezes, a determinação do ponto de fusão da molécula oferece maiores dados para se chegar à estrutura (Ferri, 1996).

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABO-EL-NIL, M.M. Organogenesis and embryogenesis in callus cultures of garlic (*Allium sativum* L.). **Plant Science Letter**, Elsevier, v.9, n.1, p.259-264, 1977.
- BARROS, R.F.M.; ANDRADE, L.H.C.; SILVA, N.H. Efeito da radiação solar e disponibilidade de nutrientes sobre a produção de cumarinas em *Justicia pectoralis* Jacq. var. *Stenophylla* Leonard. In: SIMPOSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 12, 1992, Curitiba. **Anais...Curitiba: UFPR, 1992. p.220.**
- BHOJWANI, S.S. In vitro propagation of garlic by shoot proliferation. **Science Horticulture**, Amsterdam, v.13, p.47-52, 1980.
- BOTTA, B.; MANACHE, G.D. *Cassia didymobotrya* (Wild Senna): in vitro culture, biotransformation and the production of secondary metabolites. In: BAJAJ, Y.P.S. (ed). **Biotechnology in agriculture and forestry 21: medicinal and aromatic plants IV**. Berlin: Springer-Verlag, 1993. p.64-86.
- DASTOOR, M.N.; SHUBERT, W.W.; PETERSON, G.R. Preliminary results of in vitro propagation of guayule. **Journal Agriculture Food Chemistry**, Washington, v.29, n.3, p.686-688, May/june. 1981.
- DI STASI, L.C. Química de produtos naturais: principais constituintes ativos. In: DI STASI, L.C.(ed), **Plantas medicinais: arte e ciência**. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: UNESP, 1996. Cap.9, p.109-127.
- FERRI, P.H. Química de produtos naturais métodos gerais. In: DI STASSI, L.C. **Plantas medicinais: arte e ciência**. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: UNESP, 1996. cap.10. p.129-156.
- FURUYA, T.; KOJIMA, H.; SYONO, K. Regulation of nicotine biosynthesis by auxins in tobacco callus tissues. **Phytochemistry**, Osford, v.10, n.5, p.1529-1532, May. 1971.
- GEORGE, E.F. Plant propagation and micropropagation. In: GEORGE, E.F. (ed.). **Plant propagation by tissue culture: part 1 the technology**. 2.ed. Somerset: Exegetics, 1993. Cap.2. p.37-66.
- GUIA RURAL: ervas e temperos. São Paulo: Abril, 1991. 170p. (Ervas e Temperos, edição especial).

- HARBORNE, J.B. Methods of plant analysis. In: HARBORNE, J.B. (ed.). **Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis**. Hong Kong: Chapman and Hall, 1984. Cap.1, p.1-36.
- JONES, L.H.; BARRETT, J.N.; GOPAL, P.P.S. Growth and nutrition of a suspension culture of *Pogostemon cablin* Benth. (Patchouli). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.24, n.78, p.145-148, Feb. 1973.
- KARLSEN, J. Quality control and instrumental analysis of plant extracts. In: WIJESEKERA, R.O.B (ed.), **The medicinal plant industry** Boca Ranton: CRC Press, 1991. Cap.8, p.99-105.
- KINNERSLEY, A.M.; DOUGALL, D.K. Increase in anthocyanin yield from wild-carrot cell cultures by a selection system based on cell-aggregate size. **Planta**, New York, v.149, n.2, p.200-204, July. 1980.
- KUDAKASSERIL, G.J; STABA, E.J. Insecticidal phytochemicals. In: CONSTABEL, F.; VASIL, I.K (eds.), **Cell culture and somatic cell genetics of plants: phytochemicals in plant cell cultures**. San Diego: Academic Press, 1988. v.5, Cap.31, p.537-552.
- LAKSHMI SITA, G.; BAMMI, R.K.; RANDHAWA, G.S. Clonal propagation of *Dioscorea floribunda* by tissue culture. **Journal Horticulture Science**, Ashford, v.51, p.551-554, 1976.
- LAMEIRA, O.A.; GOMES, M.R. de O.; NETO, O.G. da R.; SANTIAGO, E.J.A de; RODRIGUES, I.A. Efeito de auxinas sobre o enraizamento de estacas de raiz de *Cephaelis ipecacuanha*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, São Carlos, v.5, n.1, p. 81, 1993.
- LAMEIRA, O.A.; COSTA, M.P.da.; PINTO, J.E.B.P. The efficiency of shoot and plantlet formation of *Cephaelis ipecacuanha* after three subcultures in vitro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.24, n.3, p.523-526, 1994.
- LEVY, L.W. A large scale application of tissue culture the mass propagation of pyrethrum clones in Ecuador. **Environmental Experimental Botany**, Elmsford, v.21, p.389-395, 1981.
- LINDSEY, K.; YEOMAN, M.M. The relationship between growth rate, differentiation and alkaloid accumulation in cell cultures. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.34, n.145, p.1055-1065, Aug. 1983.
- MABRY, T.J.; MARKHAM, K.R.; THOMAS, M.B. **The systematic identification of flavonoids**. Berlin: Springer-Verlag, 1970. 354p.
- MANTEL, S.H.; HAQUE, S.Q.; WHITEHALL, A.P. Clonal multiplication of *Dioscorea alata* and *D. rotundata* Poiryams by tissue culture. **Journal Horticulture Science**, Ashford, v.53, p.95-98, 1978.
- MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M. de.; CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E. **Plantas medicinais**. Viçosa : UFV, 1995. 220p.

- MASCARENHAS, A.F.; HENDRE, R.R.; NADGIR, A.L.; GHUGALE, D.D; GODBOLE, D.A.; PRABHU, R.A.; JAGANNATHAN, V. Development of plantlets from cultured tissue of *Dioscorea deltoidea* Wall. **Indian Journal Experimental Botany**, New Delhi, v.14, p.604-606, 1976.
- MATOS, F.J.A. **O 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.
- MISAWA, M. Introduction. In: MISAWA, M. (ed.). **Plant tissue culture: an alternative for production of useful metabolites**. Toronto: FAO, 1994. cap.1, p.1-3.
- MOK, M.C.; GABELMAN, W.H.; SKOOG, F. Carotenoid synthesis in tissue cultures of *Daucus carota* L. **Journal American Society Horticulture Science**, Alexandria, v.101, n.4, p.442-449, July. 1976.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- NAKAGAWA, K.; FUKUI, H.; TABATA, M. Hormonal regulation of berberine production in cell suspension cultures of *Thalictrum minus*. **Plant Cell Reports**, New York, v.5, p.69-71, 1986.
- NAKAGAWA, K.; KONAGAI, A.; FUKUI, H.; TABATA, M. Release and crystallization of berberine in the liquid medium of *Thalictrum minus* cell suspension cultures. **Plant Cell Reports**, New York, v.3, p.254-257, 1984.
- NASH, T.D.; DAVIES, M.E. Some aspects of growth and metabolism of Paul Scarlet rose cell suspensiones. **Journal Experimental of Botany**, Oxford, v.23, p.75-91, 1972.
- NOÉ, W.; LANGEBARTELS, C.; SEITZ, H.U. Anthocyanin accumulation and PAL activity in a suspension culture of *Daucus carota* L. **Planta**, New York, v.149, n.3, p.283-287, Aug. 1980.
- OBATA-SASAMOTO, H.; KOMAMINE, A. Effect of culture conditions on dopa accumulation in a callus culture of *Stizolobium hassjoo*. **Planta Medica**, Stuttgart, v.49, p.120-123, 1983.
- OZEKI, Y.; KOMAMINE, A. Induction of anthocianin syntesis in relation to embryogenesis in a carrot suspension culture: Correlation of metabolic differentiation with morphological differentiation. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.53, n.3, p.570-577, 1981.
- PHILLIPS, R.; HENSHAW, G.G. The regulation of synthesis of phenolics in stationary phase cell cultures of *Acer pseudoplatanus* L. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.28, n.105, p.785-794, Aug. 1977.
- 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, 1987. v.4, Cap.5, p.97-114.

- SAKUTA, M.; TAKAGI, T.; KOMAMINE, A. Growth related accumulation of betacyanin in suspension cultures of *Phytolacca americana* L. **Journal Plant Physiology**, Stuttgart, v.125, p.337-343, 1986.
- SAUERWEIN, M.; YOSHIMATSU, K.; SHIMOMURA, K. Further approaches in the production of secondary metabolites by plant tissue cultures. **Plant Tissue Culture Letters**, v.9, n.1, p.1-9, 1992.
- SERTIE, J.A.A.; BASILE, A.C.; PANIZZA, S.; MATIDA, A.K.; ZELNIK, R. Anti-inflammatory activity and sub-acute toxicity of artemetin. **Planta Medica**, Stuttgart, v.56, n.11, p.36-40, 1990.
- SHIMIZU, T.; CLITTON, A.; KOMAMINE, A.; FOWLER, M.W. Changes in metabolite levels during growth of *Acer pseudoplatanus* (sycamore) cells in batch suspension culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.40, n.1, p. 125-129, 1977.
- SILVA JÚNIOR, A.A., VIZZOTO, V.J., GIORGI, E., MACEDO, S.G.; MARQUES, L.F. **Plantas medicinais caracterização e cultivo**. Florianópolis: EPAGRI, 1995. 71p. (Boletim Técnico, 68).
- TABATA, M.; MIZUKAMI, H.; HIRAOKA, N.; KONOSHIMA, M. Pigment formation in callus cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. **Phytochemistry**, Oxford, v.13, n.4, p.927-932, Apr. 1974.
- TABATA, M.; YAMAMOTO, H.; HIRAOKA, N.; MATSUMOTO, Y.; KONOSHIMA, M. Regulation of nicotine production in tobacco tissue culture by plant growth regulators. **Phytochemistry**, Oxford, v.10, n.3, p.723-729, Mar. 1971.
- TETENYI, P. Biological preconditions for cultivation and processing of medicinal plants. In: WJESKERA, R.O.B.(ed.), **The medicinal plant industry**. Boca Ranton: CRC Press, 1991. Cap.3, p.33-41.
- VERVOORT, R.J.M.; MARIS, F.A.; HINDRIKS, H. Comparison of high-performance liquid chromatographic methods for the analysis of basic drugs. **Journal of Chromatographic**, Amsterdam, v.623, p.207-220, 1992.
- WAMBUGU, F.M.; RANGAN, T.S. In vitro clonal multiplication of pyrethrum (*Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis.) by micropropagation. **Plant Science Letter**, Elsevier, v.22, n.3, p.219-226, Sept. 1981.
- 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, p.1-8, May. 1983.
- WJESKERA, R.O.B. Plant-derived medicines and their role in global health. In: WJESKERA, R.O.B.(ed.), **The medicinal plant industry**. Boca Ranton: CRC Press, 1991. Cap.1 p.1-18.

- WINK, M. Physiology of the accumulation of secondary metabolites with special reference to alkaloids. 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.2, p.17-42.
- YOSHIKAWA, N.; FUKUI, H.; TABATA, M. Effect of gibberellin A<sub>3</sub> on shikonin production in *Lithospermum* callus cultures. **Phytochemistry**, Oxford, v.25, n.3, p.621-622, Mar. 1986.
- YOSHIMATSU, K.; SHIMOMURA, K. Efficient shoot formation in the regenerates of *Cephaelis ipecacuanha* A. Richard. **Plant Cell Reports**, New York, v.9, p.567-570, 1991.

## 4 CAPÍTULO I.

### MICROPROPAGAÇÃO DE *Cordia verbenacea* L.

#### RESUMO

A propagação clonal através da cultura de tecidos é uma técnica altamente desejável para regenerar plantas com características desejáveis. Não existem relatos disponíveis de trabalhos na literatura sobre a micropropagação de *Cordia verbenacea*. Neste trabalho, técnicas in vitro são aplicadas com o objetivo de multiplicar esta importante planta medicinal. Segmentos apical e nodal de 30 a 40 mm de comprimento provenientes de mudas de erva-baleeira cultivadas em casa de vegetação, foram lavados e desinfestados em solução comercial contendo 0,6% de hipoclorito de sódio mais duas gotas de detergente durante 10 minutos, sendo 5 minutos sob agitação. Após a lavagem em água esterilizada os segmentos com 5 mm de comprimento foram excisados e inoculados sob diversas condições. Em meio solidificado com agar a 0,6% de Murashige e Skoog, (1962) - MS, suplementado com 0,1; 1,0; 5,0 e 10,0  $\mu\text{M}$  de cinetina e 0,01  $\mu\text{M}$  de ácido naftaleno acético (ANA). Em meio solidificado com agar a 0,8% e líquido MS, suplementados com 150  $\text{mg.L}^{-1}$  de floroglucinol, 10  $\text{mg.L}^{-1}$  de catecol, 20  $\text{mg.L}^{-1}$  de ácido clorogênico, e 0,3% de carvão ativado e nos tratamentos formados pela combinação de 8 e 10  $\text{g.L}^{-1}$  de agar com 15, 30 e 45  $\text{g.L}^{-1}$  de sacarose cultivados no meio MS, suplementados com 1  $\mu\text{M}$  de cinetina e 0,01  $\mu\text{M}$  de ANA. O número e comprimento de propágulos aumentou linearmente com

o aumento nos níveis de cinetina até 5  $\mu\text{M}$ , diminuindo com maior concentração. O cultivo de segmento apical na concentração de 5  $\mu\text{M}$  de cinetina e 0,1 $\mu\text{M}$  de ANA foi o mais eficiente produzindo em média 2,7 propágulos por explante com 12,65 mm. Os explantes enraizaram no meio MS sem regulador de crescimento. No meio de cultivo líquido contendo ácido clorogênico, foram obtidos os maiores valores para número e comprimento de propágulos, respectivamente, 3 propágulos por explante com 13 mm. O tratamento menos eficiente em meio líquido foi o floriglucinol e no meio sólido, o carvão ativado. No meio de cultura MS sem regulador de crescimento 70% dos propágulos provenientes do meio contendo ácido clorogênico enraizaram. Na presença de 10  $\text{g.L}^{-1}$  de agar, o tratamento contendo 30  $\text{g.L}^{-1}$  de sacarose foi o mais eficiente, produzindo em média 2,4 propágulos por explante com 9,05 mm de comprimento.

### ABSTRACT

Clonally propagating by tissue culture is highly desirable to regenerate plants with similar characteristics. There are no previous reports on micropropagation of *Cordia verbenacea*. In this study, *in vitro* techniques are applied to propagate of this important Brazilian medicinal plant. Shoot tip and nodal explants with 30 to 40 mm, were excised from greenhouse plants and surface sterilized with 0.6% sodium hypochlorite for 10 minutes. Explants were inoculated with 5 mm on several condition: on solid (0.6%) agar of Murashige and Skoog (1962) (MS), supplemented with 0.1, 1.0, 5.0 and 10.0  $\mu\text{M}$  kinetin (Kin) and 0.01  $\mu\text{M}$  naphthalene acetic acid (NAA); MS solid (0.8%) agar and liquid media supplemented with 150  $\text{mg.L}^{-1}$  phloroglucinol, 10  $\text{mg.L}^{-1}$  catechol, 20  $\text{mg.L}^{-1}$  chlorogenic acid and 0.3% activated charcoal. Shoot tip produced the most and the longest explants. The number and length of propagules increased linearly with Kin

levels up to 5  $\mu\text{M}$ , decreasing at higher concentration. The treatment containing nodal segment cultured in 5  $\mu\text{M}$  Kin and 0.01  $\mu\text{M}$  NAA yielded 2.7 propagules per explant with 12.65 mm. Explants rooted in MS medium without growth regulators. Micropropagated plants survived when transferred to greenhouse conditions. Liquid medium supplemented with chlorogenic acid induced a mean of 3 propagules per segment with 13mm length. The treatments containing phloroglucinol in liquid medium and activated charcoal in solid medium were less efficient. In MS medium without growth regulators, 70% of propagules rooted from culture medium containing chlorogenic acid. The treatment containing 30  $\text{g.L}^{-1}$  sucrose was more efficient in the presence of 10  $\text{g.L}^{-1}$  agar, producing 2.4 propagules per explant with 9.05mm length.

#### 4.1 INTRODUÇÃO

*Cordia verbenacea*, uma importante planta medicinal, tem sido propagada por sementes. Entretanto, por este método pode sofrer variações no teor do princípio ativo em função das diferenças existentes entre os indivíduos dentro da espécie, variação de solo, clima e época do ano (Guia Rural, 1991). A propagação clonal por cultura de tecidos é altamente desejável para regenerar população suficiente de plantas com características similares, reduzindo ou eliminando a possibilidade de disseminar patógenos que ocorrem com outros métodos de propagação (Bajaj, Furmanova, Olszowska, 1988).

A regeneração de plantas medicinais através da micropropagação tem sido obtida com sucesso em várias espécies. Mantell, Haque e Whitehall (1978) relatam a regeneração de plantas e a multiplicação clonal in vitro de *Dioscorea alata* e *D. rotundata* utilizando segmentos nodais por um período de 3 a 5 semanas de cultivo. Lameira, Costa e Pinto (1994) desenvolveram

um protocolo para multiplicação clonal de ipeca (*Cephaelis ipecacuanha*) a partir de segmento internodal e obtiveram até nove brotos por segmento na cultura inicial.

Os compostos fenólicos e seus glicosídeos são comuns nas plantas possuindo um papel metabólico variável. Existem vários trabalhos relatando o efeito dos compostos fenólicos, do carvão ativado e do meio físico sobre o crescimento de plantas em condições *in vitro*.

Jones (1976) relata que  $162 \text{ mg.L}^{-1}$  de floroglucinol aumentou a taxa de crescimento e a produção de brotos em macieira. A promoção do enraizamento foi obtida em *Prunus cerasifer* com  $20 \text{ mg.L}^{-1}$  de ácido clorogênico (Hammerschlag, 1982a) e em *Hedera helix* com  $5,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de catecol (Hackett, 1970).

O carvão ativado embora não seja um regulador de crescimento, tem sido utilizado com mais frequência em doses que variam de 0,1 a 0,5%, para melhorar ou regular o crescimento de plantas *in vitro* (George, 1993). Lameira, Costa e Pinto (1994) utilizaram 0,1% de carvão ativado para estimular o enraizamento em *Cephaelis ipecacuanha*.

O potencial osmótico do meio de cultivo é a soma dos potenciais impostos pelo agar, minerais e açúcar, embora este último seja reconhecidamente o mais influente. Isto é sustentado pelo fato da sacarose durante a autoclavagem, ser hidrolizada em frutose e glicose, compostos osmoticamente ativos. Um aumento da pressão osmótica provoca um aumento na atividade mitocondrial, sugerindo que para manter um alto potencial osmótico necessitaria de alta quantidade energética, que também é requerida para os processos de formação de brotos (Thorpe, 1982).

A osmolaridade do meio representa um papel de indução do enverdecimento e formação de brotos. Do e Cormier (1991), quando estudaram o efeito do potencial osmótico na acumulação de antocianina em suspensão de células de uva (*Vitis vinifera* L.), observaram que à

medida que aumentavam a concentração de sacarose e conseqüentemente no aumento do potencial osmótico do meio, aumentava a quantidade de antocianina no meio de cultura.

A concentração mais utilizada de sacarose tem sido  $30\text{g.L}^{-1}$ . Murashige e Skoog (1962), relatam que a atividade biológica de qualquer substância não somente varia com a dosagem, mas depende do meio no qual é colocada. Portanto, a concentração de sacarose é um fator importante para obter crescimento satisfatório, dependendo do meio e do explante.

A maioria dos meios de cultura são solidificados com agar, sendo o componente mais dispendioso no meio de cultura. Entretanto, limitada atenção tem sido direcionada para maximizar a proliferação de brotos a partir do estado físico do meio com a utilização de agar. A concentração e o tipo de agar são notavelmente conhecidos por influenciar o crescimento de plantas micropropagadas (Singha, 1982 e Ghasghaie, Brenckmann e Saugier, 1991). Diferentes marcas ou concentrações de agar podem afetar diferentemente a condutividade e afetar o teor de sais do meio de cultura (Bornman e Vogelmann, 1984 e Scherer, 1988).

