

49016

MFN 34265

SUZAN KELLY VILELA BERTOLUCCI

**MICROPROPAGAÇÃO, CALOGÊNESE E ABORDAGEM
FITOQUÍMICA IN VIVO E IN VITRO DE *Tournefortia cf paniculata*
Cham.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Agroquímica e Agrobioquímica, para obtenção do título de "Mestre".

Orientador

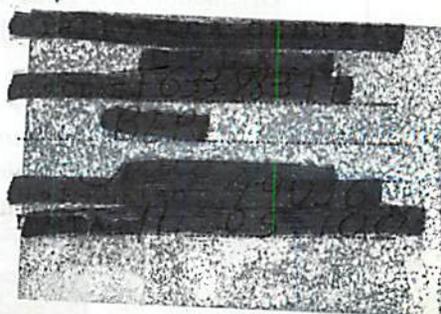
Prof. PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

2000

041.400

UFLA



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

Bertolucci, Suzan Kelly Vilela

Micropropagação, calogênese e abordagem fitoquímica In vivo e In vitro de
Tournefortia cf paniculata Cham / Suzan Kelly Vilela Bertolucci. -- Lavras :
UFLA, 1999.

79 p. : il.

Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Marmelinho. 2. *Tournefortia cf paniculata* Cham. 3. Planta medicinal. 4.
Micropropagação. 5. Calogênese. 6. Abordagem fitoquímica. I. Universidade
Federal de Lavras. II. Título.

CDD-633.88377

-634.143

SUZAN KELLY VILELA BERTOLUCCI

**MICROPROPAGAÇÃO, CALOGÊNESE E ABORDAGEM
FITOQUÍMICA IN VIVO E IN VITRO DE *Tournefortia cf paniculata*
Cham.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Agroquímica e Agrobioquímica, para obtenção do título de “Mestre”

APROVADA em 29 de fevereiro de 2000

Prof. Dra. Maria das Graças Cardoso UFLA

Prof. Dr. Custódio Donizete dos Santos UFLA

Prof. Ms. Manuel Losada Gavilanes UFLA

Prof. PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

Aos meus pais Antônio e Regina

OFEREÇO

Ao meu marido Érik e meus filhos Rayana e Luan

DEDICO

***“ A sabedoria é resplandecente,
não murcha, mostra-se facilmente
para aqueles que a amam. Ela se
deixa encontrar por aqueles que a
buscam.”***

(Sab 6,12-13)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo.

A Nossa Senhora Aparecida.

Aos meus pais e meus irmãos pelo apoio e incentivo.

Ao meu marido Érik e meus filhos Rayana e Luan, pela compreensão, amor, carinho e grande incentivo na minha formação profissional.

À D. Lila pelo amor, carinho e cuidados com meus filhos.

Aos meus queridos tios Nivaldo e Rosani e a meus primos Juliano e Caroline, que me acolheram e me deram a oportunidade de estudar.

Ao Professor e amigo José Eduardo Brasil Pereira Pinto, pela orientação, amizade, apoio e constante incentivo.

À Professora e grande amiga Maria das Graças Cardoso pela oportunidade, confiança, amizade, apoio, orientação, estímulo constante ao nosso desenvolvimento pessoal e profissional, enfim, por tudo.

Ao Professor Custódio Donizete dos Santos pela oportunidade, incentivo, amizade e participação na Banca Examinadora.

Ao Professor Manuel Losada Gavilanes, pelo apoio científico, sugestões e participação na Banca Examinadora.

Ao Professor Mario Guerreiro pela colaboração e apoio científico.

Ao Professor David Lee Nelson (UFMG) pelo apoio científico.

À Dra. Neusa Taroda (UNESP-São José do Rio Preto) pela atenção e identificação do material botânico.

Aos colegas de pós-graduação: Allan Kardec C. Dias, Renato Fráguas Carvalho, Joerley Moreira e, especialmente a Rozane Aparecida Silva, pela amizade, companheirismo e colaboração.

Aos colegas do Laboratório de Química Orgânica: Luciano, Andrea, Cleuza, Fábio, Juliano, Gustavo, Anailda, Fred, Éllen, Ana Paula, Maria Carolina, Miriam, Carla, Vanisse e Ana Cláudia, pela amizade e agradável convívio.

À aluna de iniciação científica Juliana Érika de Carvalho Teixeira e ao técnico do Laboratório de Cultura de Tecidos Evaldo Arantes pela amizade e auxílio constante.

Ao amigo Edson José Artiaga de Santiago, pesquisador da EMBRAPA/Belém e pós-graduando da UFLA, pelas fotografias deste trabalho e auxílio nos momentos de dificuldades.

Aos colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos: Valéria, Janaína, Flávia, Marvin, Solange, Marly e Heráclito, pela amizade e agradável convívio.

Ao Luiz, funcionário do Horto de Plantas Mediciniais, pela atenção sempre dispensada.

Aos funcionários da Biblioteca Central da UFLA pelos bons serviços prestados, em especial ao Marcinho.

Ao ex-Professor José Abílio, D. Apolônia e Geny pela doação de material botânico utilizado neste trabalho.

Ao Professor Evaristo Mauro de Castro pelo apoio, atenção e auxílio científico.

A todos os professores que enriqueceram o meu saber.

Aos professores e funcionários do Departamento de Química pelos auxílios constantes.

À Universidade Federal de Lavras, através do Departamentos de Química e Agricultura, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

À CAPES e ao CNPq, pelas bolsas e auxílios financeiros concedidos durante a realização deste trabalho.

Ao Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química da UNICAMP, através do Professor Mario Guerreiro, pela realização das análises de CHN e CG/MS.

Ao Alexandre e Marcelo, funcionários da SINC do Brasil, pela realização das análises de CG/MS.