Os métodos de propagação pelo processo assexuado em plantas medicinais relatados na literatura são insuficientes, além disso a taxa e o tempo de multiplicação deixam a desejar quando comparados com as técnicas de multiplicação *in vitro*.

Não existem relatos disponíveis de trabalhos na literatura sobre a propagação *in vitro* de erva-baleeira. O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um método de micropropagação para erva-baleeira através de técnicas *in vitro* utilizando segmentos apical e nodal como uma alternativa para o processo convencional de propagação.

## 4.2 Micropropagação de *Cordia verbenacea* L. através de segmento apical e nodal

### 4.2.1 Material e Métodos

Como fonte de explantes foram usadas mudas de erva-baleeira provenientes de estacas cultivadas em casa de vegetação no laboratório de Biotecnologia do Departamento de Agricultura da UFLA. Segmentos apical e nodal com 30 a 40 mm de comprimento foram desinfestados em solução comercial contendo 0,6% de hipoclorito de sódio e duas gotas de detergente comercial por 100ml de solução durante 10 minutos, sendo 5 minutos sob agitação. Após serem lavados quatro vezes em água esterilizada foram excisados e inoculados com 5mm de tamanho no meio basal de Murashige e Skoog (Murashige e Skoog, 1962)-MS, solidificado com 0,6% de agar e suplementado com 0,1; 1,0; 5,0 e 10,0  $\mu\text{M}$  de cinetina e todos os tratamentos complementados com 0,01  $\mu\text{M}$  de ácido naftaleno acético (ANA). O pH dos meios de cultura foram ajustados para  $5,7 \pm 0,1$  antes de serem autoclavados

Os explantes foram incubados a  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 4 semanas em um fotoperíodo de 16 horas luz sob  $25 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  de irradiância. Foram usados vinte explantes por tratamento e as médias analisadas pela regressão polinomial. A valiação foi realizada com 32 dias após o cultivo inicial.

### 4.2.2 Resultados e Discussão

Os resultados apresentados na Tabela 2 mostram que não houve uma interação significativa entre o tipo de explante usado e as concentrações de cinetina para número e

comprimento de propágulos. As diferenças somente ocorreram entre o tipo de explante e entre os níveis de cinetina, sendo altamente significativa para ambas as variáveis estudadas.

TABELA 2. Resumo do quadro de análise de variância do número e comprimento de propágulos de erva-baleeira.

Fonte de Variação	GL	Quadrados Médios	
		Número de propágulos	Comprimento (mm)
Explante	1	12,8000000**	348,6125000**
Cinetina	3	3,5208333**	177,8333333**
Explante × Cinetina	3	0,3916667 <sup>ns</sup>	16,0458333 <sup>ns</sup>
Resíduo	72	0,1715278	6,5319444
Total	79		
CV (%)		18,105	29,805

NS. não significativo

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste F.

Para os tipos de explante, os tratamentos contendo segmento apical foram mais eficientes que os tratamentos contendo segmento nodal para as duas variáveis avaliadas (Figura 5). Este resultado sugere que provavelmente, houve uma melhor relação entre os fitohormônios endógenos na região de crescimento apical do que na região de crescimento lateral.



FIGURA 5. Efeito de explante nodal (T1) e apical (T2) no desenvolvimento de propágulos de erva-baleeira.

Wysokinska (1993) obteve resultados semelhantes quando comparou a taxa de proliferação de brotos na micropropagação de *Penstemon serrulatus*, a partir de segmento apical e nodal. O autor relata que a taxa na formação de brotos a partir de segmento apical foi oito vezes superior comparada com a do segmento nodal. Entretanto, Barna e Wakhlu (1995), trabalhando com micropropagação de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) obtiveram resultados opostos, ou seja, a taxa de formação de brotos a partir de segmento nodal foi quatro vezes mais eficiente que a taxa a partir de segmento apical.

Entre as concentrações de cinetina, o número e comprimento de propágulos aumentou linearmente com o aumento nos níveis de cinetina até 5  $\mu\text{M}$ , diminuindo com a maior concentração e proporcionando uma curva de regressão quadrática, significativa ao nível de 1% (Figura 6). Em média, o maior número e comprimento de propágulos por segmento respectivamente, 2,7 e 12,65 mm, foram obtidos com a concentração de 5  $\mu\text{M}$  de cinetina e 0,1  $\mu\text{M}$  de ANA.

A presença de uma citocinina no meio de cultura é freqüentemente, benéfica para promover a proliferação de brotos axilares. Na relação citocinina : auxina é comum usar mais citocinina do que auxina, isto porque a necessidade de auxina para induzir a formação de brotos é menor (George, 1996). Neste trabalho o efeito benéfico da citocinina para número e altura de propágulos somente foi observado até a concentração de 5  $\mu\text{M}$ . A partir desse nível o efeito passou a ser inibitório para as duas variáveis avaliadas.

Barna e Wakhlu (1995), obtiveram resultados semelhantes na micropropagação de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.). Os autores observaram um crescimento linear no número de propágulos quando utilizaram de 0,1 a 1  $\mu\text{M}$  de BA. O número de propágulos diminuiu quando aumentaram o nível de BA para 10  $\mu\text{M}$ .

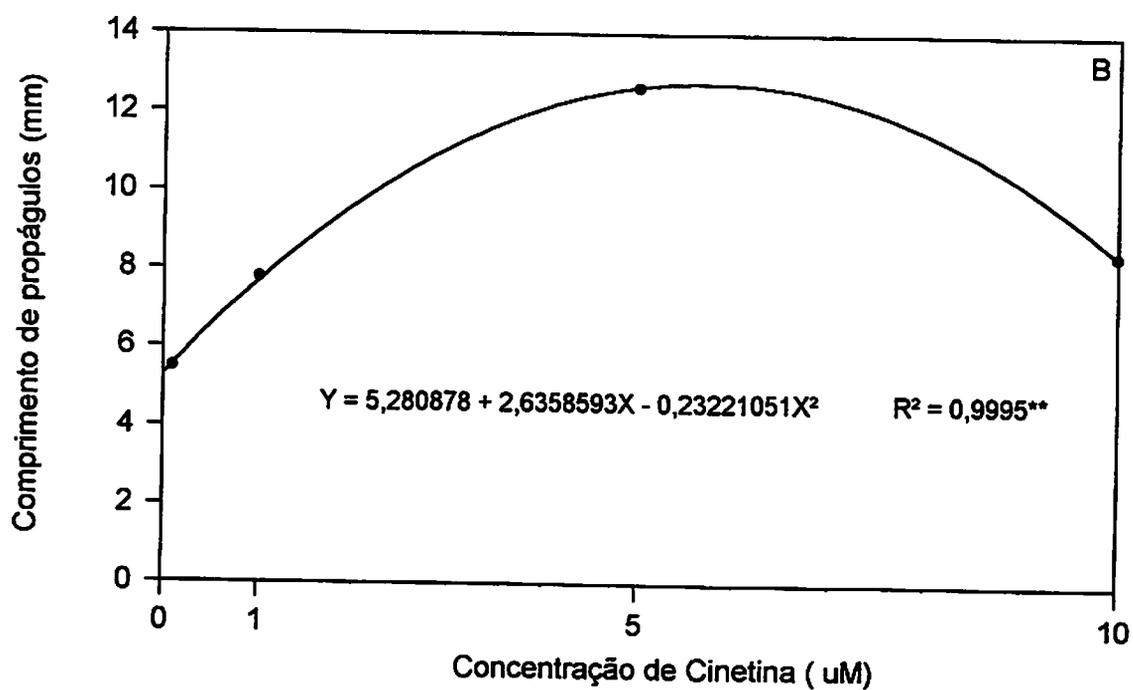
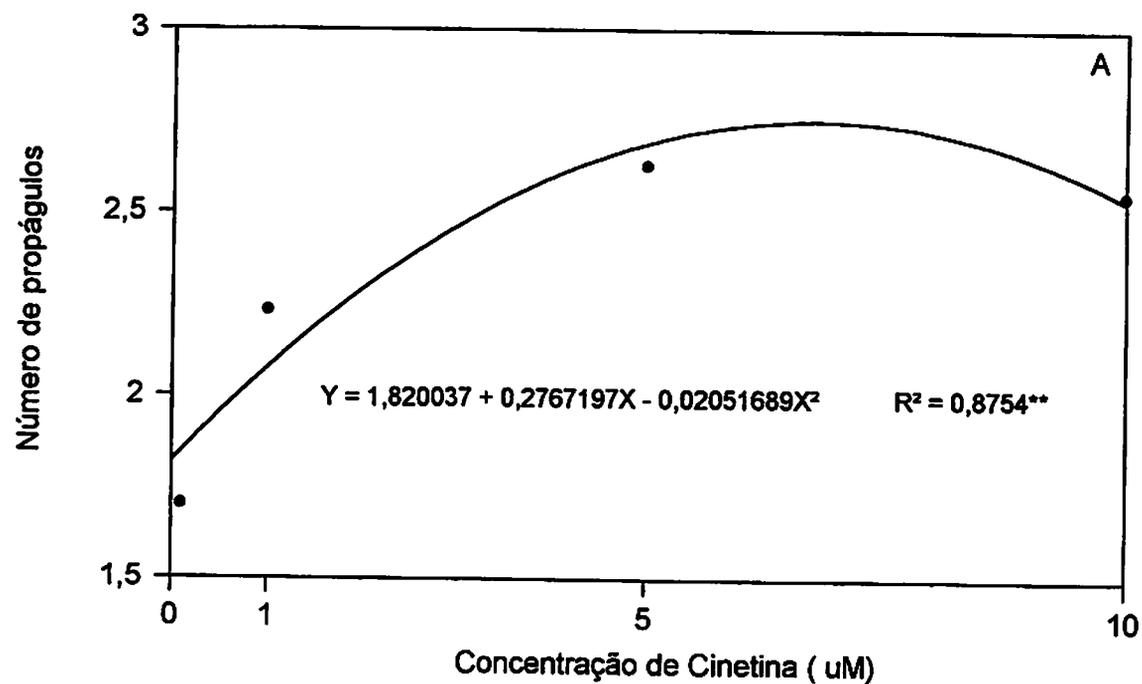


FIGURA 6. Efeito de cinetina sobre o número(A) e comprimento (B) de propágulos em erva-baleeira.

Os propágulos enraizaram no meio MS sem regulador de crescimento com 32 dias após a incubação inicial (Figura 7A). As plântulas foram transferidas para vasos e aclimatadas em casa de vegetação com 70% de sobrevivência após duas semanas do plantio (Figura 7B).

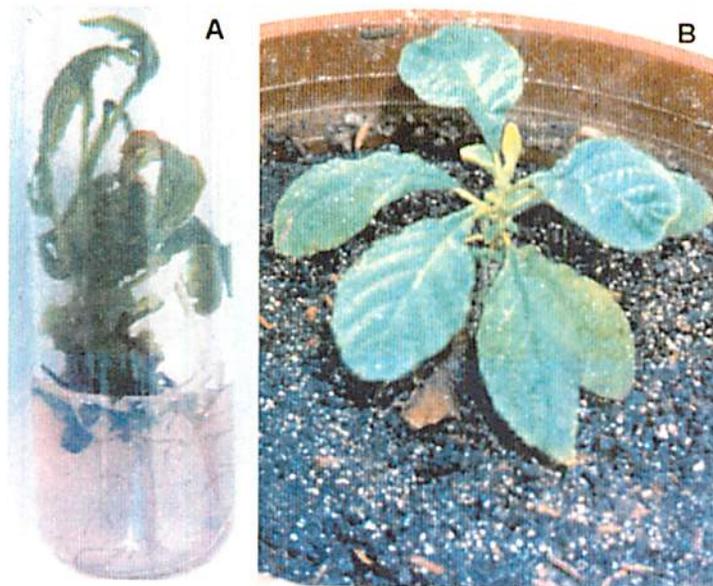


FIGURA 7. Enraizamento (A) e estabelecimento (B) de plântulas de erva-baleeira.

#### 4.2.3 Conclusões

Como fonte de explante para micropropagação, o segmento apical é o mais eficiente, proporcionando um maior número e comprimento de propágulos por explante.

A concentração de  $5\mu\text{M}$  de cinetina +  $0,01\mu\text{M}$  de ANA no meio de cultura MS, induz um maior número e comprimento de propágulos.

Os explantes são enraizados em meio de cultura MS sem regulador de crescimento e aclimatados com 70% de sobrevivência.

### **4.3 Efeito de compostos fenólicos, carvão ativado e do meio físico no desenvolvimento *in vitro* de segmento nodal de erva-baleeira**

#### **4.3.1 Material e Métodos**

Como fonte de explantes foi utilizado apenas segmentos nodal. Segmentos nodal com 30 a 40mm de comprimento foram desinfestados em solução comercial contendo 0,6% de hipoclorito de sódio e duas gotas de detergente comercial por 100ml de solução durante 10 minutos, sendo 5 minutos sob agitação. Após serem lavados quatro vezes em água esterilizada foram excisados e inoculados com 5 mm de comprimento no meio de cultivo, MS solidificado com 0,8% de agar ou líquido, suplementados com 150 mg.L<sup>-1</sup> de floroglucinol, 10 mg.L<sup>-1</sup> de catecol, 20 mg L<sup>-1</sup> de ácido clorogênico e 0,3 % de carvão ativado. O pH dos meios de cultura 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 branca fluorescente sob  $25 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  de irradiância.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com oito repetições com dois explantes por repetição e as médias comparadas pelo teste de Duncan em nível de 1% de probabilidade de erro. A avaliação do número e tamanho dos propágulos foi realizada com 30 dias após a incubação inicial e as raízes com 32 dias após a transferência para o meio MS sem regulador de crescimento.

#### **4.3.2 Resultados e Discussão**

O meio líquido de cultivo foi mais eficiente que o meio sólido nos dois parâmetros avaliados em todos os tratamentos, com exceção do tratamento contendo floroglucinol onde não

houve diferença significativa entre o estado físico do meio de cultura (Figuras 8 e 9). Entre os tratamentos, o meio de cultura contendo ácido clorogênico foi mais eficiente para número de propágulos nos dois estados físicos, e para o parâmetro comprimento de propágulos a eficiência somente foi demonstrada dentro do meio líquido (Figura 10), tendo sido obtido em média 3 propágulos por explante com 13 mm (Figuras 8 e 9). No meio sólido não houve diferença entre os tratamentos.

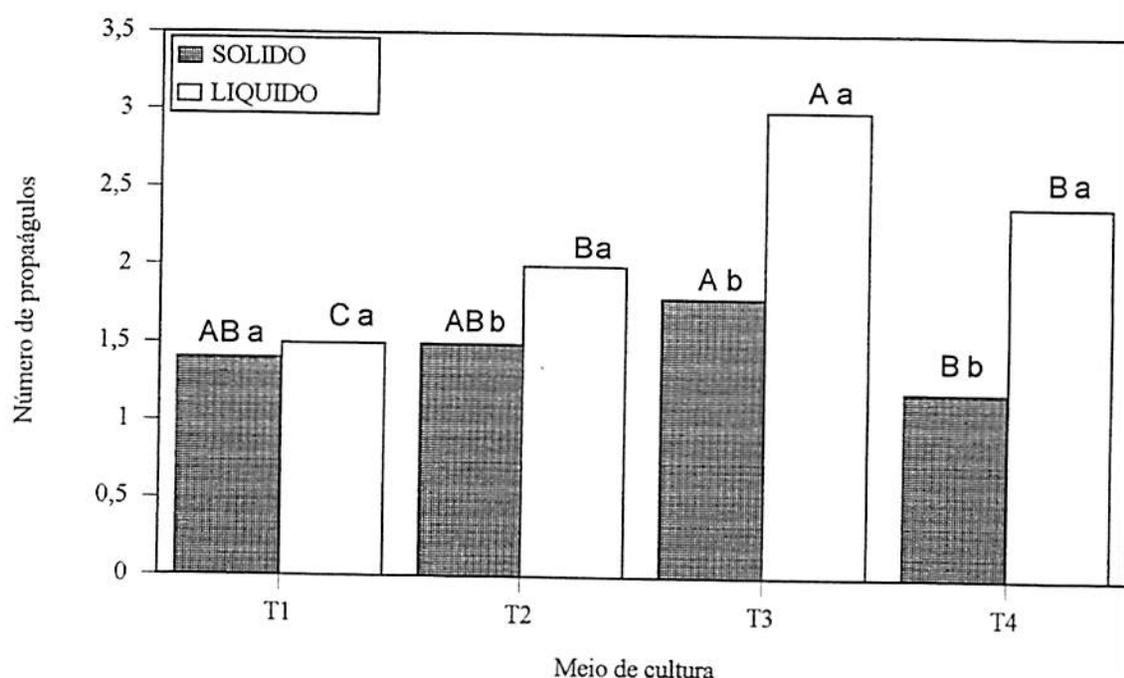


FIGURA 8. Efeito do meio de cultura MS suplementado com floroglucinol (T1), catecol (T2), ácido clorogênico (T3) e carvão ativado (T4) sobre o número de propágulos de erva-baleeira. As médias iguais seguidas de letras maiúsculas dentro de estado físico e de letras minúsculas dentro de cada tratamento, não diferem entre si pelo teste de Duncan ( $P < 0,01$ ).

A maior eficiência do meio líquido de cultivo possivelmente foi devido a um aumento na absorção de nutrientes do meio através de toda a superfície do explante. No meio

sólido o agar pode conter componentes tóxicos para alguns tecidos de plantas que inibirão o desenvolvimento dos explantes. Essa eficiência do meio líquido foi também obtida por Hammerschlag (1982b) quando investigou o efeito do estado físico do meio de cultura sobre o crescimento de brotos de pessegueiro *in vitro*.

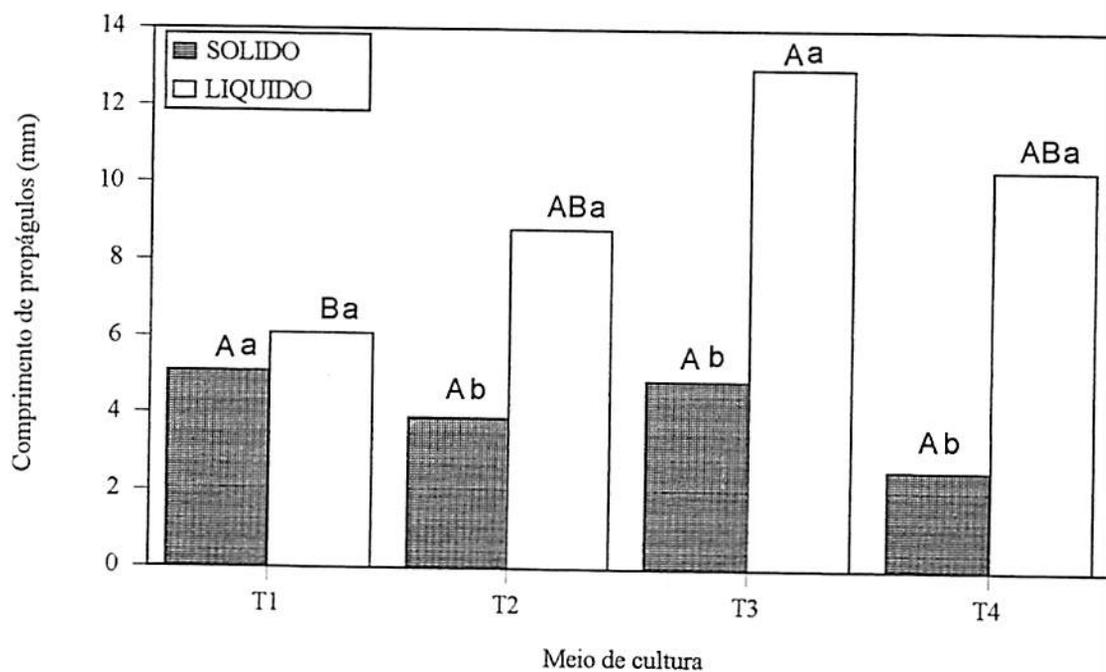


FIGURA 9. Efeito do meio de cultura MS suplementado com floroglucinol (T1), catecol (T2), ácido clorogênico (T3) e carvão ativado (T4) sobre o comprimento de propágulos de erva-baleeira. As médias iguais seguidas de letras maiúsculas dentro de estado físico e de letras minúsculas dentro de cada tratamento, não diferem entre si pelo teste de Duncan ( $P < 0,01$ ).

Uma outra vantagem do uso do meio líquido é que os brotos com crescimento vagaroso devido a presença de fungos ou bactérias, podem ser mais rápido identificados. A obscuridade do meio identifica os brotos contaminados.



FIGURA 10. Efeito comparativo entre a eficiência do meio de cultivo e a formação de propágulos de erva-baleeira.

O efeito morfogenético do ácido clorogênico provavelmente, foi devido ao aumento nos níveis endógenos da auxina. Esse efeito pôde ser comprovado por Hammerschlag (1982a) quando adicionou ácido clorogênico ao meio de cultura, observou uma maior multiplicação de brotos de porta enxertos de ameixeira. Posteriormente, foi capaz de enraizar 100% dos brotos quando o ácido indole acético (AIA) foi incorporado ao meio de cultura. Entretanto, quando apenas a auxina estava presente somente obteve 30% de enraizamento.

Os resultados mostram que o tratamento menos eficiente no meio de cultivo líquido para os parâmetros avaliados, foi com floroglucinol (Figuras 8 e 9), e no meio sólido para o parâmetro número de propágulos o meio de cultura contendo carvão ativado (Figura 8). Embora não tenha ocorrido diferença significativa entre o comprimento dos propágulos no meio sólido, o floroglucinol apresentou o maior valor e o carvão ativado o menor valor (Figura 9).

Jones (1976), adicionando floroglucinol ao meio de cultura contendo AIA, obteve um aumento no número de brotos e promoveu a extensão dos internódios em brotos de macieira,

indicando o efeito sinérgico do floroglucinol com a auxina. Esse efeito também pôde ser observado por Hackett (1970) em brotos de *Hedera*, quando utilizou  $5,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de catecol com  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIA. Fridborg e Eriksson (1975) sugerem que o carvão ativado, pode remover reguladores de crescimento em particular, a auxina do meio de cultura, promovendo a inibição do crescimento.

Os resultados obtidos nesse trabalho comparados com os da literatura, evidenciam a necessidade de incorporar uma auxina ao meio de cultura quando compostos como o ácido clorogênico estão presentes.

No meio de cultura MS sem regulador de crescimento, 70% dos propágulos provenientes do tratamento contendo ácido clorogênico enraizaram (dados não mostrados). Nos demais tratamentos não houve enraizamento. Vários compostos fenólicos atuam como co-fatores no enraizamento (Gortner, 1969; Jones, 1976), porém nesse trabalho apenas o ácido clorogênico mostrou esta função.

Os resultados obtidos com a suplementação do ácido clorogênico no meio de cultura permite sugerir o efeito desse composto como co-fator na formação de raízes adventícias de erva-baleeira.

### **4.3.3 Conclusões**

O meio líquido de cultivo contendo ácido clorogênico é mais eficiente para induzir a formação e o crescimento de propágulos de erva-baleeira, produzindo em média 3 propágulos por explante com 13 mm de comprimento.

O meio líquido de cultivo contendo floroglucinol e o meio sólido complementado com carvão ativado são os menos eficientes para induzir a formação e o crescimento de propágulos de erva-baleeira.

O enraizamento de erva-baleeira ocorre no meio MS sem regulador de crescimento, quando os propágulos são provenientes de meio MS contendo ácido clorogênico.

#### **4.4 Efeitos da concentração de agar e sacarose na multiplicação *in vitro* de segmento nodal de erva-baleeira**

##### **4.4.1 Material e Métodos**

Segmentos nodal com 30 a 40mm de comprimento foram desinfestados em solução comercial contendo 0,6% de hipoclorito de sódio e duas gotas de detergente comercial por 100ml de solução durante 10 minutos, sendo 5 minutos sob agitação. Após serem lavados quatro vezes em água esterilizada foram excisados com 5 mm de comprimento e inoculados. Os tratamentos formados pela combinação de 8 e 10 g.L<sup>-1</sup> de agar com 15, 30 e 45 g.L<sup>-1</sup> de sacarose foram cultivados no meio MS, suplementados com 1 µM de cinetina e 0,01 µM de ANA. O pH dos meios de cultura foram ajustados para  $5,7 \pm 0,1$  antes da autoclavagem.

Os explantes foram cultivados em fotoperíodo de 16 horas sob  $25\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  de irradiância a uma temperatura média de  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ .

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com seis tratamentos e dez repetições, cada repetição continha dois explantes. As médias foram analisadas pelo teste de Duncan ao nível de 1% de probabilidade de erro. As avaliações referentes à número e

comprimento de propágulos, ocorrência de calos e vitrificação foram realizadas com 35 dias após a incubação inicial.

#### 4.4.2 Resultados e Discussão

Os resultados apresentados na Tabela 3 mostram que houve uma interação altamente significativa entre as concentrações de agar e sacarose para número de propágulos e significativa para comprimento de propágulos. Entre os níveis de sacarose houve diferença altamente significativa para os parâmetros avaliados. Não houve diferença significativa nas variáveis avaliadas para as concentrações de agar.

Os resultados apresentados na Tabela 4, mostram que na presença de 8 g.L<sup>-1</sup> de agar, não houve diferença significativa entre os níveis de sacarose para número de propágulos, porém, houve diferença para o comprimento de propágulos, sendo a mais eficiente a concentração com 30 g.L<sup>-1</sup>, proporcionando um crescimento do propágulo de 7,62 mm. O tratamento contendo 45 g.L<sup>-1</sup> de sacarose foi o menos eficiente.

TABELA 3. Resumo do quadro de análise de variância do número e comprimento de propágulos de erva-baleeira.

Fonte de Variação	GL	Quadrados Médios	
		Número de propágulos	Comprimento (mm)
Agar	1	0,266667 <sup>ns</sup>	5,1041667 <sup>ns</sup>
Sacarose	2	1,9541667**	44,1166667**
Agar × sacarose	2	2,0041667**	29,0666667*
Resíduo	54	0,3250000	9,5865741
Total	59		
CV (%)		32,890	51,965

NS. não significativo

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste F.

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste F.

TABELA 4. Efeito de agar e sacarose sobre o número e comprimento de propágulos de erva-baleeira.

Agar (%)	Sacarose (%)	Número de propágulos*	Comprimento (mm)*
0,8	1,5	2,0 Aa	5,48 Aab
	3,0	1,7 Aa	7,62 Aa
	4,5	1,3 Aa	4,78 Ab
1,0	1,5	1,4 Ab	4,46 Ab
	3,0	2,4 Aa	7,62 Aa
	4,5	1,6 Ab	3,74 Ab

\* Médias iguais, seguidas de letras maiúsculas entre as concentrações de agar e de letras minúsculas entre as concentrações de sacarose, não diferem entre si pelo teste de Duncan ( $P < 0,01$ ).

Na presença de  $10 \text{ g.L}^{-1}$  de agar, houve diferença significativa entre os níveis de sacarose para os parâmetros avaliados. O tratamento contendo  $30 \text{ g.L}^{-1}$  foi o mais eficiente, produzindo 2,4 propágulos por explante com 7,62 mm de comprimento. Não houve diferença significativa entre os demais níveis de sacarose.

Foram observadas a formação de calos na base do explante no tratamento contendo  $8 \text{ g.L}^{-1}$  de agar +  $30 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose e a ocorrência de vitrificação no tratamento contendo  $8 \text{ g.L}^{-1}$  de agar +  $45 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose. Nos tratamentos contendo 15 e  $45 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose combinados com  $10 \text{ g.L}^{-1}$  de agar ocorreu tanto a formação de calos quanto a vitrificação (Figura 11).

Os dados demonstram que o aumento do potencial osmótico do meio de cultura imposto principalmente, pela sacarose na presença da menor concentração de agar, não estimulou a taxa de multiplicação de propágulos de erva-baleeira. Thorpe (1982), relata que para manter um alto potencial osmótico, necessário para o processo de formação de brotos, alta quantidade energética seriam requeridas, o que não foi observado neste trabalho.

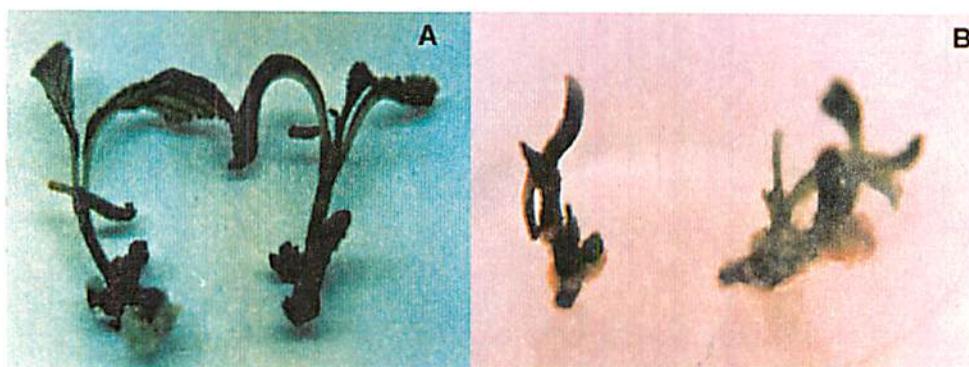


FIGURA 11. Formação de calos (A) e vitrificação (B) de explantes de propágulos de erva-baleeira.

A taxa de multiplicação e o crescimento de propágulos somente foram favorecidos quando houve um equilíbrio entre a soma dos potenciais impostos pela maior concentração de agar ( $10 \text{ g.L}^{-1}$ ) com  $30 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose. Resultados semelhantes foram obtidos por Gulsen e Dumanoglu (1991) na micropropagação de marmelo. Esses autores relatam que o maior número de brotos foi obtido quando houve um acréscimo nos níveis de sacarose de 20 para  $30 \text{ g.L}^{-1}$ . A taxa de multiplicação diminuiu linearmente quando aumentaram os níveis de sacarose até  $50 \text{ g.L}^{-1}$ .

Babic e Neskovic (1984), também obtiveram uma maior produção de brotos de amora quando utilizaram no meio de cultura  $30 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose. Enquanto que Athayde (1992) obteve 9,7 brotos por explante em porta-enxerto Trifoliata quando utilizou  $15 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose.

A vitrificação, uma desordem física e morfológica tem sido atribuída a um dos principais efeitos das concentrações de agar e sacarose. Neste trabalho a vitrificação somente ocorreu nos tratamentos que produziram as menores quantidades de propágulos com os menores comprimentos, como consequência do desequilíbrio entre as concentrações de agar e sacarose. Fato semelhante são relatados por Langford e Wainwright (1987) na propagação in vitro de

roseira. Outra possível causa da vitrificação observada neste trabalho pode ser atribuída a redução do potencial hídrico total do meio de cultura proporcionado pelo desequilíbrio entre as concentrações de agar e sacarose (George, 1996).

A formação de calos em alguns dos tratamentos, pode ser atribuída, à alteração na relação cinetina + ANA, provocada pelo desequilíbrio entre as concentrações de agar e sacarose no meio de cultura, induzindo provavelmente, uma redução no nível de cinetina utilizado. Segundo Leshem (1986), a ocorrência de calos pode ser observada em plantas vitrificadas pelas alterações que ocorrem nos níveis dos reguladores de crescimento, o que vem reforçar as observações realizadas neste trabalho.

#### **4.4.3 Conclusão**

As concentrações de  $10 \text{ g.L}^{-1}$  de agar +  $30 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose são as mais eficientes para aumentar a taxa de multiplicação de propágulos em erva-baleeira produzindo em média 2,4 propágulos por explante com 7,62 mm de comprimento.

As concentrações de agar utilizadas no experimento não influenciam o crescimento de propágulos de erva-baleeira.

A formação de calos e a ocorrência de vitrificação são resultados do desequilíbrio entre as concentrações de agar e sacarose.

#### **4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ATHAYDE, M.O. Diferentes concentrações de sacarose e sais na propagação "in vitro" do 'cravo' e 'trifoliata'. Lavras: Esal, 1992. 58p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia).

- BAJAJ, Y.P.S.; FURMANOWA, M.; OLSZOWSKA, O. Biotechnology of the micropropagation of medicinal and aromatic plants. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.) **Biotechnology in agriculture and forestry: medicinal and aromatic plants**. New York: Springer Verlag, 1988. v.4, p.60-103.
- BARNA, K.S.; WAKHLU, A.K. Modified single node culture method - a new micropropagation method for chickpea. **In Vitro Cell Development Biology Plant**, Columbia, v.31, p.150-152, July. 1995.
- BABIC, V.; NESKOVIC, M. Propagation of three blackberry cultivars from small apical buds in vitro. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v.59, n.2, p.183-185, 1984.
- BORNMAN, C.H.; VOGELMANN, T.C. Effect of rigidity of gel medium on benzyladenine-induced adventitious bud formation and vitrification in vitro in *Picea abies*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.61, n.3, p.505-512, July. 1984.
- DO, O.B.; CORMIER, F. Accumulation of peonidin-3-glucoside enhanced by osmotic stress in grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspension. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v.24, p.49-51, 1991.
- FRIDBORG, G.; ERIKSSON, T. Effects of activated charcoal on growth and morphogenesis in cell cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.34, n.2, p.306-308, 1975.
- GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture: 2.ed. part 2 in practice**. Somerset: Exegetics, 1996. Cap.12. p.575-638.
- GHASHGHAIE, J.; BRECKMANN, F.; SAUGIER, B. Effects of agar concentration on water status and growth of rose plants cultured in vitro. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.82, n.1, p.73-78, May. 1991.
- GORTNER, C. Auxin-synergists in rooting of cuttings. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.22, p.497-502, 1969.
- GUIA RURAL: ervas e temperos. São Paulo: Abril, 1991. 170p. (Ervas e Temperos, edição especial.).
- GULSEN, Y.; DUMANOGLU, H. The effect of sucrose, agar and pH on shoot multiplication and quality in quince a micropropagation. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v.289. p.115-116, 1991.
- HACKETT, W.P. The influence of auxin, catechol and methanolic tissues extracts on root initiation in aseptically cultured shoot apices of the juvenile and adult forms of *Hedera helix*. **Journal American Society Horticultural Science**, Alexandria, v.95, n.4, p.398-402, July. 1970.
- HAMMERSCHLAG, F. Factors influencing in vitro multiplication and rooting of the plum roostock myrobalan (*Prunus cerasifera* Ehrh.). **Journal American Society Horticultural Science**, Alexandria, v.107, n.1, p.44-47, Jan. 1982a.

- HAMMERSCHLAG, F. Factors affecting establishment and growth of peach shoots in vitro. **HortScience**, Alexandria, v.17, n.1, p.85-86, Feb. 1982b.
- JONES, O.P. Effect of phloridzin and phloroglucinol on apples shoots. **Nature**, London, v.262, n.5567, p.392-393, 1976.
- LAMEIRA, O.A.; COSTA, M.P.da.; PINTO, J.E.B.P. The efficiency of shoot and plantlet formation of *Cephaelis ipecacuanha* after three subcultures in vitro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.24, n.3, p.523-526, 1994.
- LANGFORD, P.J.; WAINWRIGHT, H. Effects of sucrose concentration on the photosynthetic ability of rose shoots in vitro. **Annals of Botany**, London, v.60, p.633-640, 1987.
- LESHEM, B. Carnation plantlets from vitrified plants as a source of somaclonal variation. **HortScience**, Alexandria, v.21, n.2, p.320-321, Apr. 1986.
- MANTEL, S.H.; HAQUE, S.Q.; WHITEHALL, A.P. Clonal multiplication of *Dioscorea alata* and *D. rotundata* Poiryams by tissue culture. **Journal Horticulture Science**, Ashford, v.53, n.2, p.95-98, Apr. 1978.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- SCHERER, P.A. Standardization of plant micropropagation by usage of a liquid medium with polyurethane foam plugs or a solidified medium with the gellan gum gelrite instead of agar. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v.226, p.107-114, 1988.
- SINGHA, S. Influence of agar concentration on in vitro shoot proliferation of *malus sp.* 'Almey' and *Pyrus communis* 'Seckel'. **Journal American Society Horticulture Science**, Alexandria, v.107, n.4, p.657-660, 1982.
- THORPE, T.A. Carbohydrate utilization and metabolism. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. (eds). **Tissue culture in forestry**. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers. 1982. p.325-368.
- WYSOKINSKA, H. Micropropagation of *Penstemon serrulatus* and iridoid formation in regenerated plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v.33, n.2, p.181-186, May, 1993.

## **5 CAPÍTULO II**

### **INDUÇÃO DE CALOS E ESTABELECIMENTO DA CURVA DE CRESCIMENTO CELULAR DE ERVA-BALEEIRA**

#### **RESUMO**

O objetivo do trabalho foi avaliar a influência do TDZ na formação e manutenção de calos e estabelecer a curva de crescimento celular de erva-baleeira para posterior correlação com o teor do princípio ativo. Segmentos caulinares com 30 a 40 mm de comprimento de erva-baleeira após terem sido desinfestados foram cultivados sob diferentes meios de cultura. Nos segmentos caulinares cultivados em meio MS, suplementado com 2,04 e 6,13  $\mu\text{M}$  de TDZ, houve a formação de calos em 100% dos explantes, sendo que a área coberta com calos foi em média 75%. Os calos quando transferidos para o meio fresco de cultura continuaram crescendo. Calos e células de erva-baleeira após terem sido subcultivados três vezes a intervalos de 28 dias e avaliados durante um período de 30 a 32 dias apresentaram curvas de crescimento com cinco fases distintas: a fase lag, exponencial, linear, desaceleração e estacionária. O maior percentual de crescimento de calos e células foram observados na fase exponencial e o menor percentual de crescimento ocorreu na fase lag.

## ABSTRACT

The influence of thidiazuron on callus formation and maintenance and establishment of cell cultures growth curve of *Cordia verbenacea* was evaluated. Stem segments with 30 to 40 mm length of *Cordia verbenacea* after sterilized, were cultivated on various culture media. The stem segments cultured in media containing 2.04 and 6.13  $\mu\text{M}$  TDZ occurred 100% callus formation in 75% superficies of explants. The callus, when transferred to fresh culture medium exhibited active growth. Callus and cells of after three subcultures for 28 days, evaluated between 30 and 36 days, showed a growth curve with distinct phases: lag, exponential, linear, desacceleration and stationary phase. The higher growth percentage of callus and cells were observed in the exponencial phase and the lower growth percentage occurred in the lag phase.

### 5.1 INTRODUÇÃO

O Thidiazuron ( TDZ ) foi desenvolvido originalmente pela empresa Schering AG (Berlim, Alemanha) para ser utilizado como desfolhante do algodoeiro (Mok et al., 1982) tendo mostrado efeitos semelhantes aos das citocininas quando aplicado em concentrações muito reduzida.

A atividade de citocinina do TDZ foi detectada em bioensaios de calos de *Phaseolus lunatus* L. cv. Kingston, onde ele foi mais ativo que a zeatina. É um composto do grupo das feniluréias e não apresenta o anel purina comum às citocininas tipo adenina, tais como, benzilaminopurina, cinetina ou zeatina, podendo ser considerada como a mais potente das difenil uréias que já foram avaliadas para uso em cultura de tecidos vegetais (Mok et al., 1982). Estudos com o TDZ mostram que este é mais ativo biologicamente em baixas concentrações que outras

citocininas sintéticas como cinetina e benzilaminopurina, é mais resistente às oxidases, além de ser mais estável (Mok et al., 1987).