Enfim, a todos que, no anonimato, contribuíram de maneira direta ou indireta na realização deste trabalho, nossos sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	i
RESUMO.....	ii
ABSTRACT.....	iii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Aspectos taxonômicos da planta em estudo.....	4
2.2 Cultura de tecidos.....	7
2.3 Micropropagação.....	8
2.4 Micropropagação em plantas lenhosas com citocininas.....	9
2.5 Meio de cultura e reguladores de crescimento.....	10
2.6 Produção de metabólitos secundários in vivo.....	12
2.7 Produção de metabólitos secundários in vitro - Generalidades.....	13
2.8 Produção de compostos secundários em cultura de calos.....	15
2.9 Compostos do metabolismo secundário das plantas e sua utilização como medicamentos.....	16
2.10 Abordagens sobre análise e identificação fitoquímica.....	18
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 Testes experimentais para propagação in vitro de <i>Tournefortia cf paniculata</i> Cham.....	23
3.1.1 Efeito da concentração dos sais do meio MS no estabelecimento de explante primário de <i>Tournefortia cf paniculata</i>	23
3.1.2 Efeito do meio de cultura no estabelecimento do explante secundário de <i>Tournefortia cf paniculata</i>	24
3.1.3 Efeito da concentração de BAP na cultura de segmentos nodais de <i>Tournefortia cf paniculata</i>	25
3.1.4 Alongamento e enraizamento das brotações em <i>Tournefortia cf</i>	

<i>paniculata</i>	26
3.1.5 Aclimação de <i>Tournefortia cf paniculata</i>	26
3.2 Calogênese em folhas de <i>Tournefortia cf paniculata</i>	27
3.2.1 Efeito de diferentes concentrações de BAP e condições de luminosidade na indução de calos de <i>Tournefortia cf paniculata</i>	27
3.2.2 Efeito de diferentes concentrações de TDZ na indução de calos de <i>Tournefortia cf paniculata</i>	28
3.2.3 Estabelecimento da curva de crescimento de calos de <i>Tournefortia cf paniculata</i>	29
3.3 Abordagem fitoquímica.....	29
3.3.1 Abordagem fitoquímica a partir da planta in vivo de <i>Tournefortia cf paniculata</i>	30
3.3.2 Abordagem fitoquímica de componentes voláteis a partir da planta in vivo de <i>Tournefortia cf paniculata</i>	32
3.3.3 Abordagem fitoquímica a partir da plântula in vitro de <i>Tournefortia cf paniculata</i>	32
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1 Testes experimentais para propagação in vitro de <i>Tournefortia cf paniculata</i>	33
4.1.1 Efeito da concentração dos sais do meio MS no estabelecimento de explante primário de <i>Tournefortia cf paniculata</i>	33
4.1.2 Efeito do meio de cultura no estabelecimento do explante secundário de <i>Tournefortia cf paniculata</i>	38
4.1.3 Efeito da concentração de BAP na cultura de segmentos nodais de <i>Tournefortia cf paniculata</i>	43
4.1.4 Alongamento e enraizamento das brotações em <i>Tournefortia cf paniculata</i>	46
4.1.5 Aclimação de <i>Tournefortia cf paniculata</i>	48

4.2 Calogênese em folhas de <i>Tournefortia cf paniculata</i>	50
4.2.1 Efeito de diferentes concentrações de BAP e condições de luminosidade na indução de calos de <i>Tournefortia cf paniculata</i>	50
4.2.2 Efeito de diferentes concentrações de TDZ na indução de calos de <i>Tournefortia cf paniculata</i>	52
4.2.3 Estabelecimento da curva de crescimento de calos de <i>Tournefortia cf paniculata</i>	54
4.3 Abordagem fitoquímica.....	58
4.3.1 Abordagem fitoquímica a partir da planta in vivo de <i>Tournefortia cf paniculata</i>	58
4.3.2 Abordagem fitoquímica de componentes voláteis a partir da planta in vivo de <i>Tournefortia cf paniculata</i>	61
4.3.3 Abordagem fitoquímica a partir da plântula in vitro de <i>Tournefortia cf paniculata</i>	63
5 CONCLUSÕES.....	65
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..	67
ANEXOS.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS

2,4-D: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

AG₃: Ácido giberélico

AIB: Ácido indolil-3-butírico

ANA: Ácido α -naftalenoacético

BAP: 6-benzilaminopurina

C: carbono

CHN: Carbono, hidrogênio, nitrogênio

CCD: Cromatografia em camada delgada

CG/EM: Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa

CLC: Cromatografia líquida em coluna

EM: Espectrometria de massa

H: Hidrogênio

IV: Infravermelho

KIN: 6-furfurilaminopurina (cinetina)

N₂: Nitrogênio

MS $\frac{3}{4}$: $\frac{3}{4}$ dos sais do meio básico de Murashige e Skoog (1962)

MS/2: metade dos sais do meio básico de Murashige e Skoog (1962)

MS: Meio básico de Murashige e Skoog (1962)

O: Oxigênio

Rf: Fator de retenção obtido em CCD

RMN ¹³C: Ressonância magnética nuclear de carbono 13

RMN ¹H: Ressonância magnética nuclear protônica

TDZ: Tiazuron

WPM: Meio básico de Lloyd e McCown (1980)

RESUMO

BERTOLUCCI, S.K.V. **Micropropagação, calogênese e abordagem fitoquímica in vivo e in vitro de *Tournefortia cf paniculata* Cham.** Lavras:UFLA,2000.73p.(Dissertação-Mestrado em Agroquímica e Agrobioquímica)

Tournefortia cf paniculata Cham. pertencente à família Boraginaceae, é conhecida como marmelinho. A decocção de suas folhas é utilizada como potente diurético e antibiótico das vias urinárias. O presente trabalho teve como objetivos a avaliação das condições biotecnológicas para micropropagação e indução de calos, bem como abordar aspectos fitoquímicos. Para o estabelecimento in vitro de explantes primários, foram utilizados segmentos nodais, os quais foram estudados utilizando-se os meios MS; MS/2 e WPM. Indução de multibrotações foram obtidas em meio WPM suplementado com diferentes concentrações de BAP. O alongamento e enraizamento destes brotos individualizados foram obtidos em meio básico WPM ausente de regulador de crescimento, os quais foram posteriormente aclimatados em casa de vegetação, com sombrite a 50%. Para a indução de calos, foram utilizados segmentos foliares oriundos de cultivo in vivo e in vitro, inoculados em meio MS, suplementados com diferentes combinações de ANA/BAP e ANA/TDZ. Observou-se que o melhor meio de manutenção foi o MS suplementado com 0,5 mg.L⁻¹ de ANA e 1,0 mg.L⁻¹ de TDZ, para o qual foi estabelecida a curva de crescimento. A abordagem fitoquímica foi realizada com folhas provenientes da planta in vivo e in vitro. Nesta, os resíduos obtidos por cromatografia líquida em coluna preenchida com sílica gel 70-230 mesh da Merck®, monitorados com cromatografia de camada delgada preparativa em sílica gel 60G da Merck®, foram recristalizados, e através de análises espectrométricas, observou-se a presença de 3 compostos majoritários, os quais apresentaram pesos moleculares similares (199,0 g/mol) e os respectivos grupos orgânicos: carbonila (C=O); amino (-NH); hidroxila (-OH); metilas, metilênicos e metínicos (-CH). Obteve-se, também através da técnica de "arraste a vapor", o óleo essencial proveniente das folhas, que pelas análises espectrométricas, inferimos tratar-se de um éster conjugado.

Comitê Orientador : José Eduardo Brasil Pereira Pinto - UFLA (Orientador);
Co-orientadores: Maria das Graças Cardoso, Custódio Donizete dos Santos - UFLA.

ABSTRACT

BERTOLUCCI, S.K.V. **Micropropagation, callusgenesis and in vivo and in vitro phytochemical approach of *Tournefortia cf paniculata* Cham.**.Lavras:UFLA,2000.73p.(Dissertation-Master in Agrochemistry and Agrobiobioquetry)

Tournefortia cf paniculata Cham., belongs the family Boraginaceae. It is known as the " marmelinho", the decoction of its leaves is used as a potent diuretic and antibiotic by way of urinary. The present work as aimed to evaluate the biotechnological conditions for micropropagation and induction of calluses, as well to approach phytochemical aspects. For the in vitro establishment of primary explants were utilized nodal segments, which were studied by using the MS; MS/2 e WPM media. Induction of multipleshoots were obtained in WPM medium supplemented with different concentrations of BAP. Both lengthenning and rooting of these individualized shoots were obtained in a basic WPM medium absent of growth regulator which were afterwards acclimated in greenhouse with 50% semi-shade. For callus induction, were utilized leaf segments from in vivo e in vitro cultivation inoculated in MS medium supplemented with different combinations of NAA/BAP and NAA/TDZ. It was observed that the best maintenance medium was the MS supplemented with 0,5 mg.L⁻¹ of NAA and 1,0 mg.L⁻¹ of TDZ, from which the growth curve was established. The phytochemical approach was accomplished with leaves coming from the in vivo plants and in vitro plantlets. The residues obtained by column liquid chromatografy filled with silica gel 70-230 mesh of Merck®, monitored by preparative thin-layer chromatografy in silica gel 60G da Merck®, were recrystallized and through spectrometric analyses. The presence of three majoritary compounds was noticed, which presented similar molecular weights (199,0 g/mol) and the respective organic groups: carbonile (C=O); amino (-NH); hydroxile (-OH); methile, methylenic and methynic (-CH). Also, through the "steam-grag" technique, the essential oil coming from the leaves was obtained, that by the spectrophotometric analyses, we inferred to be a conjugated ester.

Guidance committee: José Eduardo Brasil Pereira Pinto -UFLA (Major Professor);
Co-advisers: Maria das Graças Cardoso, Custódio Donizete dos Santos, -
UFLA.

1 INTRODUÇÃO

Após uma época de admiráveis progressos científicos, em que a terapêutica (ciência da cura) depositou todas as suas esperanças exclusivamente no campo das drogas sintéticas, ressurgiu o interesse pelos remédios simples que a natureza oferece, principalmente àqueles com aplicação na assistência médica primária à saúde. Deste modo, a Organização Mundial da Saúde (OMS), ao promover uma maior atenção às formas terapêuticas da medicina tradicional, veio em 1991, na 44ª Assembléia Mundial da Saúde, a adotar a resolução 44.34, através da qual incentiva os Estados membros da Organização a promoverem o emprego de “remédios tradicionais inofensivos, eficazes e cientificamente válidos” (Valtueña, 1998). Constantemente, pelas reuniões da OMS, em que epígrafes como “Saúde para todos no ano 2000” e “Salvem as plantas - elas salvam vidas”, tem se recomendado o estudo e uso de plantas medicinais regionais como principal redutor de custos no atendimento às pessoas nos serviços públicos de saúde, principalmente nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, onde existe ainda um grande número de pessoas de baixa renda (Matos, 1997).

Mundialmente, o cenário é favorável às pesquisas com produtos naturais. No mercado farmacêutico mundial, que movimenta US\$ 150 bilhões ao ano, é crescente o uso de medicamentos derivados de plantas (Robbers, Speedie e Tyler, 1997). Segundo Martins (1999), o Brasil tem desperdiçado negócios que movimentam US\$ 60 bilhões por ano com o mercado das plantas medicinais. Para reforçar a importância desta área estratégica, a vincristina e a vimblastina, substâncias naturais extraídas da *Catharanthus roseus* G. Don (Apocynaceae), que combatem certos tipos de câncer e reduziram em 70% o índice de mortalidade infantil por leucemia, são patenteadas há cerca de 30 anos pelo laboratório norte-americano Eli Lilly e rendem, anualmente, US\$ 100 milhões à

empresa (Robbers, Speedie e Tyler, 1997; Martins, 1999). Segundo Klayman (1985), o governo chinês investiu alguns milhões de dólares em recursos humanos e financeiros no desenvolvimento biotecnológico para produção em larga escala de artemisinina, uma droga extraída da *Artemisia annua* L. (Asteraceae), com potente efeito anti-malárico. A artemisinina é uma lactona sesquiterpênica cuja síntese em escala industrial é economicamente inviável.

A canalização de recursos públicos para a pesquisa de fitoterápicos é fundamental, uma vez que a utilização das plantas medicinais está diretamente atrelada à questão econômica como atividade agrícola; como a atividade industrial, em que a síntese química total só é viável, economicamente, quando o composto de interesse possui uma estrutura simples, com nenhum ou poucos centros quirais, o que não é o caso de muitos produtos naturais. Ainda, à questão social, por ter um menor custo de obtenção; à questão iatrogênica, devido ao largo espectro dos efeitos colaterais tóxicos dos sintéticos e mesmo a resistência de algumas doenças ao tratamento com os sintéticos; e, por fim, à questão da soberania nacional, pela exploração e conhecimento dos seus recursos naturais (Mors, 1982; Klayman, 1985 e Pletsch, 1998).