O crescimento de calos é desejável para induzir variação somaclonal e estudos fisiológicos principalmente, quando se deseja relacionar a presença de produtos secundários com o crescimento celular. O TDZ é uma citocinina potente para estimular a formação de calos em explantes lenhosos especialmente, quando usado em concentrações igual ou maior que  $1,0\mu\text{M}$  (Huetteman e Preece, 1993).

Para entender o mecanismo regulador do metabolismo secundário, é essencial o estudo cinético do crescimento celular e a formação de metabólitos secundários benéficos a partir da cultura de tecidos da planta.

O metabolismo secundário é bem conhecido que é manifestado em células e tecidos específicos em determinados estágios de crescimento de plantas superiores, implicando que a expressão deste metabolismo está intimamente correlacionado com o crescimento e a diferenciação morfológica de células.

Segundo Wink (1987) tem sido investigado a produção biotecnológica de metabólitos secundários por cultura de células de plantas, destacando-se a produção de alcalóides nas culturas de *Catharanthus roseus* (anticancer, vincristina e vimblastina); *Cephaelis ipecacuanha* (antiamebicidas, emetina e cefalina); e *Cinchona* spp. (antimalarial, quinina e quinidina).

Não existem relatos de trabalhos na literatura sobre a indução de calos e estudos sobre a curva de crescimento celular de erva-baleeira.

O objetivo do trabalho foi avaliar a influência do TDZ na formação e manutenção de calos, e estabelecer a curva de crescimento celular de erva-baleeira para posterior correlação com o teor de princípio ativo

## **5.2 Efeito de thidiazuron na indução e manutenção de calos de erva-baleeira**

### **5.2.1 Material e Métodos**

Segmentos nodal com 30 a 40 mm de comprimento foram desinfestados em solução comercial contendo 0,6% de hipoclorito de sódio e duas gotas de detergente comercial por 100ml de solução durante 10 minutos, sendo 5 minutos sob agitação. Após serem lavados quatro vezes em água esterilizada foram excisados com 5 mm de comprimento e inoculados. Os explantes foram inoculados no meio sólido a 0,6% de agar no meio básico de MS, suplementado com 0,22; 0,68; 2,04 e 6,13 $\mu$ M de TDZ. O pH dos meios foram ajustados para  $5,7\pm 0,1$  antes da autoclavagem. O fotoperíodo foi de 16 horas luz sob  $12,5\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  de irradiância e Cada tratamento continha 20 explantes.

A avaliação do percentual de indução de calos foi realizada no início da formação dos calos sobre todos os explantes cultivados. Na avaliação da área dos explantes coberta com calos, três avaliadores atribuíram notas de 1, 2, 3 e 4 para os explantes que apresentavam, respectivamente, 25, 50, 75 e 100% da área coberta com calos, 30 dias após o cultivo inicial. Em seguida foi realizado o peso fresco dos calos. A avaliação do percentual de manutenção dos calos foi realizado 30 dias após serem transferidos para o meio fresco de cultivo.

O delineamento estatístico usado foi o inteiramente casualizado e os tratamentos foram comparados pelo Teste de Duncan ao nível de 1% de probabilidade.

### 5.2.2 Resultados e Discussão

Na Tabela 5 são apresentados os dados percentuais referentes a indução, manutenção e peso fresco dos calos. A formação de calos ocorreu em todos os tratamentos com 10 a 15 dias de cultivo e as colorações predominantes foram verde e verde cinza. As maiores concentrações foram as mais eficientes, todos os explantes formaram calos, apresentaram a maior área coberta com calos e os maiores pesos e quando transferidos para o meio fresco de cultivo continuaram crescendo.

TABELA 5. Percentagem de indução, manutenção e peso fresco de calos em segmentos caulinares de *Cordia verbenacea* sob o efeito de TDZ.

TDZ ( $\mu\text{M}$ )	Indução (%)	Manutenção (%)	Peso fresco (g)
0,22	70	0	0,97
0,68	80	0	1,19
2,04	100	100	1,44
6,13	100	100	1,33

Os tratamentos com as menores concentrações de TDZ foram menos eficientes, apresentaram explantes com 50% da área coberta com calos (Figura 12) e quando transferidos para o meio fresco nas mesmas concentrações ocorreu a paralização do crescimento com a posterior morte dos calos (Tabela 5). Não foi observada a proliferação de brotos neste trabalho.

Os tratamentos que apresentaram o explante com a maior área coberta com calos, em média 75%, foram 2,04 e 6,13  $\mu\text{M}$  de TDZ (Figura 13). Somente nesses tratamentos os calos mostraram serem friáveis, aumentaram de volume (Figura 13) e mantiveram a coloração inicial

quando transferidos para o meio fresco de cultura. A friabilidade dos calos é muito importante para o início da suspensão celular.

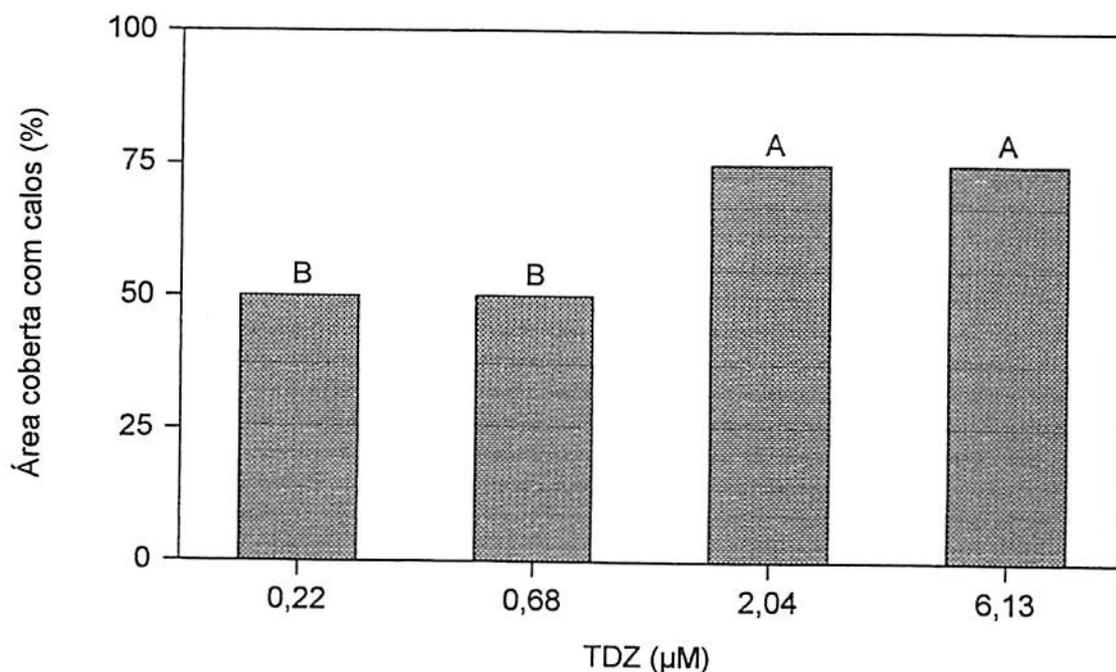


FIGURA 12. Percentual de área coberta com calos em diferentes concentrações de TDZ. As médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan ( $P < 0,01$ ).

Apesar do TDZ ter um efeito maior na proliferação de brotações, conforme os resultados obtidos por Barna e Wakhlu (1995) na micropropagação de roseira, Preece et al. (1991) trabalhando com propágulos de silver maple (*Acer saccharinum* L.) verificaram que TDZ nas concentrações 0,1; 0,5 e 1,0  $\mu\text{M}$ , teve efeito inibitório no crescimento de brotos axilares, mostrando, entretanto, efeito crescente na formação de calos com o aumento da concentração.

Ramana et al. (1995) relatam a inibição de brotos de batata doce em cinco dos sete genótipos testados na presença de 0,9  $\mu\text{M}$  de TDZ porém, o desenvolvimento de calos foi

observado. Nos demais genótipos embora tenha ocorrido a regeneração de brotos, uma pequena formação de calos em torno da base do explante pode ser observada.

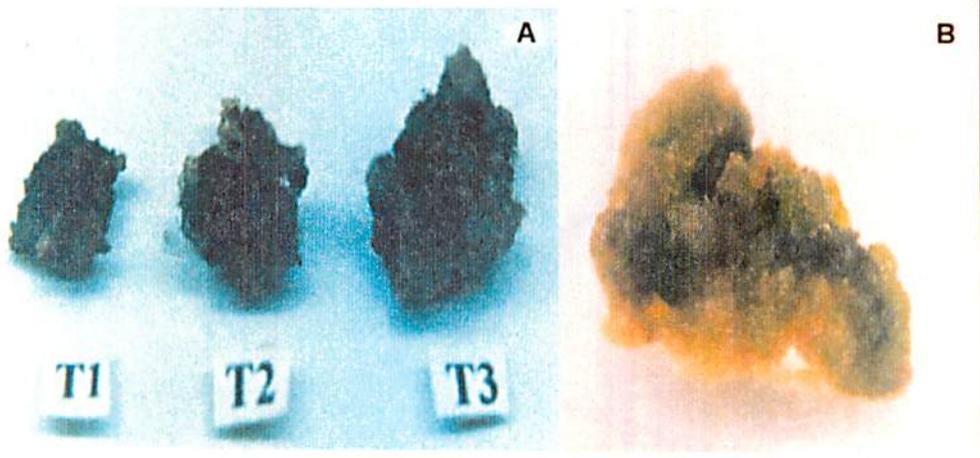


FIGURA 13. Efeito de TDZ no desenvolvimento de calos de erva-baleeira. (A), T1-  $0,22\mu\text{M}$ ; T2 -  $0,68\mu\text{M}$  e T3 -  $2,04\mu\text{M}$  e (B) calo friável em crescimento.

Segundo Huetteman e Preece (1993) o aumento na concentração de TDZ tende a estimular a formação de calos à custa do crescimento de brotos axilares, tal como ocorreu neste trabalho com a erva-baleeira. Fato semelhante foi evidenciado por Sato (1994) estudando gérbera de vaso, o qual observou que a partir de  $2,3\ \mu\text{M}$  de TDZ já se iniciava o processo de indução de calos com a inibição da regeneração de brotos e folhas.

Portanto, fica evidenciado neste trabalho que a formação de calos induzida por altas concentrações de TDZ, inibiu a proliferação de brotos axilares.

### **5.2.3 Conclusões**

Os tratamentos contendo 2,04 e 6,13  $\mu\text{M}$  de TDZ são mais eficientes na indução de calos, apresentando explantes, com 75% em média da área coberta com calos.

As maiores concentrações de TDZ proporcionam uma indução e manutenção de 100% e os maiores peso fresco de calos.

Altas concentrações de TDZ inibem a proliferação de brotos axilares em explantes de erva-baleeira.

## **5.3 Estabelecimento da curva de crescimento de calos e de células em suspensão de erva-baleeira**

### **5.3.1 Material e Métodos**

O experimento foi instalado simultaneamente com o 5.2. Calos de erva-baleeira obtidos a partir de segmento caulinar cultivados em meio MS solidificado com 0,6% de agar inoculado e suplementado com 2,32  $\mu\text{M}$  de cinetina + 10,74  $\mu\text{M}$  de ANA foram utilizados como fonte de explantes. Os calos foram subcultivados três vezes a intervalos de 28 dias no mesmo meio de cultura, com fotoperíodo de 16 horas luz sob 12,5  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  de irradiância.

Posteriormente, parte dos calos foram transferidos para o mesmo meio e condições de cultivo e a outra parte para erlenmeyers contendo 30 ml de meio líquido com as mesmas concentrações do meio MS anterior. Estes calos foram cultivados sob agitação de 100 rpm em fotoperíodo de 16 horas sob 6,25  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  de irradiância.

Para determinação da curva de crescimento, os calos foram pesados em intervalos de 3 dias durante um período de 30 dias e as células a intervalos de 4 dias durante um período de 32 dias. Primeiramente, foi realizado a determinação do peso fresco, em seguida os calos e as células foram colocados em estufa a 45°C durante 24 horas, e logo após, estimado o peso seco. Cada pesagem foi proveniente de dez frascos retirados ao acaso.

O percentual de crescimento dos calos e das células foram determinados subtraindo o peso fresco final (PF) do peso fresco inicial (PI) dividindo este valor pelo peso fresco final e multiplicando por 100, através da fórmula,  $[(PF - PI) \div PF] \times 100$ . O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado e os pesos médios comparados pelo Teste de Duncan ao nível de 1% de probabilidade.

### 5.3.2 Resultados e Discussão

As Figuras 14 e 15 ilustram as curvas de crescimento de calos e de células em suspensão de erva-baleeira. O crescimento de calos e células apresentaram cinco fases distintas, proporcionando curvas do tipo sigmoide. A fase lag, na qual as células preparam-se para a divisão, ocorreu até o quarto dia para as células com o menor percentual de crescimento (3%) e para os calos até o sexto dia com 20% de crescimento.

O período de máxima divisão celular ou fase exponencial de crescimento ocorreu entre o quarto e décimo segundo dia para as células, e para os calos ocorreu entre o sexto e o décimo oitavo dia, com os maiores percentuais de crescimento respectivamente, 37 e 30%, similares as obtidas em *Picrasma quassioides* por Scragg e Allan (1993). A fase lag pode ser considerada como uma fase produtora de energia e a fase exponencial como a fase biossintética (Shimizu et al., 1977).

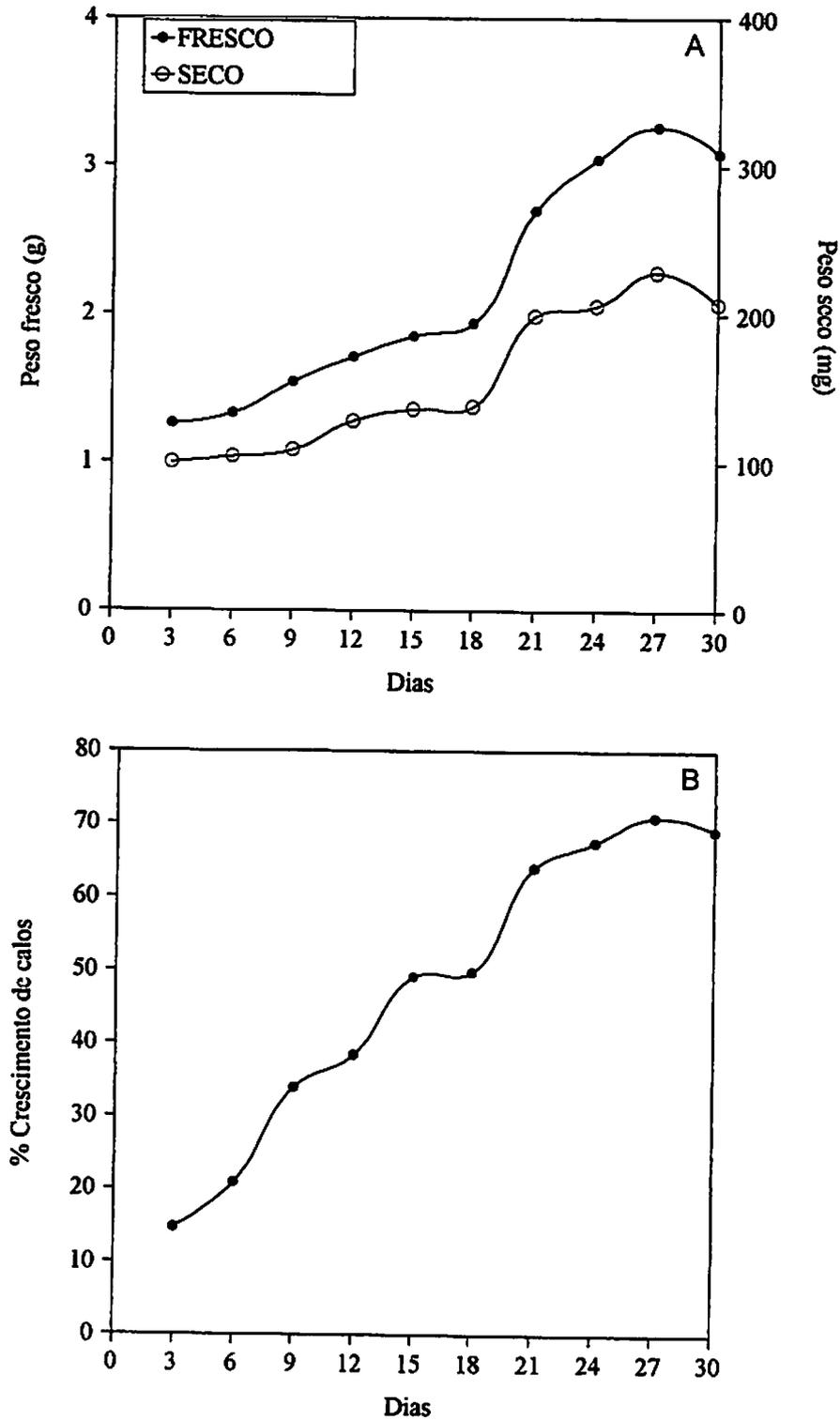


FIGURA 14. Curva de crescimento de calos de *Cordia verbenacea* a partir do peso fresco e seco (A) e do percentual de crescimento (B).