Deste modo, não adianta possuímos o país mais rico em biodiversidade no mundo se não forem feitos investimentos nas pesquisas com nossos recursos. Para se ter uma idéia, precisamente 22,1% das publicações de novos produtos naturais listados nos últimos 11 anos pelo Chemical Abstracts, são de origem japonesa, e neste mesmo período o Brasil contribuiu com apenas 1,6%. Esta discrepância constitui um aparente paradoxo, pois o Japão possui em torno de 3.000 espécies de plantas superiores contra 55.000 conhecidas no Brasil (Gottlieb e Borin, 1997). Sendo assim, a necessidade do estudo destas plantas que vêm sendo utilizadas na terapêutica é urgente. Esta fantástica medicina que utiliza complexas estruturas químicas inimitáveis, como terpenos, sesquiterpenos, alcalóides, resinas, taninos, gomas, mucilagens e os glicósidos

cardiotônicos, saponínicos, flavonoídicos e antraquinônicos, é uma perspectiva no desenvolvimento da farmacoterapia e a esperança da cura de doenças hoje incuráveis.

Neste contexto, a química de produtos naturais, a cultura de tecidos, a farmacologia, a botânica e as demais áreas afins representam conhecimentos de domínio importantes em favor da autonomia nacional para desenvolver tecnologia de ponta na produção de fármacos. Particularmente, o cultivo *in vitro* de tecidos e células vegetais, em conjunto com o estudo fitoquímico, constituem dois sistemas adequados para investigação das vias biossintéticas, permitindo a otimização da produção *in vitro* de metabólitos secundários, sendo uma alternativa promissora para o suprimento constante e homogêneo de material vegetal, independente de mudanças climáticas ou condições do solo (Tabata, 1977; Misawa, Hayashi e Takayana, 1985; Crocomo e Melo, 1991). Além disso, quando se oferta ao mercado plantas medicinais, aromáticas e condimentares, o maior interesse das indústrias transformadoras é adquirir um produto com maior concentração possível de princípios ativos. Diferentemente, ocorre no caso de outras culturas, das quais se espera maior quantidade de biomassa verde ou seca, grãos, etc., não havendo preocupação fundamental com sua composição química (Correa Junior, 1994).

Acreditando em todo este potencial, o presente trabalho teve como objetivos a avaliação das condições biotecnológicas para micropropagação e indução de calos em *Tournefortia cf paniculata* Cham., uma planta popularmente considerada medicinal, bem como abordar aspectos fitoquímicos da planta *in vivo* e *in vitro*. Esta é vulgarmente conhecida como marmelinho. Segundo a medicina caseira a decocção de suas folhas é utilizada como potente diurético e antibiótico das vias urinárias, sendo também empregada por pacientes com litíase renal, responsável por muitas urgências hospitalares.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos taxonômicos da espécie em estudo

Tournefortia cf paniculata Cham. é uma espécie vegetal pertencente à família Boraginaceae (Figura 1). Esta família compreende aproximadamente 100 gêneros, com mais de 2000 espécies distribuídas em todo o planeta. São plantas herbáceas ou lenhosas, arbustivas ou arbóreas, com folhas de disposição alterna (raramente opostas) e inteiras, com flores pequenas (Joly, 1993).



FIGURA 1 Hábito da planta marmelinho - *Tournefortia cf paniculata* Cham..

Segundo Pio Correa (1978), a espécie em estudo é encontrada em Minas Gerais, e é popularmente conhecida como marmelinho, sendo empregada na medicina caseira como diurético. Entretanto, estudos de Vitta (1992) relatam que esta é largamente distribuída, sendo encontrada desde o Amazonas e Pará até o Rio Grande do Sul, ocorrendo também na Bolívia, Paraguai e nordeste da Argentina. Este autor estudou a família Boraginaceae, citando a ocorrência de *Tournefortia paniculata* Cham., coletada em Santana do Riacho, Rodovia Belo Horizonte-Conceição do Mato Dentro, Km 133, Morro de Calcário, que apresentou as seguintes características botânicas: arbusto, com folhas elípticas e ápice agudo, limbo medindo 10-13,5 cm de comprimento e 6,5-9 cm de largura. A floração ocorre entre os meses de novembro a março, com frutificação mais ou menos concomitante, sendo as flores esverdeadas e os frutos alaranjados, com quatro manchas negras. Em relação à espécie em estudo, observamos que não coincidem a coloração dos frutos e das flores, pois nesta os frutos são verdes quando imaturos e branco esverdeados quando maduros, e as flores são brancas, ao contrário de esverdeadas (Figura 2).

De acordo com a classificação de Engler in: (Joly, 1970), *Tournefortia* tem a seguinte posição sistemática:

Divisão: Angiospermae

Classe: Dicotyledoneae

Subclasse: Gamopetalae

Ordem: Tubiflorae

Família: Boraginaceae

Genêro: *Tournefortia*

A classificação da espécie em estudo foi efetuada pela professora Dra. Neusa Taroda¹, do Departamento de Botânica da Universidade Estadual de São

¹ Segundo a Dra. Neusa Taroda não existem estudos agrônômicos e fitoquímicos com o gênero *Tournefortia* no Brasil.

A classificação da espécie em estudo foi efetuada pela professora Dra. Neusa Taroda¹, do Departamento de Botânica da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), Campus São José do Rio Preto, e colaboração do professor Manuel Losada Gavilanes, do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Exsicatas estão depositadas no Herbário SJRP (UNESP-São José do Rio Preto) sob registro nº 20601 e no Herbário ESAL do Departamento de Biologia da UFLA sob registro nº 15818.



FIGURA 2 Flores da planta de *Tournefortia* cf *paniculata*.

¹ Segundo a Dra. Neusa Taroda não existem estudos agrônômicos e fitoquímicos com o gênero *Tournefortia* no Brasil.

2.2 Cultura de tecidos

Cultura de tecidos vegetais é a técnica de crescimento *in vitro* de células, tecidos e órgãos vegetais em um meio nutriente na ausência de microorganismos. Pode ser usada como uma ferramenta para o estudo do metabolismo, fisiologia, desenvolvimento de plantas e reprodução de exemplares com propriedades desejáveis, tais como resistência a pragas e acúmulo de substâncias ativas de interesse (Scragg, 1994 e França, 1999). Entre outras aplicações da cultura de tecidos, ressaltamos a de ser um instrumento de pesquisa valioso no estudo das plantas, minimizando e controlando variáveis relacionadas com fatores ambientais.

A cultura de tecidos tem sido vista como uma possível fonte de produtos naturais, e um vasto número de revisões tem sido escrito discutindo o seu potencial. Muitas destas revisões têm se concentrado em substâncias farmacêuticas com alto valor comercial. Neste sentido, esta técnica tem sido utilizada para o melhoramento de linhagens, com maiores teores de substâncias farmacêuticas (Seabrook, 1980; Caldas, 1986 e Scragg, 1994).