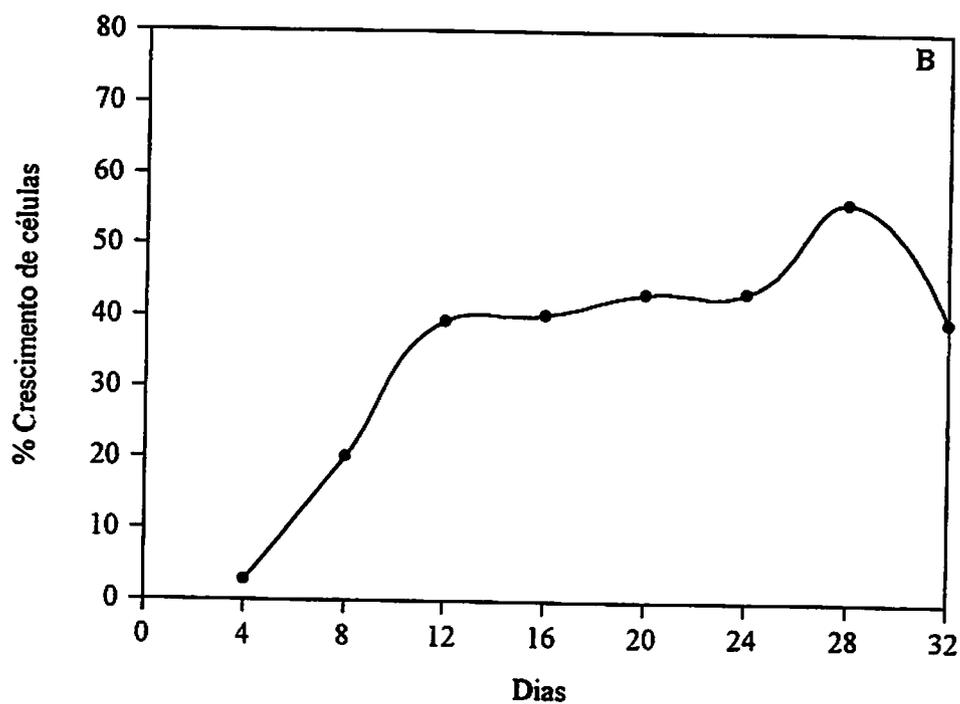
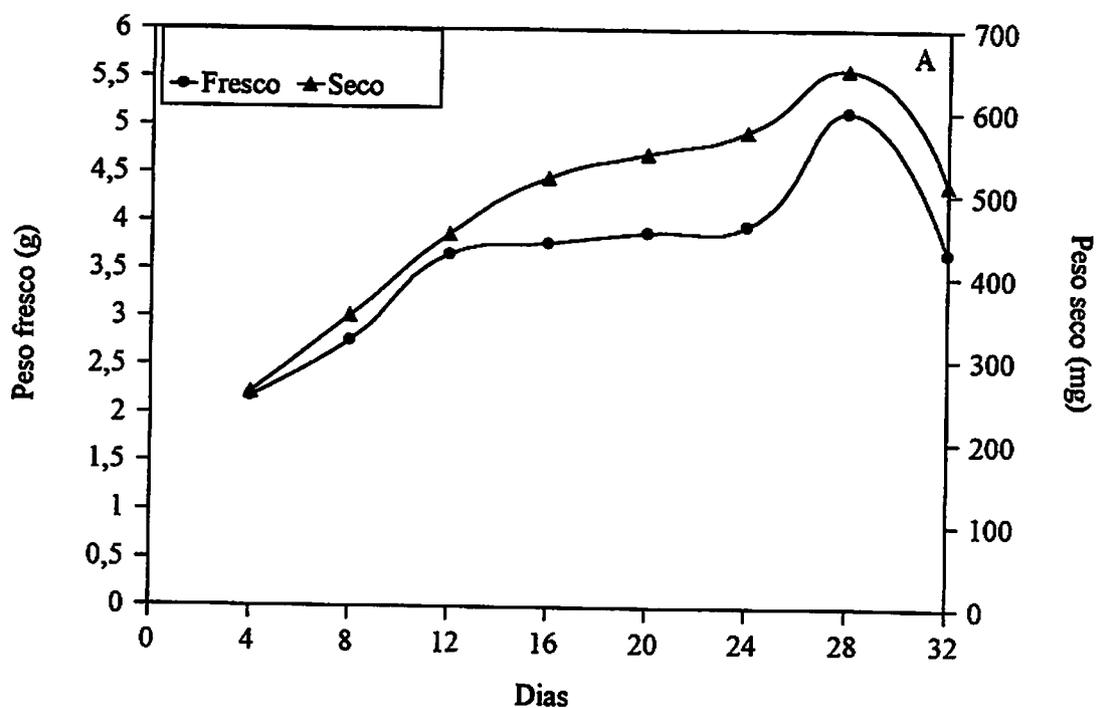


FIGURA 15. Curva de crescimento de células em suspensão de *Cordia verbenacea* a partir do peso fresco e seco (A) e do percentual de crescimento (B).

O período de crescimento linear ocorreu para as células entre o décimo segundo e vigésimo quarto dia com 4% de crescimento, e para os calos entre o décimo oitavo e o vigésimo primeiro dia com 14% de crescimento. Nesse período a divisão celular diminui e as células crescem. Segundo Smith (1992) o crescimento e o desenvolvimento celular nessa fase são mais evidentes. Nessa fase o período de crescimento para as células foi maior que a dos calos, respectivamente, 12 e 3 dias.

O período de desaceleração do crescimento ocorreu entre o vigésimo quarto e vigésimo oitavo dia para as células com 13% de crescimento, e entre o vigésimo primeiro e vigésimo sétimo dia para os calos com o menor percentual de crescimento (7%). As culturas nesse período devem ser transferidas para um meio fresco devido a redução de nutrientes, produção de produtos tóxicos, secagem do agar e a redução de O<sub>2</sub> no interior das células e calos (Smith, 1992).

A fase estacionária ou período na qual o número de células é constante ocorreu a partir do vigésimo oitavo dia para as células e para a cultura de calos a partir do vigésimo sétimo dia. Nessa fase geralmente, ocorre o maior acúmulo de metabólitos secundários.

Em algumas espécies de solanaceas segundo Lindsey e Yeoman (1983) e em *Daucus carota* (Noé, Langebartels e Seitz, 1980) o acúmulo de produtos secundários ocorreu na fase estacionária.

A Figura 16 mostra a diferenciação entre as células provenientes de calos, segmento caulinar e folha.

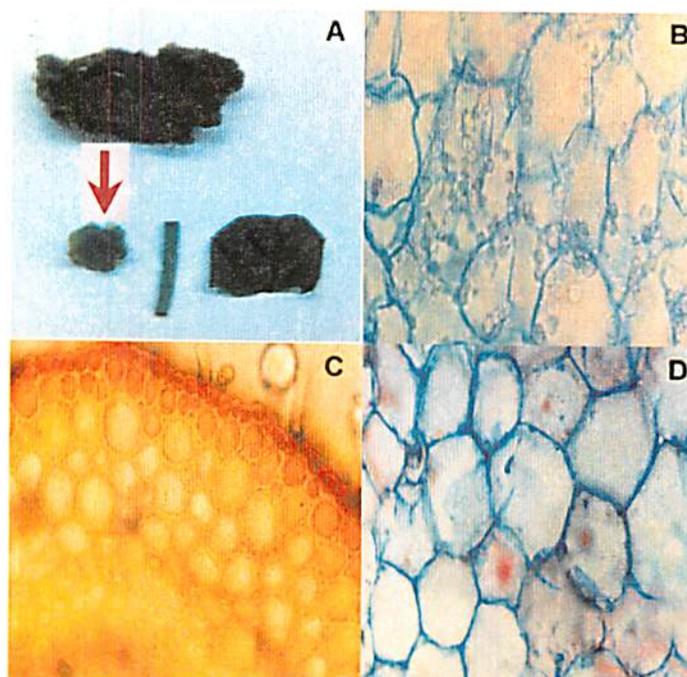


FIGURA 16. Fonte de explantes (A) e suas respectivas estruturas celulares. (B) Calo, (C) Segmento caulinar e (D) Folha

### 5.3.3 Conclusões

A curva de crescimento de calos e células em suspensão de erva-baleeira apresentam cinco fases distintas: lag, exponencial, linear, desaceleração e estacionária.

Na curva de crescimento de calos e células os maiores percentuais de crescimento, respectivamente, 30 e 37% são obtidos na fase exponencial, e os menores percentuais são obtidos durante a fase de desaceleração para os calos (7%) e na fase lag para as células (3%).

O período de maior crescimento (12 dias) ocorre na fase linear para as células e na fase exponencial para os calos.

Nas duas curvas, foram estabelecidas curvas de crescimento do tipo sigmoide.

#### 5.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARNA, K.S.; WAKHLU, A.K. Effects of thidiazuron on micropropagation of rose. **In Vitro Cellular Developmental Biology**, Columbia, v.31, n.1, p.44-46, 1995.
- HUETTEMAN, C.A.; PREECE, J.E. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v.33, n.2, p.105-119, 1993.
- LINDSEY, K.; YEOMAN, M. M. The relationship between growth rate differentiation and alkaloid accumulation in cell cultures. **Journal of Experimental Botany**, London, v.34, n.145, p.1055-1065, Aug. 1983.
- MOK, M.C.; MOK, D.W.S.; ARMSTRONG, D.J.; SHUDO, K.; ISOGAI, Y.; OKAMOTO, T. Cytokinin activity of N-phenyl-N'-1, 2, 3-Thiadiazol-5-yl urea (thidiazuron). **Phytochemistry**, Oxford, v.21, n.5, p.1509-1511, May. 1982.
- MOK, M.C.; MOK, D.W.S.; TURNER, J.E.; MUJER, C.V. Biological and biochemical effects of cytokinin-active phenylurea derivatives in tissue culture systems. **HortScience**, Alexandria, v.22, n.6, p.1194-1197, Dec. 1987.
- NOÉ, W.; LANGEBARTELS, C.; SEITZ, H. U. Anthocyanin accumulation and PAL activity in a suspension culture of *Daucus carota* L. **Planta**, New York, v.149, p.283-287, 1980.
- PREECE, J.E.; HUETTEMAN, C.A.; ASHBY, W.C.; ROTH, P.L. Micro-and cutting propagation of silver maple: I results with adult and juvenile propagules. **Journal American Society Horticultural Science**. Alexandria, v.116, n.1, p.142-148, 1991.
- RAMANA, M.G.; ANANTA, P.; ESSIE, B.; CHANNAPATNA, S.P.; CURT, M.P. Thidiazuron-induced adventitious shoot regeneration of sweetpotato (*Ipomea batatas*). **In Vitro Cellular Developmental Biology**, Columbia, v.31, n.2, p.65-71, 1995.
- SATO, A.Y. **Propagação de gébera de vaso através da cultura de tecidos**. Lavras: ESAL, 1994. 95p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia).
- SCRAGG, A. H.; ALLAN, E. J. *Picrasma quassioides* Bennet (Japanese Quassia Tree): In vitro culture and production of quassin. In: BAJAJ, Y. P. S. (ed.), **Biotechnology in agriculture and forestry: medicinal and aromatic plants IV**. Berlin: Springer-Verlag, 1993. v.21, p.249-268.
- SHIMIZU, T.; CLITTON, A.; KOMAMINE, A.; FOWLER, M. W. Changes in metabolite levels during growth of *Acer pseudoplatanus* (sycamore) cells in batch suspension culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.40, p.125-129, 1977.
- SMITH, R.M. **Plant tissue culture: techniques and experiments**. San Diego: Academic Press, 1992. 171p.
- WINK, M. Physiology of the accumulation of secondary metabolites with special reference to alkaloids. 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.2, p.17-42.

## **6 CAPÍTULO III**

### **ENRAIZAMENTO DE MICROESTACAS E NUTRIÇÃO DE PLÂNTULAS DE ERVA-BALEEIRA**

#### **RESUMO**

O trabalho teve como objetivo viabilizar a propagação de erva-baleeira através do enraizamento de microestacas e avaliar o efeito da solução nutritiva do meio MS sobre a formação de mudas de erva-baleeira. As microestacas com 10 cm foram submetidas ao plantio diretamente no substrato (sem imersão) ou então com imersão da base destas em soluções de 250, 500 e 750 mg.L<sup>-1</sup> de ácido indolbutírico (AIB) adicionado de 100 mg.L<sup>-1</sup> de ácido bórico e 20 g.L<sup>-1</sup> de sacarose durante 24 horas. Nos tratamentos nutricionais foi utilizado a solução nutritiva do meio MS, composto de quatro concentrações de macros e micronutrientes: Controle (sem nutrição); 100% (1/1 MS); 50% (1/2 MS) e 25% (1/4 MS). O pH das soluções foi ajustado para 5,5. A presença de AIB influenciou na formação do sistema radicular. Com as microestacas imersas na concentração de 250 mg.L<sup>-1</sup> de AIB, obteve-se 68% de enraizamento, com maior comprimento, número e peso seco de raízes. Aumentando-se os níveis de AIB até 700 mg.L<sup>-1</sup> não houve enraizamento, sendo este nível superado pela ausência de AIB que produziu 24% de enraizamento. A solução nutritiva do meio MS contendo 100% da concentração dos sais foi a

mais eficiente para induzir a formação e o crescimento do sistema radicular e produzir a maior relação parte aérea/raiz em plântulas de erva-baleeira.

### ABSTRACT

A procedure for propagation of *Cordia verbenacea* by microcuttings is described. Microcuttings were planted directly in substrate or were immersed in indolebutyric acid (IBA - 250, 500 and 750 mg.L<sup>-1</sup>) with boric acid (100 mg.L<sup>-1</sup>) and sucrose (20 g.L<sup>-1</sup>) during 24 hours. Variation in MS salt concentration were tested 0, 1/4, 1/2 and full strength. The pH of media were adjusted to 5.5. The most results were obtained with 250 mg.L<sup>-1</sup> of IBA for root length, root number and root dry weight. When the levels of IBA were increased to 750 mg.L<sup>-1</sup> no rooting occurred and without IBA the rooting percentage was 24%. The full strength of MS salts in the nutrient medium was more efficient for rooting and root growth and produced better vegetative/root system rate in *Cordia verbenacea* plantings.

## 6.1 INTRODUÇÃO

A propagação vegetativa através do uso de microestacas é uma técnica alternativa para a multiplicação de plantas. O pré-tratamento com auxinas é necessário ao enraizamento de algumas espécies, proporcionando rapidez, uniformidade do enraizamento e aumento no número de raízes adventícias (Mc Cown e Mc Cown, 1987).

A parte aérea e o sistema radicular estão em constante competição pelas substâncias assimiladas ou sintetizadas pela planta, podendo servir como base para identificação

dos fatores ambientais e químicos que influenciam no crescimento e desenvolvimento das plantas (Aung, 1982).

Dentre os fatores de *stress* que podem interferir na composição química de uma planta, a nutrição é um dos que merece destaque. A deficiência e, ou, o excesso de nutrientes podem interferir no crescimento e desenvolvimento da muda e promover maior ou menor produção de fármacos na planta (Martins et al., 1995).

A solução nutritiva MS tem sido a mais utilizada em meios de cultura *in vitro* influenciando juntamente, com reguladores de crescimento a formação e o desenvolvimento de plântulas (George, 1996). Durante o estágio de aclimação e formação da muda geralmente, são empregadas, novas formulações químicas ou orgânicas, muitas das vezes sem serem avaliadas suas eficiências sobre a formação de plântulas e mudas.

Não existem relatos de trabalhos na literatura disponíveis sobre a propagação vegetativa de erva-baleeira bem como sobre a nutrição durante a formação da muda. O trabalho teve como objetivo viabilizar a propagação através do enraizamento de microestacas e identificar a solução nutritiva que proporcione o melhor crescimento em plântulas de erva-baleeira.

## **6.2 Enraizamento de microestacas de erva-baleeira**

### **6.2.1 Material e Métodos**

As microestacas com 100 mm foram coletadas a 50 mm da região apical de brotações de mudas de erva-baleeira cultivadas em casa de vegetação com mais de 3 anos de idade. As microestacas foram mantidas com as folhas que foram cortadas ao meio e submetidas ao plantio diretamente no substrato (sem imersão) ou então com imersão da base destas em solução

de 250, 500 e 750 mg.L<sup>-1</sup> de AIB adicionado de 100 mg.L<sup>-1</sup> de ácido bórico e 20 g.L<sup>-1</sup> de sacarose durante 24 horas. O pH das soluções foi ajustado para 5,5.

Em seguida as microestacas, foram colocadas em copos plásticos com volume de 0,20 L contendo como substrato uma mistura de areia e vermiculita na proporção de 2:1, tendo uma microestaca por copo. O experimento foi instalado em casa de vegetação sob sombrite, com redução da luz em 50% e com sistema de irrigação por nebulização intermitente.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, e cada tratamento continha vinte microestacas. A porcentagem de enraizamento, comprimento da raiz primária, número de raízes maior que 100 mm e peso seco de raízes, foram avaliados com 30 dias após o plantio. As médias foram transformadas para  $\sqrt{x+5}$  para a variável enraizamento e  $\sqrt{x+0,5}$  para as demais variáveis e analisadas através de regressão polinomial.

### 6.2.2 Resultados e Discussão

A presença de AIB influenciou a formação do sistema radicular em microestacas de erva baleeira. Conforme se observa na Tabela 6, houve um efeito significativo, ao nível de 1% de probabilidade, entre as concentrações de AIB utilizadas.

A concentração de 250 mg.L<sup>-1</sup> de AIB foi a mais eficiente proporcionando um enraizamento de 68%, maior peso seco, número e comprimento de raízes em microestacas de erva-baleeira (Figura 17). Aumentando-se os níveis de AIB até 750 mg.L<sup>-1</sup> houve um decréscimo no valor de todas as variáveis mensuradas, resultando em uma equação polinomial do tipo quadrática (Figura 17).

TABELA 6. Resumo do quadro de análise de variância do percentual de enraizamento  $\sqrt{x+5}$ , peso seco, número e comprimento de raiz  $\sqrt{x+0,5}$  de microestacas de erva-baleeira.

Fonte de Variação	GL	Quadrados Médios			
		Enraizamento (%)	Peso seco (g)	Número	Comprimento (cm)
AIB	3	67,1730253**	25,7251284**	0,4900243**	6,9097049**
Resíduo	36	4,1865804	1,1421163	0,1092628	0,5048801
Total	39				
CV (%)		39,058	49,572	35,802	44,476

\*\* significativo ao nível de 1%, pelo teste F.

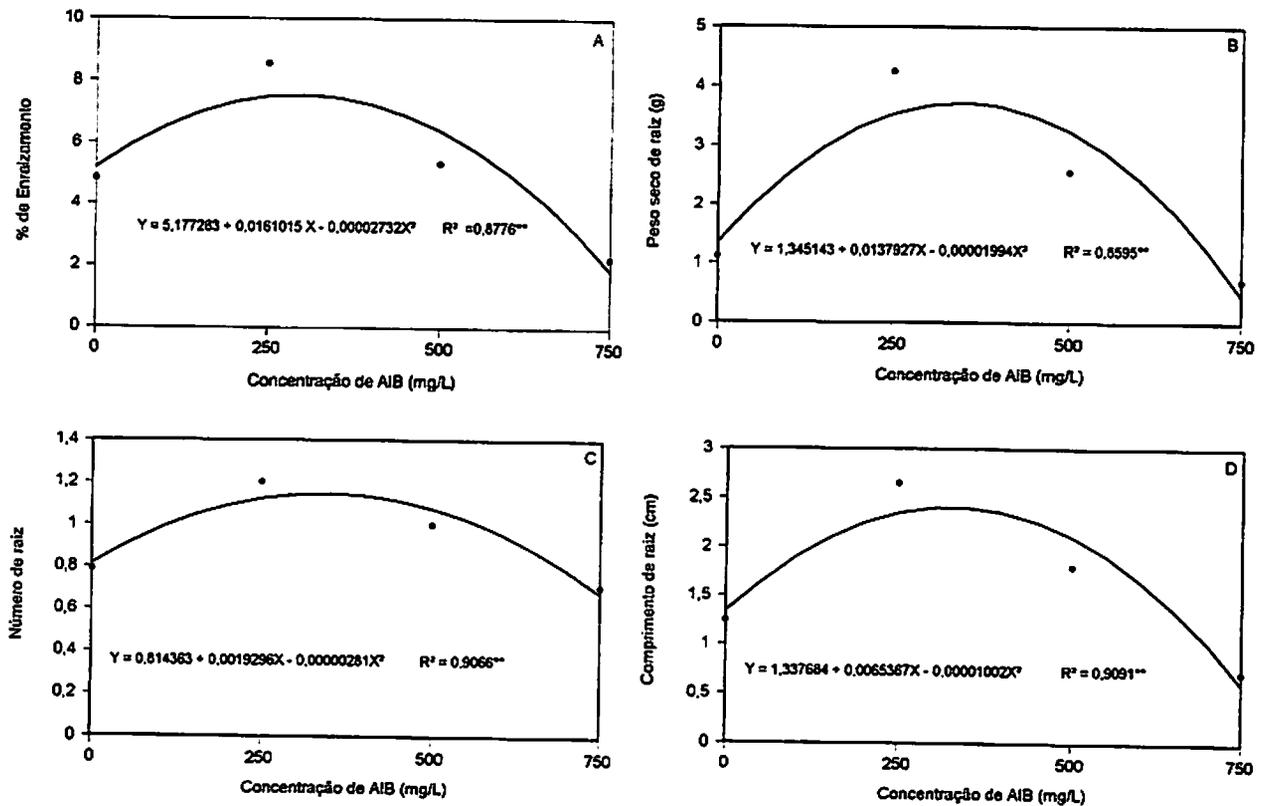


FIGURA 17. Efeito de AIB sobre o % de enraizamento (A), peso seco (B), número (C) e comprimento de raiz em microestacas de erva-baleeira (D).