Um aspecto importante, estudado nas culturas de tecidos, é a questão da diferenciação de células relacionada com a produção dos compostos secundários. Sabe-se que nas plantas *in vivo* os compostos secundários são sintetizados em tecidos e órgãos específicos. O que determina este comportamento característico de cada planta é o seu genoma. Portanto, é necessário elucidar o mecanismo e os fatores que influenciam a expressão dos genes relacionados com a síntese de enzimas específicas, envolvidas na regulação de vias biossintéticas dos compostos secundários (Alferman e Petersen, 1995).

2.3 Micropropagação

A micropropagação é definida como uma cultura asséptica que envolve procedimentos de manipulação de órgãos, tecidos e células de plantas que produzem uma população de plântulas através de processos de propagação sexual ou propagação vegetativa (Krikorian, Kelly e Smith, 1988). Os métodos básicos de multiplicação de plantas in vitro são quatro: desenvolvimento de brotações axilares, segmento nodal, brotações adventícias e embriogênese somática. Particularmente, o segmento nodal é um método associado com uma baixa taxa de variações genéticas, desde que a formação de calos seja evitada. Um ou mais segmentos podem ser excisados e enraizados in vitro ou diretamente no solo para a produção completa da planta (Kurtz, Hartman e Chu, 1991).

A regeneração de plântulas in vitro através da cultura de gemas é freqüentemente utilizada para obtenção de clones, que mantêm todas as características da planta-matriz. Esta é uma técnica especialmente vantajosa para a preservação de genótipos produtores de compostos medicinais (França, 1999). Sudha, Krishnan e Pushpangadan (1998) estabeleceram um protocolo para a micropropagação de *Holostemma annulare* (Roxb.) K. Schum. (Asclepiadaceae), através de cultura de gemas nos quais os nodos basais foram os explantes mais eficientes na micropropagação. Esta espécie é um raro arbusto medicinal, com raízes tuberosas, as quais são utilizadas na Índia para curar diabetes, gonorréia, tosse e dores estomacais. A propagação convencional via semente ou estaquia caulinar ou de raiz é inviável por uma série de razões. A planta é dormente durante o verão, e brotações jovens, na época que se desenvolvem, são comidas por herbívoros e insetos devido ao látex adocicado. É impraticável utilizar estaquias de raízes para propagação porque elas têm um alto valor para medicina Ayurvedica. A falta de sistemas de propagação convencional tem resultado na escassez da planta devido à sua demanda. Como

se pode ver, a micropropagação pode ser aplicada às espécies vegetais produtoras de princípios ativos úteis e ser explorada economicamente, da mesma forma que a micropropagação de espécies florestais, frutíferas, leguminosas e ornamentais.

Além das vantagens das plantas regeneradas a partir de tecidos que contêm meristemas serem geneticamente idênticas à planta original, uma outra vantagem importante da micropropagação consiste na habilidade de clonar rapidamente genótipos susceptíveis a doenças altamente infecciosas que tem baixo sortimento, independente da sazonalidade (Bajaj, Furmanova e Olszowska, 1988; Cassells, 1991). Isto é interessante, do ponto de vista farmacêutico, visando a produção dos mesmos compostos naturais.

2.4 Micropropagação de plantas lenhosas com citocininas

Duas estratégias básicas têm sido usadas para micropropagação de espécies lenhosas, regeneração de calos e multiplicação de brotos (Einset, 1991). Infelizmente, a regeneração de calos frequentemente resulta em alta porcentagem de variações somaclonais, fazendo com que esta estratégia seja questionável na multiplicação clonal de plantas lenhosas superiores em larga escala. Por outro lado, estudos de Zimmerman et al. (1986), citados por Einset (1991), mostram que a multiplicação de brotos é um método confiável que pode ser usado para a produção de numerosos clones, verdadeiramente iguais.

Em princípio, a micropropagação através da multiplicação de brotos utiliza o efeito da citocinina na regulação do crescimento dos brotos sob condições controladas *in vitro* (Skoog e Miller, 1957). Por uma elevação artificial da concentração da citocinina endógena nos brotos, um crescimento contínuo é mantido e a dominância apical é superada. O resultado é a produção de numerosas ramificações caulinares, as quais são subdivididas no final, e cada uma submetida a condições *in vitro*. Os brotos individuais podem ser usados

para uma série subsequente de multiplicação dos brotos ou para a produção de plântulas após enraizamento (Murashige, 1974; Lloyd e McCown, 1980, citado por Einset, 1991).

Pesquisas visando o desenvolvimento desta tecnologia têm focalizado esta importante classe de fitormônios por terem estes um papel crucial na micropropagação de múltiplas brotações com as plantas lenhosas (Einset, 1991).

2.5 Meio de cultura e reguladores de crescimento

Os meios nutritivos utilizados para a cultura de células, tecidos e órgãos de plantas fornecem as substâncias essenciais para o crescimento e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro* (Caldas, Haridasan e Ferreira., 1990). Todos os nutrientes do meio de cultura devem estar em concentrações otimizadas de forma a assegurar o crescimento dos explantes. As exigências em termos de meio de cultura são variáveis com a espécie, cultivar e explante utilizado, devendo ser experimentalmente definidas para cada caso em particular. Muitos trabalhos têm sido desenvolvidos procurando estabelecer as melhores condições de meio de cultura para a produção de compostos secundários (Pinto e Pasqual, 1990).

Diversas formulações de meio têm sido utilizadas na cultura *in vitro*, as quais se diferem basicamente na concentração dos sais empregados. Segundo Tisserat (1985), o meio básico MS desenvolvido por Murashige e Skoog (1962), é o mais empregado em cultura de tecidos. No caso de plantas lenhosas, o meio básico WPM (Lloyd e McCown, 1980), do inglês "Wood Plant Medium", é bastante utilizado. Uma das diferenças marcantes entre estes dois meios de cultura está na concentração de nitrogênio (N_2). Enquanto o meio MS possui 40 mM de N_2 como NO_3^- e 20 mM de N_2 como NH_4^+ , o meio WPM compõe-se de 10 mM de N_2 como NO_3^- e 5 mM de N_2 como NH_4^+ , apesar de apresentarem praticamente a mesma relação entre NO_3^-/NH_4^+ . Esta consideração quanto o total

de N_2 no meio e a razão de íons NO_3^-/NH_4^+ é importante quando procura-se um meio adequado para as diferentes espécies de plantas e tipo de cultura, pois o conteúdo total de N_2 no meio constitui fator crucial para o crescimento e morfogênese (George, 1993a).