Na presença de  $500 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIB o enraizamento foi de 24%, e na presença da maior concentração o enraizamento foi de 0% (Figura 17), sendo superado pela ausência de AIB

que produziu 18% de enraizamento. A inibição do enraizamento na presença da maior concentração foi provocada provavelmente, pelo excesso de auxina. Neste caso, quanto mais concentrada for a solução, menor será a porcentagem de enraizamento. Esses resultados são semelhantes aos obtidos por Igboanugo (1987) que observou a toxidez do AIB em estacas de três espécies de *Eucalyptus*. O autor relata um decréscimo no enraizamento a medida em que aumentou a concentração de AIB por 24 horas.

Conforme ilustrado na Figura 18 o tratamento contendo  $250 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIB proporcionou melhor formação do sistema radicular e estabelecimento das microestacas. Na presença da maior concentração de MS o enraizamento foi afetado, prejudicando o estabelecimento das microestacas sem haver a formação da parte aérea.



FIGURA 18. Efeito de AIB na formação do sistema radicular de microestacas (A) T1-  $250 \text{ mg.L}^{-1}$ , T2-  $500 \text{ mg.L}^{-1}$ , T3-  $750 \text{ mg.L}^{-1}$  e T4-  $0 \text{ mg.L}^{-1}$  e (B) Estabelecimento de microestacas de erva-baleeira.

Os resultados obtidos neste trabalho com a menor concentração de AIB testada na presença do ácido bórico e sacarose foram semelhantes aos obtidos por Ono et al. (1992) que relatam o benefício que menores concentrações de AIB mais ácido bórico e sacarose proporcionaram na formação do sistema radicular de Camélia. Entretanto, Deschamps (1993) obteve uma resposta linear em função das concentrações de AIB utilizadas, sendo que as maiores médias na porcentagem de enraizamento e comprimento de raízes em microestacas de sarandi (*Sebastiania schottiana* Muell.) corresponderam as maiores concentrações de AIB (122 e 630 mg.L<sup>-1</sup>).

### **6.2.3 Conclusões**

A concentração de 250 mg.L<sup>-1</sup> de AIB proporciona um enraizamento de 68%, maior número, comprimento e peso seco de raízes.

O aumento nos níveis de AIB reduz o enraizamento até 0%.

O enraizamento de microestacas de erva-baleeira pode ser empregada como um método alternativo de propagação.

## **6.3 Efeito do meio nutritivo MS sobre o desenvolvimento de plântulas de erva-baleeira**

### **6.3.1 Material e Métodos**

O experimento foi instalado em casa de vegetação com sistema de irrigação por nebulização intermitente. Para obtenção de plântulas, foram utilizadas 200 sementes provenientes de mudas de erva-baleeira com 3 anos de idade cultivadas em casa de vegetação. As sementes

após serem coletadas, foram lavadas em água corrente para retirada da mucilagem. Em seguida, foram semeadas em bandejas de isopor com 72 células contendo areia fina lavada.

Após o período de germinação compreendido entre 9 e 30 dias, as plântulas foram submetidas a uma seleção para uniformização da raiz e parte aérea. Em seguida foram transferidas para o mesmo tipo de bandeja contendo como substrato uma mistura de areia fina e vermiculita na proporção 1:1.

Nos tratamentos nutricionais foi utilizado a solução nutritiva do meio MS (Tabela 7), composto de quatro diferentes concentrações dos macros e micronutrientes: Controle (sem nutrição); 1/1 MS; 1/2 MS 1/4 MS. O pH das soluções foi ajustado para 5,5.

TABELA 7. Composição química do meio MS e suas respectivas concentrações.

Componentes	MS (mg.L <sup>-1</sup> )
<b>Macronutrientes</b>	
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	440
KNO <sub>3</sub>	1900
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
<b>Micronutrientes</b>	
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,025
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,025
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2
KI 0,75	0,83
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	22,3
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,25
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8,6
FeEDTA·7H <sub>2</sub> O	27,8
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	37,2
<b>Orgânicos</b>	
Ácido nicotínico	0,5
Glicina	2,0
Mio-inositol	100
Piridoxina.HCl	0,5
Tiamina.HCl	0,5
Sacarose (g.L <sup>-1</sup> )	30

As aplicações das soluções nutritivas foram realizadas semanalmente, direto na superfície do substrato e a quantidade aplicada foi de 5 ml por plântula. Cada tratamento continha vinte plântulas.

As avaliações de peso fresco e seco de raízes, comprimento da raiz primária, comprimento e peso fresco e seco da parte aérea foram realizadas aos 60 dias. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado e as médias comparadas pela análise de regressão polinomial.

### 6.3.2 Resultados e Discussão

Conforme mostra a Tabela 8 houve um efeito significativo ao nível de 1% de probabilidade entre as concentrações das soluções nutritivas, para todas as variáveis analisadas.

TABELA 8. Resumo do quadro de análise de variância do peso fresco e seco e comprimento de raiz e do peso fresco e seco e altura da parte aérea de plantas de erva-baleeira.

Fonte de variação	GL	QM					
		Raiz			Parte Aérea		
		P. Fresco (g)	P. Seco (g)	Comprimento (cm)	P. Fresco (g)	P. Seco (g)	Altura (cm)
Nutrição	3	2,5752**	0,0403**	48,9257**	3,9953**	0,2016**	33,2426**
Resíduo	36	0,0833	0,0020	133,0053	0,0759	0,0044	0,5597
Total	39						
CV (%)		42,404	47,932	11,713	38,191	38,140	19,125

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste F.

As Figuras 19 e 20 mostram que houve um crescimento linear entre as concentrações das soluções nutritivas do meio MS, para todos os parâmetros avaliados, com exceção, para comprimento de raiz, que proporcionou uma regressão do tipo quadrática, a partir

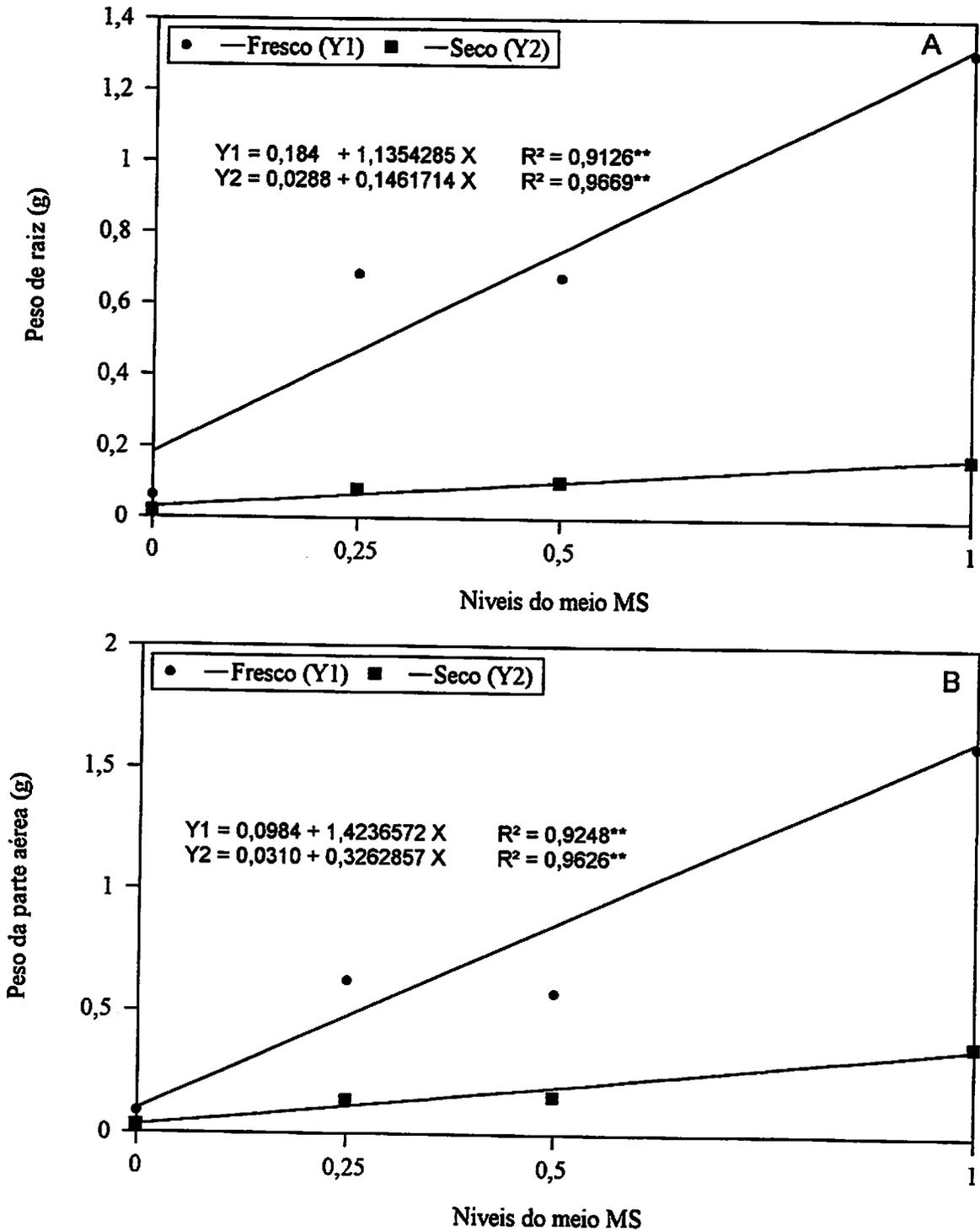


FIGURA 19. Efeito da solução nutritiva MS sobre o peso fresco e seco de raiz (A) e da parte aérea de plantas (B) de erva-baleeira.

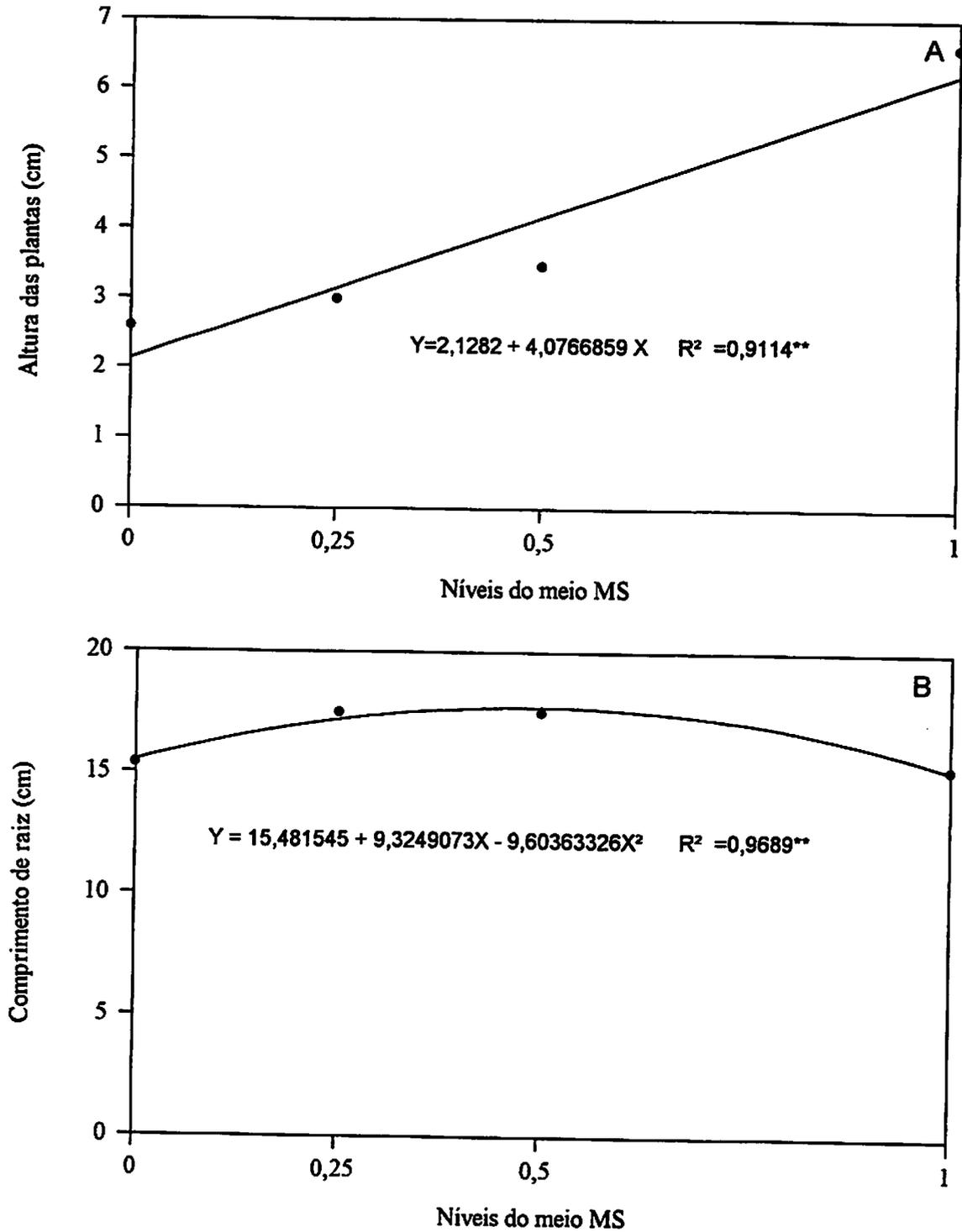


FIGURA 20. Efeito da solução nutritiva MS sobre altura de plantas (A) e comprimento de raiz (B) de plantas de erva-baleeira.

do tratamento contendo 50% da concentração nutritiva do meio MS. O tratamento contendo 100% da concentração nutritiva do meio MS foi o mais eficiente para todos os parâmetros avaliados, com exceção para comprimento de raiz, cujo tratamento mais eficiente foi a solução nutritiva contendo 50% da concentração do meio MS.

Todos os tratamentos que receberam complemento nutricional, foram mais eficientes na formação e crescimento do sistema radicular e da parte aérea, que o tratamento que não recebeu nenhuma complementação nutricional (Figura 21). Os resultados demonstram a necessidade que a espécie possui por nutrientes para o completo desenvolvimento das plântulas.

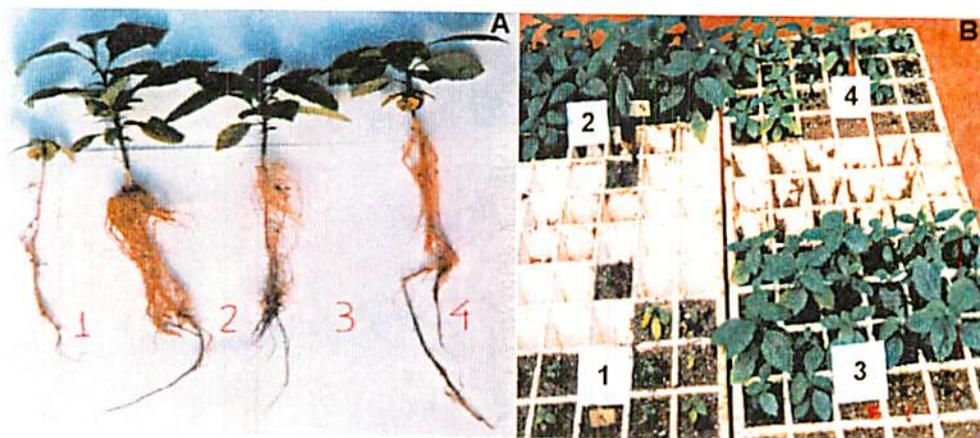


FIGURA 21. Efeito da solução nutritiva do meio MS sobre a formação e crescimento do sistema radicular (A) e da parte aérea (B) de plantas de erva-baleeira. 1- 0 MS; 2- 1 MS; 3- 0,5 MS e 4- 0,25 MS.

Os dados apresentados na Tabela 9 mostram que o maior valor alcançado na relação parte aérea/raiz foi obtido com a solução mais concentrada. Estes resultados são

semelhantes aqueles obtidas por Mazlish, Fritton e Kendal (1980) em plântulas de milho e por Costa (1995) em plantas de ipeca quando utilizaram, 100 % da solução nutritiva MS.

TABELA 9. Efeito da concentração de soluções nutritivas do meio MS sobre o rendimento da biomassa seca na parte aérea e no sistema radicular de plantas de erva-baleeira.

Concentração da solução nutritiva (%)	Parte aérea (mg)	Sistema radicular (mg)	Parte aérea/raiz
0	31	17	1,82
25	138	81	1,70
50	156	102	1,53
100	370	171	2,16

Todos os tratamentos direcionaram seus fotossintatos em maior proporção para a parte aérea da planta. Os resultados apresentados na Tabela 8, demonstram a necessidade que a planta tem por nutrientes para que o objetivo de maior proporção de biomassa seja acumulada na parte aérea. Tendo em vista, que a maior concentração de flavonóides na planta encontram-se nas folhas (Guia Rural, 1991) a produção de biomassa da parte aérea deve ser estimulada.

Em *Artemisia annua* L. sob cultivo hidropônico, Magalhães e Figueira (1996) observaram que na concentração de 100% de nitrato (solução nutritiva de Saruge) o rendimento de biomassa foi maior que nos tratamentos contendo menores concentrações da mesma solução nutritiva.

A deficiência e, ou, o excesso de nutrientes podem interferir no crescimento e desenvolvimento das plantas e promover maior ou menor produção de fármacos. Quando possível a adubação mineral deve ser evitada, embora em erva-baleeira, Montanari (1992) observou que em plantas adultas, houve aumentos na produção de artemetina e hidroxiartemetina com o uso de N-P-K mineral.

A recomendação mais preconizada do uso de adubação mineral é no caso da correção das deficiências graves no solo que possam comprometer o desenvolvimento das plantas, como no caso do fósforo (Martins et al., 1995).

O efeito da adubação na produção de biomassa de *Mikania glomerata* (Guaco) foram observadas por Pereira et al., (1996). Os autores relatam que a espécie respondeu sensivelmente à aplicação de nitrogênio inorgânico, quando utilizaram 60 g de sulfato de amônia, 250 g de de superfosfato simples e 20 g de cloreto de potássio produziu seis vezes mais fitomassa que o tratamento sem adubação.

### 6.3.3..Conclusões

A solução nutritiva do meio MS contendo 100% da concentração dos sais é a mais eficiente para induzir a formação do sistema radicular e o crescimento em plântulas de erva-baleeira.

Soluções nutritivas do meio MS estimulam maior produção de biomassa na parte aérea de plantas de erva-baleeira.

A maior relação parte aérea/raiz é obtida com 100% da concentração da solução nutritiva do meio MS.

## 6.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AUNG, L.H. Root initiation in tomato seedlings. *Journal of American Society for Horticultural Science*. Alexandria, v.107, n.6, p.1015-1018, Nov. 1982.

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).