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

As auxinas têm uma larga variedade de efeitos no crescimento, dentre estes promovem alongamento celular e crescimento em extensão em caules e raízes. As maiores propriedades das citocininas são a estimulação da divisão celular e liberação de gemas laterais da dominância imposta pela auxina da gema apical. É comum o balanceamento de auxinas e citocininas no processo de diferenciação e acúmulo de metabólitos nos estudos de plantas, e quando usadas juntamente, estimulam a divisão celular e controlam a morfogênese (Modesto e Siqueira, 1981; George, 1993b e Gaspar et al., 1996). No caso das giberelinas, o efeito mais notável é a promoção do alongamento de caules de plantas intactas (Modesto e Siqueira, 1981).

Na cultura de calos, um suprimento exógeno de reguladores de crescimento é freqüentemente necessário na indução em um explante qualquer. O requerimento exógeno de regulador (tipo, concentração e razão auxina/citocinina) depende fortemente do genótipo e conteúdo endógeno de hormônio. Estes requerimentos podem ser de três tipos principais: apenas a

auxina ou a citocinina serem necessários ou ambas serem exigidas. Habitualmente, após repetidas subculturas os calos podem perder esta exigência (Pierik, 1987).

2.6 Produção de metabólitos secundários in vivo

Os vegetais são seres que realizam fotossíntese pois possuem clorofila, que permite transformar a energia luminosa em energia química, e com isto biossintetizar muitas substâncias. As plantas costumam ter aspectos em comum no seu metabolismo, sintetizando substâncias que são vitais a todos os vegetais, como a celulose, o amido, os lipídeos e aminoácidos. Este é o conhecido metabolismo primário dos vegetais. Além deste, existe uma outra atividade de síntese biológica que varia de espécie para espécie e que produz substâncias particulares, cuja função ainda não foi definida na maioria dos casos. Este é o metabolismo secundário dos vegetais e que produz os chamados princípios ativos naturais (Botsaris, 1995).

A produção de metabólitos secundários é o resultado de complexas interações entre biossíntese, transporte, estocagem e degradação. Embora qualquer tecido ou célula vegetal tenha a capacidade de biossintetizar metabólitos secundários, parece que isso ocorre somente em alguns tecidos ou mesmo em células especiais, em função do grau de diferenciação e desenvolvimento dos mesmos, dificultando a extração, isolamento e purificação destas substâncias. Em alguns casos, a produção pode estar restrita a um estágio específico do desenvolvimento do vegetal, sendo fortemente influenciada por fatores ambientais, como clima, luz, latitude, presença de pragas, e nutricionais, composição química do solo, umidade (Balandrin e Klocke, 1988; Wink, 1990 e Costa, 1994b).

2.7 Produção de metabólitos secundários in vitro - Generalidades

O interesse crescente por produtos naturais, principalmente de utilização medicinal, e as dificuldades conhecidas para assegurar o fornecimento constante da matéria prima, assim como a necessidade de preservação das espécies, tem estimulado a investigação do potencial da culturas de tecidos e células in vitro como alternativa para produção de metabólitos secundários.

Um exemplo desta batalha é a produção do taxol em cultura de tecidos e células vegetais. Esta substância é extraída das cascas do tronco de árvores de *Taxus brevifolia* Nutt. (Taxaceae) em quantidades que variam de 40 a 165 mg.kg⁻¹ de cascas secas, de modo que são necessárias três árvores para produção de 1 grama de taxol. O crescimento vagaroso, a baixa estatura, a casca fina, a escassa distribuição desta espécie e o fato da remoção da casca resultar na morte da planta tem intensificado esforços para encontrar alternativas de produção desta rara droga. Recentemente, dois grupos de pesquisadores conseguiram, quase que simultaneamente, realizar a síntese total do taxol; entretanto, a aplicação industrial está longe de ser viável por causa das inúmeras etapas de reação e do alto custo de produção. Um método alternativo de obtenção do taxol e que tem sido utilizado industrialmente é a síntese parcial a partir de substâncias análogas extraídas de outras espécies de *Taxus* que são mais abundantes. Vários progressos na cultura de células de *T. brevifolia* têm sido alcançados e acredita-se que em pouco tempo iniciar-se-á a produção comercial, substituindo o processo extrativo das espécies de teixo (Corrêa, 1995; Pletsch, 1998 e Stöckigt et al., 1995). Na tabela 1 estão relacionados alguns exemplos de produtos naturais formados através de técnicas de cultura de tecidos e células vegetais.

Entre as vantagens da produção de compostos secundários in vitro, podemos citar a maior facilidade na purificação dos extratos, devido à ausência de quantidades significativas dos pigmentos, resultando em redução dos custos

de produção (Balandrin e Klocke, 1988). Entretanto, tem-se observado que as culturas de tecidos produzem quantidades muito pequenas do composto desejado. Segundo Alfermann e Petersen (1995), cafeína; dopa; ajmalicina e serpentina são os únicos compostos usados em farmácia que são produzidos em grandes quantidades pelas culturas de células.

Consideráveis avanços têm sido alcançados na produção de compostos secundários em cultura de tecidos. A exploração da capacidade biossintética de várias culturas celulares, por alguns grupos de cientistas, tem ocorrido em vários países nas últimas décadas. Os resultados obtidos nem sempre têm sido satisfatórios; entretanto, novos conhecimentos são relatados para uma variedade de substâncias utilizadas na indústria farmacêutica, cosmética e de alimentos (Tabata, 1977).

TABELA 1 Alguns exemplos de metabólitos secundários produzidos por técnicas de cultura de tecidos de acordo com Stöckigt et al. (1995) e Pletsch (1998).

Espécie Vegetal	Produto Natural	Técnica de Cultura
<i>Lithospermum erythrorhizon</i> Sieb. E Zucc (Boraginaceae)	chiconina	suspensão de células
<i>Atropa belladonna</i> L. (Solanaceae)	atropina	suspensão de células
<i>Capsicum frutescens</i> L. (Solanaceae)	caipsaicina	suspensão de células
<i>Panax ginseng</i> C.A. Mey (Araliaceae)	ginsenosídeos	suspensão de células
<i>Papaver somniferum</i> L. (Papaveraceae)	morfina	cultura de brotos foliares
<i>Digitalis lanata</i> Ehrhart (Scrophulariaceae)	digoxina	cultura de brotos foliares
<i>Datura innoxia</i> Mill. (Solanaceae)	escopolamina	cultura de brotos foliares
<i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Labiatae)	ácido rosmarínico	suspensão de células
<i>Cinchona ledgeriana</i> (Howard) Moens et Trimen (Rubiaceae)	quinina	cultura de brotos foliares

2.8 Produção de compostos secundários em cultura de calos

A cultura de calos consiste na indução e manutenção de células não diferenciadas do parênquima, constituindo-se uma massa de células com um baixo nível de organização, obtido pela inoculação de partes da planta para um meio nutriente adequado, freqüentemente contendo combinações apropriadas de reguladores de crescimento (Collin e Dix, 1990 e Brown, 1990).