- DESCHAMPS, C. Propagação vegetativa "in vivo" e "in vitro" de sarandi (*Sebastiania schottiana* Muell. ARG.), espécie florestal de mata ciliar. Lavras: UFLA, 1993. 128p. (Dissertação - Mestrado em Fisiologia Vegetal).
- GEORGE, E.F. Rooting and establishment In: GEORGE, E.F. (ed.). **Plant propagation by tissue culture: part 2 in practice**. 2.ed. Somerset: Exegetics, 1996. Cap.14. p.670-733.
- GUIA RURAL: ervas e temperos. São Paulo: Abril, 1991. 170p. (Ervas e Temperos, edição especial).
- IGBOANUGO, A. B. I. Rooting of lignotubers of some *Eucalyptus* with indole 3 butyric acid. **Pakistan Journal of Forestry**, v.37, n.3, p.121-124, 1987.
- MAGALHÃES, P.M.; FIGUEIRA, G.M. Influência das proporções nitrato/amônia, sobre os rendimentos de *Artemisia annua* L., em cultivo hidropônico. In: **SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL**, 14, Florianópolis. 1996, **Programas e Resumos...** Florianópolis: UFSC, 1996. p.34.
- MALZLISH, N.A.; FRITTON, D.D.; KENDALL, W.A. Root morphology and early development of maize at varying levels of nitrogen. **Agronomy Journal**, Madison, v.72, n.1, p.25-31, Jan. 1980.
- MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M. de; CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E. O cultivo das plantas medicinais. In: MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M. de; CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E. (eds.). **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV, 1995. Cap.1, p.17-64.
- Mc COWN, D. D.; Mc COWN, B. H. North american hardwoods. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D. J. (eds). **Cell and tissue culture in forestry**. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1987. p.247-260.
- MONTANARI, I. Aspectos agronômicos e fitoquímicos do cultivo de erva-baleeira. In: **SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL**, 12, Curitiba. 1992, **Anais...** Curitiba: UFPR, 1992. p.180.
- ONO, E. O.; RODRIGUES, J. O.; RODRIGUES, S. D. Interação entre auxinas e boro no enraizamento de estacas de Camélia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v.4, n.2, p.107-112, 1992.
- PEREIRA, A.M.S.; MENESES Jr., A.; CÂMARA, F.L.A.; FRANÇA, S.C. Efeito da adubação na produção de biomassa de *Mikania glomerata* (guaco). In: **SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL**, 14, Florianópolis. 1996, **Programas e Resumos...** Florianópolis: UFSC, 1996. p.33.

## 7 CAPÍTULO IV

### IDENTIFICAÇÃO DE FLAVONÓIDES EM ERVA-BALEEIRA

#### RESUMO

O trabalho teve como objetivo extrair, separar e identificar flavonóides em extratos de folha e suspensão de células de erva-baleeira. Os extratos obtidos, foram submetidos a separação e purificação por cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida em coluna (CLC) utilizando sílica gel com solventes de diferentes polaridade. Após as frações das amostras de folha e células terem sido separadas pelo eluente ácido acético, foram obtidos os seguintes resultados: I.V.:  $\gamma_{\text{KBr}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) : 3500; 3000; 2400; 1550-1500; 1450; 1000; 650. U.V: 0,27  $\mu\text{g}$  em metanol:  $\lambda = 200 \text{ nm}$  para folha e U.V: 0,36  $\mu\text{g}$  em metanol:  $\lambda = 200 \text{ nm}$  para célula. RMN  $^1\text{H}$ : 11,5 (s) 1H; 6-8 (m) 9H; 3,5 (d) 2H ( $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{O}_7$ ) e 6-8 (m) 9H; 3,5 (d) 2H; 1,98 (t) 3H ( $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_5$ ). O ponto de fusão das substâncias separadas foi de 328-330 °C. Solubilidade total em água e parcialmente em metanol. Os compostos identificados foram 7,4'-diidróxi-5'-carboximetóxi isoflavona e 7,4'- diidróxi-5'-metil isoflavona.

## ABSTRACT

This paper describe method for extraction, separation and identification of flavonoids in extract from leaves and cell suspension. The separation and purification of extracts were carried out by thin layer chromatography and column liquid chromatography using silica gel with solventes of different polarity. After the fraction of sample of extracto from leaves and cells separated by acetic acid, were obtained: I.V.:  $\gamma_{\text{KBr}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) : 3500; 3000; 2400; 1550-1500; 1450; 1000; 650. U.V: 0,27  $\mu\text{g}$  in methanol:  $\lambda = 200 \text{ nm}$  for leaf and U.V: 0,36  $\mu\text{g}$  in methanol:  $\lambda = 200 \text{ nm}$  for cell. RMN  $^1\text{H}$ : 11,5 (s)1H; 6-8 (m) 9H; 3,5 (d) 2H ( $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{O}_7$ ) and 6-8 (m) 9H; 3,5 (d) 2H; 1,98 (t) 3H ( $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_5$ ). The separated substance showed 328-330 °C fusion point. Total solubility in water and partialy in methanol. The identified composto were 7,4'-dihydroxy-5'-carboxymethoxy isoflavone and 7,4'- dihydroxy-5'-methil isoflavone.

### 7.1..INTRODUÇÃO

O termo flavonóide deriva do latim flavus, que significa amarelo, em virtude da cor que conferem às flores. Estes pigmentos podem ser coloridos ou incolores. Os flavonóides concentram-se mais na parte aérea das plantas, ocorrendo em menor proporção nas raízes e nos rizomas. São os metabólitos secundários mais difundidos no reino vegetal, sendo responsáveis pela coloração das flores (Martins et al., 1995).

O esqueleto básico dos flavonóides consiste em heterosídios com 15 carbonos, que inclui dois anéis aromáticos hidroxilados, ligados entre si por um fragmento de 3 carbonos (Di Stasi, 1996). Semelhante a antocianinas, ocorrem mais freqüentemente em combinação glicosídica. Embora de duas a três centenas de flavonóides agliconas sejam conhecidas, somente três são os

mais comuns: kaempferol, quercetina e miricetina. São compostos solúveis principalmente em água (Harborne, 1984).

Como a antocianidina, esses três flavonóides correspondentes podem ser separados claramente por cromatografia em papel. Os outros conhecidos são simples variações estruturais principalmente, dos flavonóides comuns e são de ocorrência natural limitada (Harborne, 1984). Kaempferol, quercetina, miricetina, apigenina, luteolina e tricina diferem principalmente, um do outro, através dos valores de  $R_f$ , obtidos por cromatografia em camada delgada (CCD), cor ou espectro a partir de estruturas comuns e podem usualmente serem distinguidos por estes métodos. Já os flavonóides metilados são melhor separados por CCD (Mabry, Markham e Thomas, 1970a).

A separação de flavonóides por cromatografia líquida em coluna (CLC) é um método eficiente principalmente, quando grandes quantidades de flavonóides estão presentes no extrato. A identificação desses componentes podem ser realizadas com eficiência através das análises das estruturas por Espectroscopia de Ultravioleta (U.V), Espectrometria de Infravermelho (I.V), Espectrometria de Massa (EM) e Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de  $^1\text{H}$ ) (Mabry, Markham e Thomas, 1970b e Ferri, 1996).

## **7.2 Extração, separação e identificação de flavonóides em erva-baleeira**

### **7.2.1..Material e Métodos**

Para obtenção da amostra de folhas foram coletadas 42 g de folhas verdes provenientes de ramos com inflorescência de plantas de erva-baleeira com três anos de idade cultivadas em casa de vegetação. Após a coleta as folhas foram secas em estufa a uma temperatura constante de 45 °C por 24 horas. Em seguida, foram moídas, pesadas, obtendo-se 11,03 g que

foram colocadas em 200 ml de metanol por um período de 48 horas. Posteriormente, foram filtradas procedendo-se a extração em um evaporador rotatório.

O extrato separado do metanol, foi colocado sob vácuo por 24 horas em um dessecador, contendo sílica, cloreto de cálcio anidro ( $\text{CaCl}_2$ ) e pentóxido de fósforo ( $\text{P}_2\text{O}_5$ ).

Do extrato obtido, uma pequena porção foi diluída em 5 ml de metanol e outra porção diluída em 5ml de clorofórmio. Em seguida foram preparadas lâminas para serem utilizadas em CCD.

As amostras foram aplicadas nas cromatoplasmas através de tubos capilares de vidro e colocadas em cubas cromatográficas nos seguintes solventes: metanol (100 %); clorofórmio (100 %); metanol + clorofórmio (1:1), (3:1); metanol + clorofórmio + água (56:36:8); hexano (100 %); hexano + metanol (1:1), (2:1), (1:2), (1:3), (1:4); ácido acético (100 %); ácido acético + metanol (1:1), (1:2), e (1:3). Após o desenvolvimento do cromatograma, quando a fase móvel atingiu a parte superior das cromatoplasmas, foi marcado a distância percorrida pela fase móvel. Em seguida foram secas e reveladas na presença de iodo em recipiente fechado. Posteriormente, foi marcado a distância percorrida pelas manchas desde a origem e os resultados relatados através de  $R_f$  (Mabry, Markham e Thomas, 1970c).

Pelo método de CLC foram utilizadas amostras provenientes de folhas obtidas no método descrito anteriormente e células obtidas de calos a partir de folhas de erva-baleeira através de técnicas *in vitro*.

No preparo da CLC foi utilizada sílica gel 60, diluída em clorofórmio puro e uma coluna com 45cm de comprimento e 2,4 cm de diâmetro. Para calcular a quantidade de sílica a ser utilizada no preenchimento da coluna com 30 cm de altura, foi utilizada a fórmula:  $V = \pi \cdot R^2 \cdot h$ . 30 %, onde, V= peso da sílica a ser utilizada, R= raio da coluna e h= altura do enchimento da coluna desejada.

No preparo da separação das substâncias, extratos de folhas pesando 178 mg foram diluídas em 5ml de éter de petróleo e extratos de células pesando 100 mg foram diluídas em 5 ml de metanol.

Para separar os componentes da amostra foram utilizados os seguintes solventes na sequência da menor para a maior polaridade: hexano, éter de petróleo, clorofórmio, metanol e ácido acético na amostra de folha, e os dois últimos na amostra de células. A vazão das frações coletadas foi de 1 ml por minuto. Em seguida evaporou-se o solvente das frações coletadas.

Para determinação da estrutura dos compostos foram utilizados, Espectrometria de Infravermelho e de Ultravioleta, Espectrometria de Massa e Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de  $^1\text{H}$ ), além do ponto de fusão e solubilidade.

### **7.2.2 Resultados e Discussão**

O trabalho descrito apresenta duas técnicas cromatográficas e outras, que vão desde o isolamento, purificação e proposições estruturais por métodos físicos de análise.

Na CCD os extratos diluídos em clorofórmio geralmente, apresentavam manchas formando uma cauda sem haver separação, dificultando o cálculo de  $R_f$ . Na Tabela 10 são mostrados os valores de  $R_f$  dos solventes que melhor separaram as substâncias.

De acordo com a estrutura da molécula que possui um componente grande apolar e outro polar, faz-se necessário o uso de um sistema de solventes de polaridade intermediária onde a formação de pontes de hidrogênio entre os grupos polares na molécula com os componentes do sistema de solventes pode competir com a formação de pontes de hidrogênio com o suporte (sílica gel).

TABELA 10. Valores de  $R_f$  obtidas na CCD sob vários solventes em extratos diluídos em metanol.

Solvente	Concentração	$R_f$
Hexano+MEOH	1:4	0,93
MeOH+CHCl <sub>3</sub>	1:3	0,77
MeOH+CHCl <sub>3</sub> +H <sub>2</sub> O	56:36:8	0,89
MeOH	100%	0,69
AcOH	100%	0,86
AcOH + MeOH	1:1	0,67
	1:2	0,67
	1:3	0,86

MeOH- metanol; CHCl<sub>3</sub>- clorofórmio; AcOH- ácido acético; H<sub>2</sub>O- água.

Os valores de  $R_f$  revelam que as substâncias foram melhor separadas na presença dos solventes de maior polaridade como metanol e ácido acético, isoladamente ou combinados entre si, além de metanol combinado com clorofórmio e água, metanol combinado com clorofórmio (1:3) e hexano combinado com metanol na proporção 1:4. Os menores valores de  $R_f$  foram obtidas na presença de AcOH+MeOH nas proporções 1:1 e 1:2 (0,67) e de MeOH a 100% (0,69). Os maiores valores de  $R_f$  (0,93 e 0,89) foram obtidos quando foram utilizados como eluente hexano+MeOH (1:4) e MeOH+CHCl<sub>3</sub>+H<sub>2</sub>O (56:36:8), respectivamente.

Embora exista considerável envolvimento das áreas especificadas para cada tipo de flavonóide, o valor de  $R_f$  serve como um guia útil para interpretação preliminar do tipo de flavonóide (Mabry, Markham e Thomas, 1970c).

Na CLC após as amostras de folha e células terem sido separadas pelo ácido acético foram obtidas respectivamente 79 e 94 mg de uma substância de cor amarelo parda com o ponto de fusão de 328 a 330 °C, solúvel totalmente em água e parcialmente em metanol.

O espectro de absorção de Ultravioleta em 100% de metanol revelam que os valores de absorbância obtidas pelas células foram maiores que as obtidas pela folha em todos os comprimentos de onda. Em  $\lambda = 200$  nm foi obtido o maior valor, 0,36  $\mu\text{g}/\text{metanol}$  para células e 0,27  $\mu\text{g}/\text{metanol}$  para folha (Figura 22).

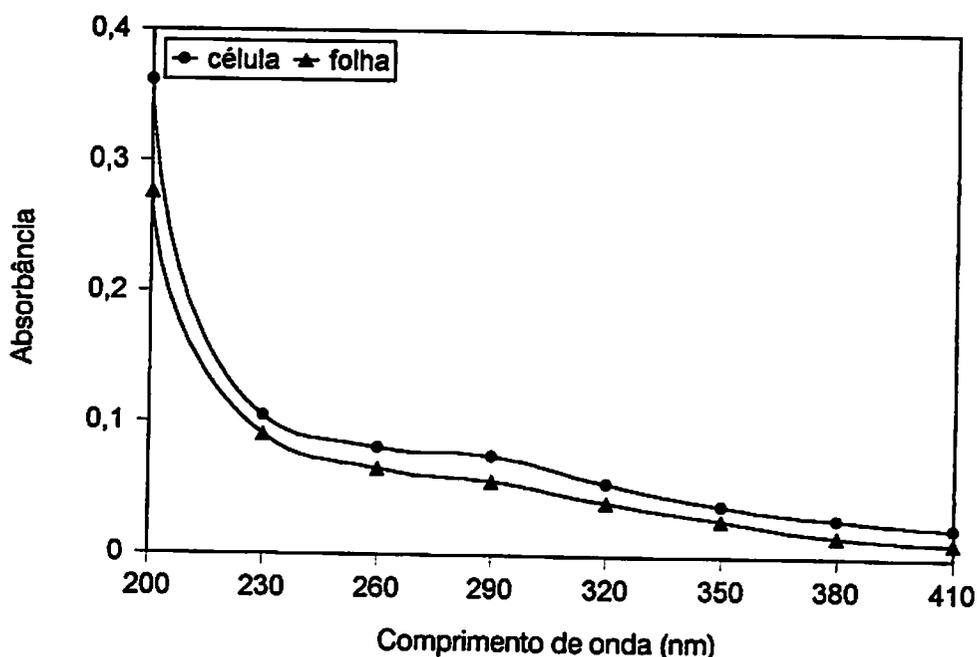


FIGURA 22. Espectro de absorção de Ultravioleta em 100% de metanol.

Os dados mostram que na amostra de células cultivadas *in vitro* ocorre uma maior concentração de produtos do que na amostra de folhas.

O fracionamento do extrato hexânico das células e folhas da planta resultou em uma fração cristalizável, cujos espectros no I.V, RMN de  $^1\text{H}$  e de espectrometria de massa (EM) (Figuras 23, 24 e 25) indicaram tratar-se de uma mistura de isoflavonóides. Através dos dados obtidos e comparações com dados literários, infere-se que os compostos encontrados em maior quantidade tanto em folhas quanto em células são aqueles apresentados pelas estruturas I e II respectivamente,  $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{O}_7$  com 328 g/mol e  $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_5$  com 284 g/mol de peso molecular. (Figura 26).

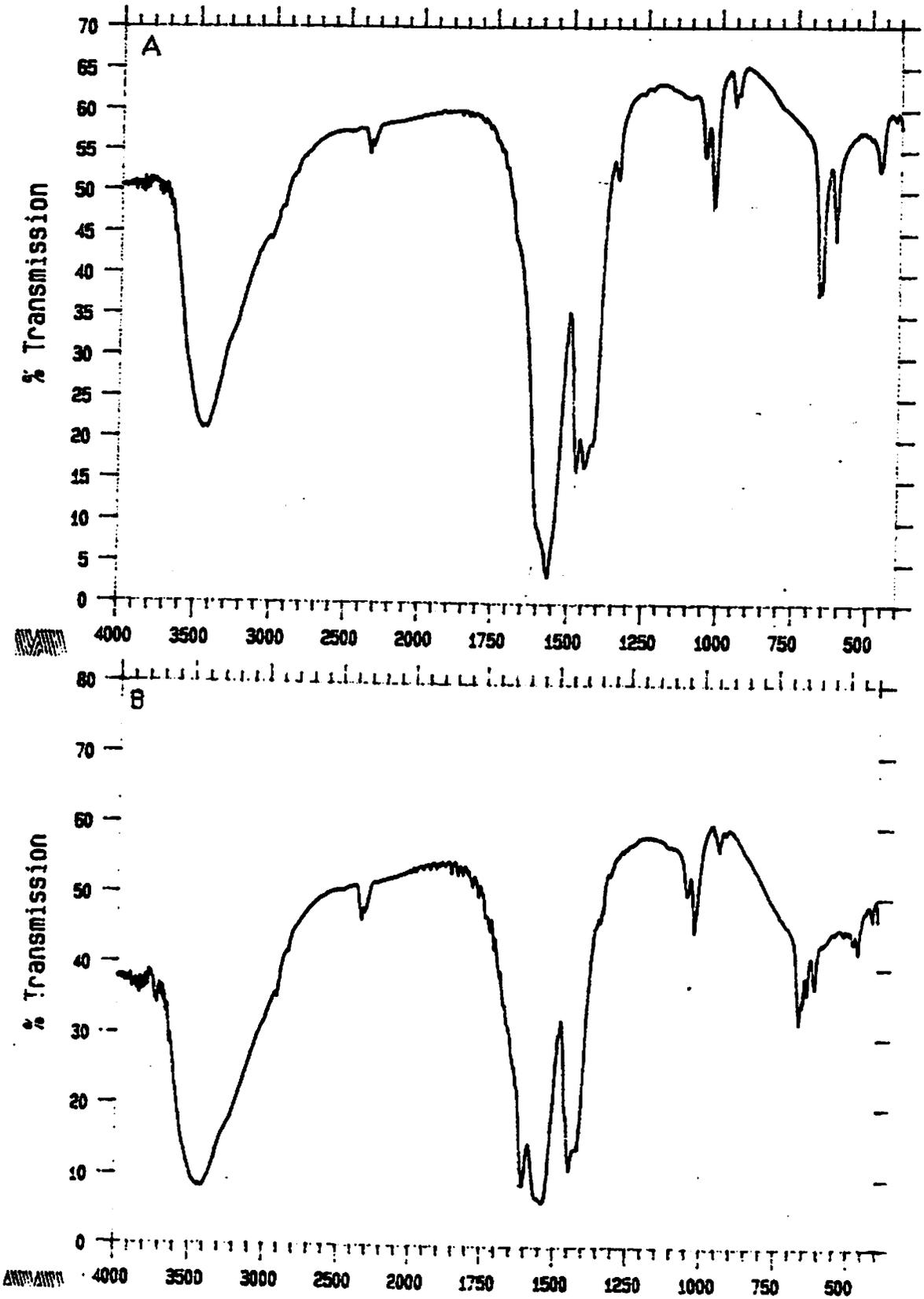


FIGURA 23. Espectro de infravermelho de flavonóides em folha (A) e suspensão de células (B) de plantas de erva-baleeira.

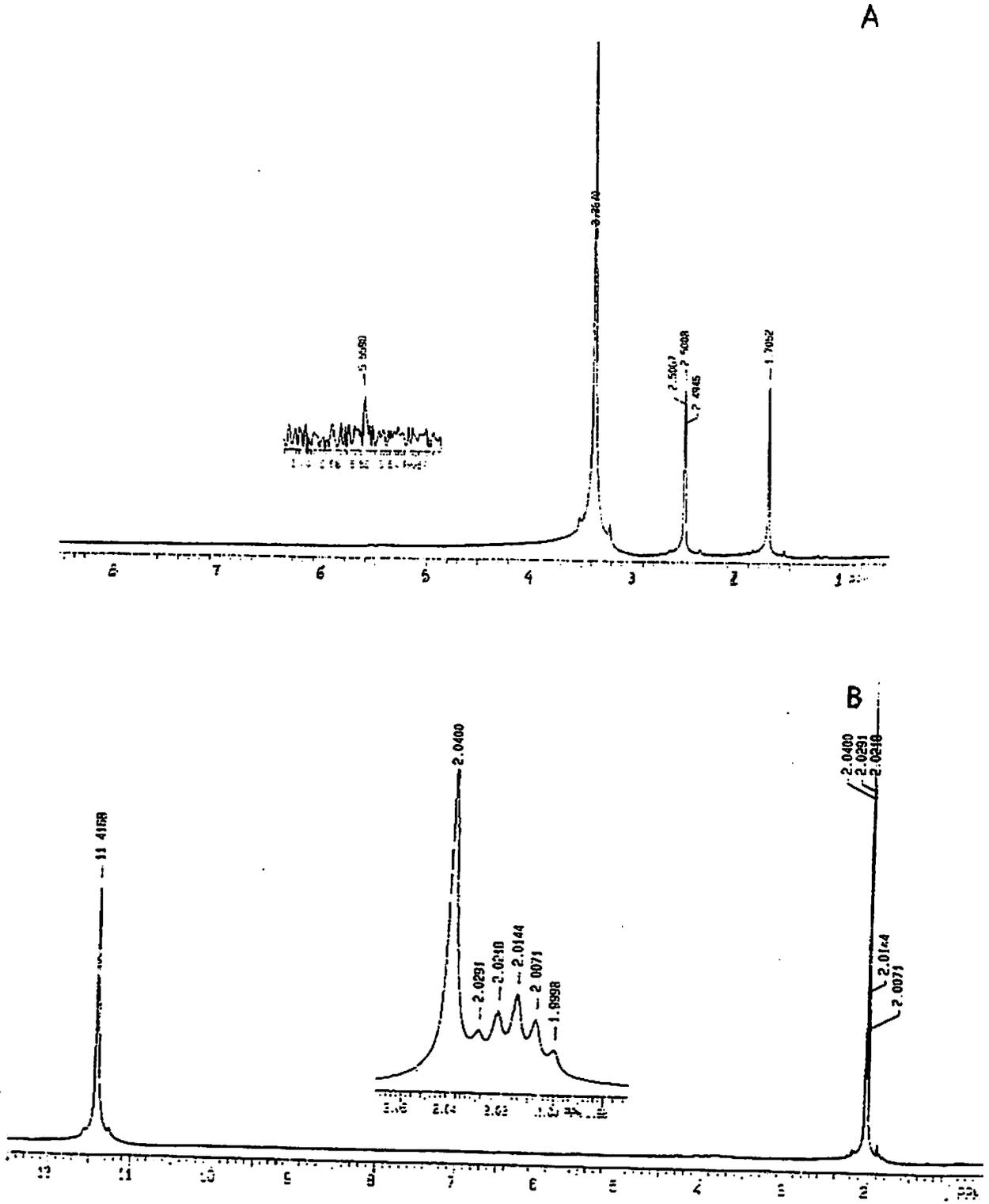


FIGURA 24. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de flavonóides em folha (A) e suspensão de células (B) de plantas de erva-baleeira.

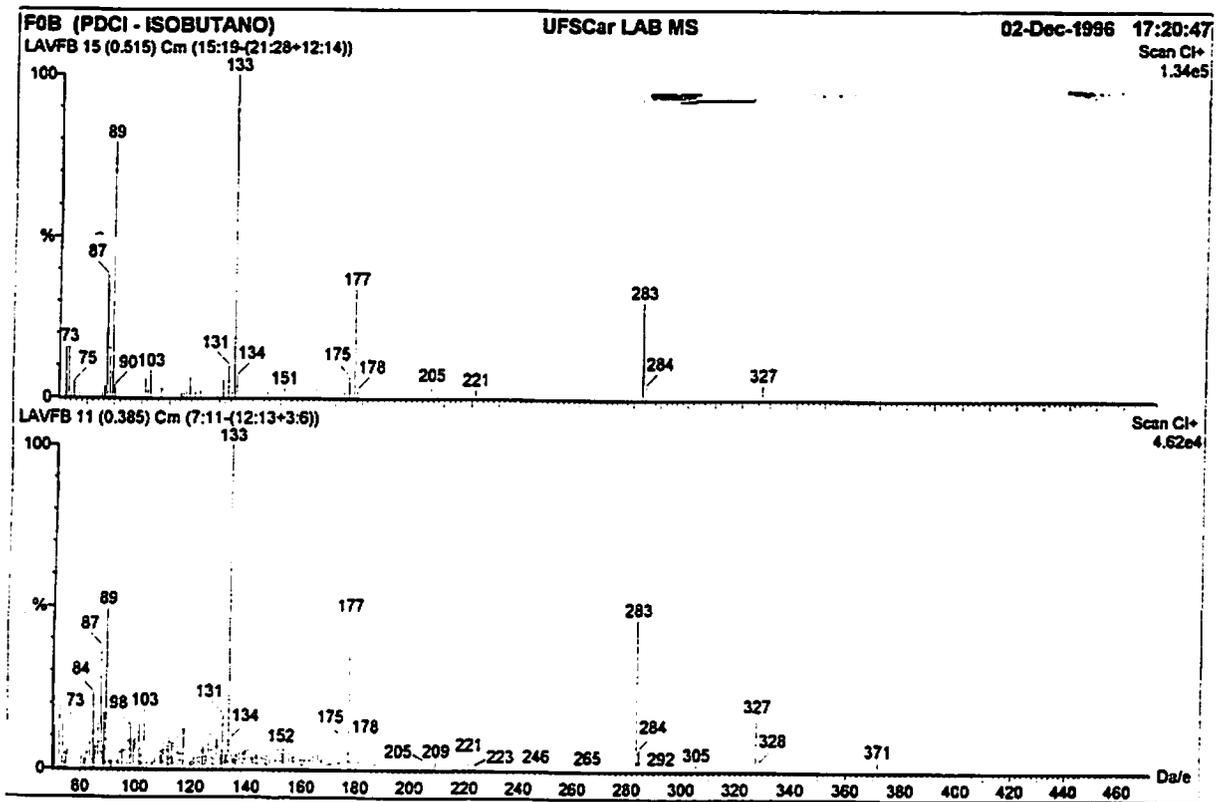


FIGURA 25. Espectrometria de Massa de flavonóides em folha e suspensão de células de plantas de erva-baleeira.

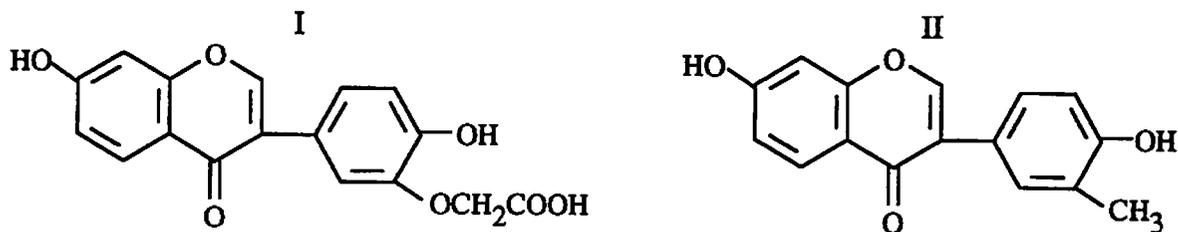


FIGURA 26. Estruturas moleculares dos compostos (I) 7,4'-diidroxí-5'-carboximetóxi isoflavona e (II) 7,4'-diidroxí-5'-metil isoflavona de erva-baleeira.

Os dados para o composto I são confirmados com base no simpleto observado em ambos os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  centrado aproximadamente em  $11,5 \delta$  que é característico do próton do grupo carboxílico. Entre  $2$  e  $4 \delta$  são observados simpletos, os quais são atribuídos aos prótons dos grupos hidroxila. No referido espectro, ainda pode ser observado um tripleto centrado aproximadamente entre  $1,8$  e  $1,9 \delta$ , característico dos prótons do grupo metilênico ligado ao anel aromático.

Nos espectros de I.V para folha como para células, observaram-se bandas características para as estruturas I e II. Tais espectros são bastante semelhantes entre si, apresentando sinais de absorção dos grupos mais característicos para estes tipos de compostos.

Uma absorção forte compreendida entre  $3000$  e  $3500 \text{ cm}^{-1}$  pode ser atribuída ao grupo carboxila ( $-\text{COOH}$ ), sobreposto com os grupos hidroxilas ( $-\text{OH}$ ) presentes. Esta banda apresenta-se como um sinal largo devido a ocorrência de formação de pontes de hidrogênio. Duas bandas fortes centradas aproximadamente, entre  $1650 - 1700 \text{ cm}^{-1}$  são atribuídas às carbonilas, as quais, ocorrem um pouco mais baixo em virtude de estarem conjugadas com os anéis aromáticos presentes nas estruturas.

As bandas mais importantes e que fornecem mais informações sobre a estrutura dos compostos aromáticos são encontrados na região de baixa frequência entre  $675$  e  $900\text{ cm}^{-1}$ . Estas bandas resultam de deformações angulares fora do plano das ligações C-H do anel (Colthup, Daly e Stepen, 1964; Bellamy, 1975 e Silverstein, Basslem e Morri, 1994).

Observam-se ainda, vibrações de esqueleto envolvendo deformação axial das ligações carbono-carbono dentro do anel nas regiões de  $1528$  a  $1600$  e  $1400 - 1500\text{ cm}^{-1}$ . As bandas do esqueleto frequentemente, aparecem como dubletes, dependendo dos substituintes do anel. Em torno de  $1000 - 1100\text{ cm}^{-1}$ , sinais característicos das deformações CO são encontrados.

Os dados inferidos estão de acordo com aqueles obtidos nos espectros de E.M (Figura 25). O pico que aparece em  $371\text{ g/mol}$  pode ser considerado como uma impureza. Os principais fragmentos observados estão representados nas Figuras 27 e 28.

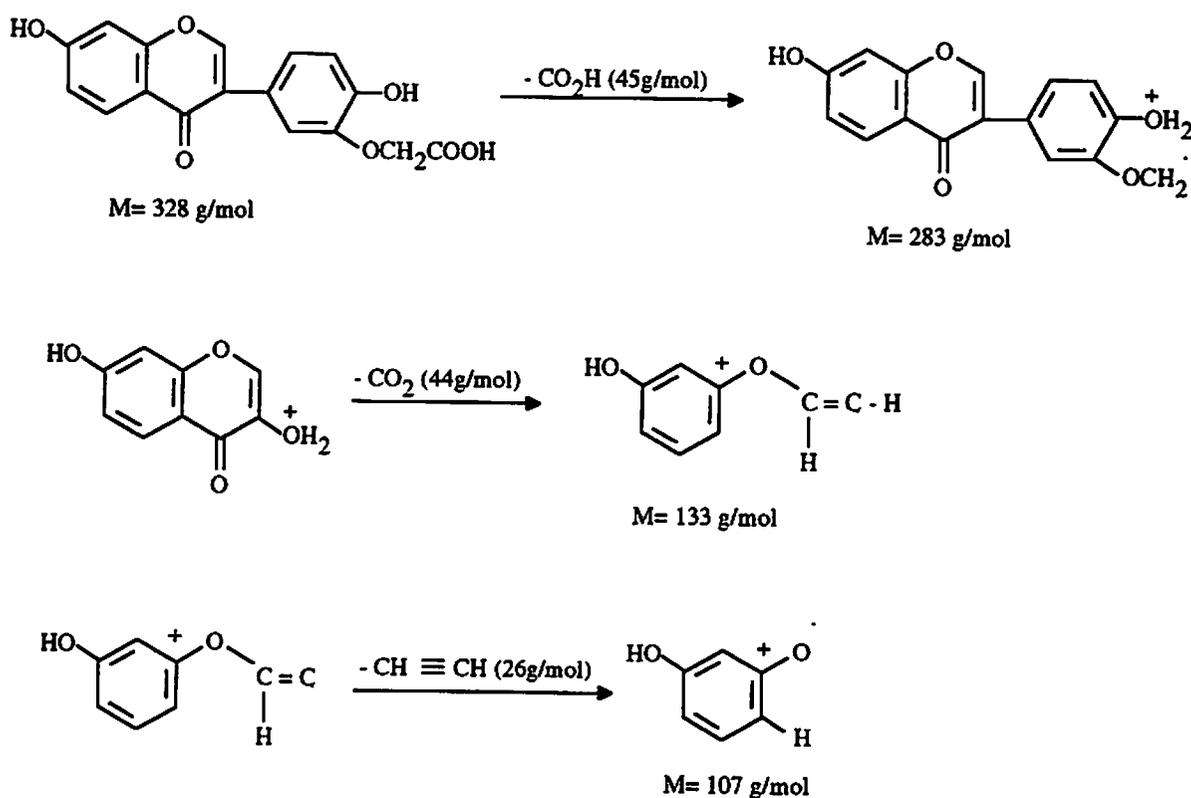


FIGURA 27 Fragmentos da estrutura do composto I

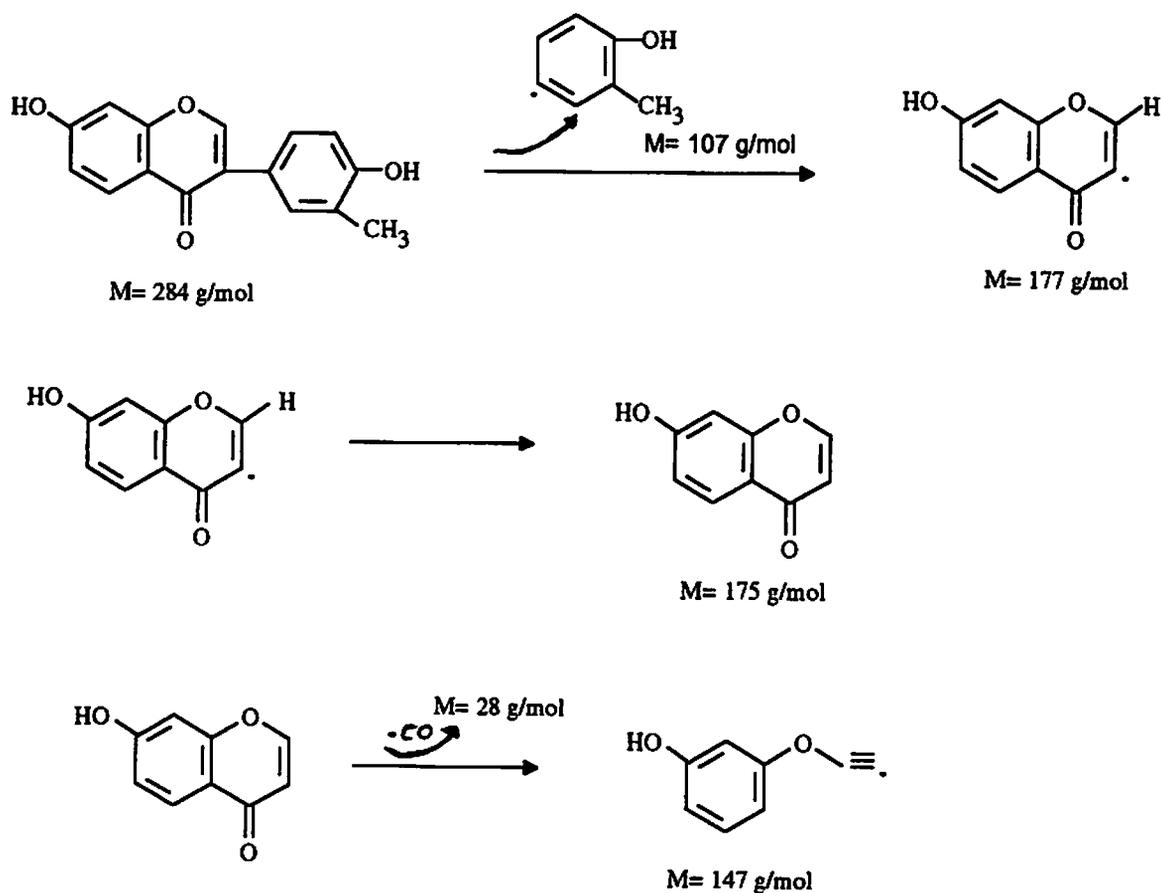


FIGURA 28. Fragmentos da estrutura do composto II

### 7.2.3..Conclusões

Os compostos identificados de extratos de folha e células de erva-baleeira são os flavonóides 7,4'-diidroxí-5'-carboximetóxi isoflavona e 7,4'- diidroxí-5'-metil isoflavona.

### 7.3..REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BELLAMY, L.J. **The infrared spectra of complex molecules**. 3.ed. Nova York: J. Wiley & Sons, 1975. v.2. 433p.

COLTHUP, N.B.; DALY,L.H.; STEPEN,E. **Introduction to infrared and Raman Spectroscopy**. Nova York: Academic Press. 1964. 511p.

- DI STASI, L.C. Química de produtos naturais: principais constituintes ativos. In: DI STASI, L.C. (ed.). **Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar.** São Paulo: UNESP, 1996. Cap.9, p.109-127.
- FERRI, P.H. Química de produtos naturais: métodos gerais. In: DI STASI (ed.). **Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar.** São Paulo: UNESP, 1996. Cap.10, p.129-156.
- HARBORNE, J.B. Phenolic compounds. In: HARBORNE, J.B. (ed.). **Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis.** Hong Kong: Chapman and Hall, 1984. Cap.2, p.37-99.
- MABRY, T.J.; MARKHAM, K.R.; THOMAS, M.B. The separation of flavonoids by column and thin layer chromatography. In: MABRY, T.J.; MARKHAM, K.R.; THOMAS, M.B. (eds.), **The systematic identification of flavonoids.** Berlin: Springer-Verlag, 1970a. Cap.2, p.16-22
- MABRY, T.J.; MARKHAM, K.R.; THOMAS, M.B. Reagents and procedure for the ultraviolet spectral analysis of flavonoids. In: MABRY, T.J.; MARKHAM, K.R.; THOMAS, M.B. (eds.), **The systematic identification of flavonoids.** Berlin: Springer-Verlag, 1970b. Cap.4, p.35-40.
- MABRY, T.J.; MARKHAM, K.R.; THOMAS, M.B. The two-dimensional paper chromatographic analysis of flavonoids. In: MABRY, T.J.; MARKHAM, K.R.; THOMAS, M.B. (eds.), **The systematic identification of flavonoids.** Berlin: Springer-Verlag, 1970c. Cap.1, p.3-15.
- MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M. de; CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E. Os princípios ativos. In: MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M. de; CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E. (eds.). **Plantas medicinais.** Viçosa: UFV, 1995. Cap.1, p.17-64.
- SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRIL, T.C. **Identificação espectrométrica de composto orgânicos.** 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1994. 387p.

## 8 CONSIDERAÇÕES GERAIS

As técnicas de propagação utilizadas nesse trabalho com a erva-baleeira demonstraram que o enraizamento de microestacas foi a alternativa que apresentou a maior eficiência quanto a formação de material para multiplicação. A taxa de multiplicação através da técnica *in vitro* não foi eficiente o bastante para ser recomendada. Através do enraizamento de microestacas foram obtidos um percentual de enraizamento que permite a sua recomendação como alternativa para a obtenção de material com características similares.

A cultura de tecidos através da suspensão de células foi a técnica mais eficiente na obtenção do princípio ativo de erva-baleeira quando comparada com o processo de obtenção através de folhas.

Na formação e desenvolvimento de plântulas de erva-baleeira a nutrição do substrato através da solução nutritiva completa de sais do meio MS pode ser considerada como eficiente, demonstrando a necessidade que a planta possui por nutrientes para o seu completo desenvolvimento.

Na separação do extrato para identificação do composto a amostra de células apresentou um maior rendimento que a amostra de folha, o que a caracteriza como melhor fonte para extração do princípio ativo.