Em geral, utiliza-se o calo como material de partida para a produção e o acúmulo de metabólitos secundários *in vitro*; entretanto, vários são os fatores que interferem no acúmulo e rendimento destes metabólitos. A seleção do explante consiste em um destes. A influência do explante no rendimento de escopolamina em *Anisodus acutangulus* C.Y. Wu e C. Chen (Solanaceae) em cultura de calos foi demonstrada por Guang-Zhi (1989), o rendimento percentual em peso seco do alcalóide foi de 0,165; 0,770; 0,590 e 0,091, respectivamente para calos de raiz, caule, folha e antera. A composição do meio de cultura, incluindo a concentração e tipo de regulador de crescimento, são outros fatores. Pesquisas de Ishikura e Teramoto (1983), citado por Ishikura (1989), mostraram que o crescimento de calos a partir de brotações jovens de *Cryptomeria japonica* Don. (Taxodiaceae) ocorreu melhor em meio MS suplementado com 1 mg.L^{-1} de 2,4-D e $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de KIN do que no meio WS (Wolter Skoog, 1966, citado por Ishikura, 1989) em estudos anteriores, realizados por Isakawa (1975), citado por Ishikura (1989). Dentre os reguladores de crescimento estudados estão o 2,4-D ($0,5\text{-}2,0 \text{ mg.L}^{-1}$), ANA ($1\text{-}2 \text{ mg.L}^{-1}$) e IBA ($1\text{-}2 \text{ mg.L}^{-1}$).

As condições físicas também influenciam na produção. O efeito da iluminação no conteúdo percentual de alcalóides totais quanto ao peso seco, em cultura de calos de raízes de *Datura innoxia*, foi estudado por Petri e Bajaj (1989). Na raiz, utilizando a concentração de 1 mg.L^{-1} de KIN e 1 mg.L^{-1} de 2,4-D, o rendimento de alcalóides totais quanto ao peso seco foi de 0,125% para o cultivo no escuro e 0,259% para o cultivo na luz. Repetindo a mesma

concentração de KIN e aumentando a concentração de 2,4-D para 5 mg.L⁻¹ o rendimento foi de 0,334% e 0,264% para escuro e luz, respectivamente. Este resultado foi semelhante quanto ao rendimento no órgão intacto (0,330%).

O período de cultura é outro fator interferente. Comparando-se o rendimento de alcalóides totais contidos em calos obtidos de raízes de *Datura innoxia*, observou-se que com 2 semanas houve um rendimento 0,169%; com 4 semanas, 0,104%; com 6 semanas, 0,043%, e com 8 semanas houve 0,125%, porcentagem relacionada com o peso seco (Petri e Bajaj, 1989).

Deste modo, os estudos de produção de substâncias do metabolismo secundário das plantas mantidas no estado não organizado são muito complexos. Estas substâncias são conseqüências de processos bioquímicos altamente regulados e inter-relacionados, ou seja é resultado da integração dos processos de biossíntese, degradação, transporte e acumulação do produto. Para que um determinado composto seja acumulado, é preciso que os tecidos que o produzem contenham os precursores metabólicos destes compostos, as enzimas adequadas para convertê-los no produto e as estruturas nas quais o mesmo ficará armazenado (Pletsch, 1998).

2.9 Compostos do metabolismo secundário das plantas e sua utilização como medicamentos

As plantas são a maior fonte de medicamentos, flavorizantes, fragâncias, e vários produtos farmacêuticos e industriais. Farnsworth et al. (1985) e Balandrin e Klocke (1988) citam exemplos de metabólitos secundários medicinais obtidos de vegetais e economicamente importantes, como: acetildigoxina (cardiotônico), aescina (antiinflamatório); atropina (anticolinérgico); emetina (amebicida), pilocarpina (parassimpaticomimético), quinina (antimalárico), reserpina (anti-hipertensivo), efedrina

(simpaticomimético), ácido salicílico (precursor do ácido acetilsalicílico) e outros.

Entre os diversos exemplos de substâncias oriundas de plantas e de grande importância, podemos mencionar a forskolina, obtida de *Coleus barbatus* Benth. (Labiatae), que apresenta promissores efeitos contra hipertensão, glaucoma, asma e certos tumores, a artemisina, presente em *Artemisia annua* Pall. (Asteraceae), que exerce potente atividade antimalárica, e o diterpeno anticancerígeno taxol, isolado de plantas do gênero *Taxus* (Cechinel Filho e Yunes, 1998).

A seleção de plantas com antecedentes etnofarmacológicos de uso para um certo tipo de atividade biológica é uma das formas mais racionais no estudo de produtos naturais, a fim de que possam ser utilizadas para melhorar o arsenal terapêutico disponível, como medicamentos de baixo custo e ampliação da capacidade de atendimento médico-farmacêutico em saúde pública. Segundo Farnsworth (1985), 74% das 119 drogas desenvolvidas a partir de plantas foram obtidas por estudos científicos idealizados para avaliar os usos de plantas bem conhecidas na medicina popular. Em contraste, outras abordagens, tais como triagens fitoquímicas, *screening* biológico massivo ou de plantas coletadas ao acaso, não se provaram muito úteis para a descoberta de novas drogas.

Um bom exemplo da utilização das informações populares neste tipo de pesquisa é encontrado na história dos princípios ativos de *Claviceps purpurea* Tul.. Estes princípios, conhecidos como alcalóides do ergot, foram descobertos a partir das observações sobre medicina popular, ainda no século XVII. Naquela época, as parteiras usavam, para acelerar o trabalho de parto, uma mistura de extratos vegetais cuja eficácia pôde ser comprovada, posteriormente, através de ensaios experimentais. Após vários ensaios, os pesquisadores descobriram que o efeito ocitócito era conferido pelas espigas do centeio parasitadas pelo fungo *Claviceps purpurea*. A partir destas observações, os químicos conseguiram

isolar do esporão-do-centeio, como é popularmente conhecido, vários alcalóides, que ainda hoje encontram emprego na medicina, especialmente ergonovina, em obstetria, e a ergotomina, como vasoconstritor, útil no tratamento da enxaqueca (Korolkovas e Burckhalter, 1982).

2.10 Abordagens sobre análise e identificação fitoquímica

Todas as gerações conheceram a utilidade das plantas para curar doenças, conservar a saúde e promover o bem-estar. A existência de vários antibióticos, antiespasmódicos, analgésicos, corticóides, diuréticos, agentes cardioativos, agroquímicos, substâncias corantes, aromatizantes e edulcorantes, dentre outras tantas, são aplicações tecnológicas derivadas de pesquisas em produtos naturais.

A pesquisa fitoquímica, particularmente, tem por objetivos determinar os constituintes químicos das espécies vegetais. A preparação do extrato bruto é o ponto de partida para identificação dos constituintes naturais. Existem várias metodologias descritas para a preparação de extratos vegetais visando o isolamento de seus constituintes químicos. Em análises fitoquímicas, quando não se conhece previamente o conteúdo do material a ser analisado, costuma-se submeter o material vegetal a sucessivas extrações com solventes de polaridade crescente, conseguindo-se, assim, uma extração fracionada em que as diferentes frações contêm compostos de polaridade também crescente. Na Tabela 2 seguem alguns exemplos de solventes, em ordem crescente de polaridade, mais utilizados, e os respectivos grupos de metabólitos, majoritariamente encontrados nos diferentes extratos.

Após a extração são realizadas técnicas de fracionamento dos extratos vegetais com vistas ao isolamento, das quais se obtêm extratos semi-puros, frações e, finalmente, os compostos puros (Cechinel Filho e Yunes, 1998). Os métodos cromatográficos são os procedimentos de separação mais amplamente

utilizados atualmente. Embora técnicas cromatográficas mais sofisticadas e que proporcionam um processo de separação mais rápido e eficiente, já tenham sido desenvolvidas, a cromatografia líquida em coluna aberta (CLC), com sílica gel como fase estacionária, a princípio é mais empregada por ser tecnicamente simples e não exigir instrumentação esmerada (Costa, 1982 e Falkenberg, Santos e Simões, 1999). Entretanto, é indispensável conhecer as características da amostra em cromatografia de camada delgada (CCD) antes de se usar a cromatografia em coluna (Shriner et al., 1983).

Cada substância sólida, cristalina e pura está definida pelo seu ponto de fusão. Assim determina-se esta constante física com o fim de avaliar o estado de pureza das substâncias isoladas. Por vezes, estas decompõem-se antes de fundirem, porém, tal transformação se realizar sempre à mesma temperatura, pode utilizar-se o mesmo modo como método de reconhecimento. O comportamento da substância em CCD e a análise elementar de CHN também são métodos de determinação da pureza (Costa, 1982 e Matos, 1988).

TABELA 2 Tipos de substâncias mais encontradas na extração por solventes, em ordem crescente de polaridade, mais utilizados de acordo com Falkenberg, Santos e Simões (1999).

Solventes	Tipos de substâncias preferencialmente extraídas
Éter de petróleo, hexano	lipídeos, ceras, pigmentos, furanocumarinas;
Diclorometano, clorofórmio	bases livres de alcalóides, antraquinonas livres, glicosídeos cardiotônicos;
Acetato de etila, butanol	flavonóides; cumarinas simples;
Etanol, metanol	heterosídeos em geral;
Misturas hidroalcoólicas, água	Saponinas, taninos.

Uma vez estando purificadas as amostras, a determinação da estrutura molecular é obtida através do uso em conjunto de técnicas espectrais, tais como ultravioleta (UV); infravermelho (IV); espectrometria de massa (EM), que pode ser acoplada a um cromatógrafo gasoso (CG/MS); ressonância magnética protônica (RMN ^1H) e de carbono 13 (RMN ^{13}C), têm permitido propor com segurança a estrutura molecular das substâncias naturais. Além disso, análises de determinação da atividade ótica e difração de raios-X, quando possível, possibilitam avaliar a estereoquímica real destas moléculas (Cechinel Filho e Yunes, 1998; Falkenberg, Santos e Simões, 1999).

A espectroscopia no ultravioleta (UV) e no visível estão dentro das técnicas mais fáceis usadas na determinação de estruturas orgânicas e são determinadas apenas pelo índice de refração e medidas de rotação óptica. A absorção molecular na região do ultravioleta e do visível do espectro depende da estrutura eletrônica da molécula. Na prática, ela é limitada, na maior parte, aos sistemas conjugados (Silverstein, Bassler e Morrill, 1994 e Lambert et al., 1998).

O infravermelho (IV) é um método rápido e simples que obtém informações preliminares da identidade das moléculas orgânicas através da posição e tamanhos relativos das bandas de absorções. O espectro é projetado pela porcentagem de radiação IV, que passa através de uma amostra (% de transmissão), versus o comprimento de onda da radiação (Lambert et al., 1998).

O espectrômetro de massa (MS) examina o resultado dos elétrons como um espectro de íons separados na base da razão massa/carga (m/z), através do bombardeio das moléculas na fase vapor com um feixe de elétrons de alta energia. A principal contribuição do espectrômetro de massa é determinar o peso molecular (Silverstein, Bassler e Morrill, 1994 e Lambert et al., 1998).

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) fornece informações sobre tipos, números e conectividade dos átomos em particular. A RMN pode ser aplicada em moléculas em qualquer estado de matéria. A

determinação de quase todas as moléculas orgânicas e biológicas começa com esta técnica, a qual é a ferramenta química mais direta para identificar a estrutura, tanto de compostos puros quanto de misturas de compostos. O processo envolve várias representações experimentais para deduzir a estrutura molecular a partir de propriedades magnéticas dos núcleos atômicos e dos elétrons circunvizinhos (Lambert et al., 1998).

Com o desenvolvimento das técnicas espectroscópicas, tem-se conseguido elucidar rapidamente estruturas moleculares complexas de constituintes naturais a até pouco tempo difíceis de serem identificadas (Cechinel Filho e Yunes, 1998). Vários autores citam a identificação de compostos puros utilizando-se as diversas técnicas de identificação aplicadas para cada caso em especial. A alantoína foi identificada em *Cordia ecalyculata* Vell. (Boraginaceae) pelo uso de análise elementar de CHN, IV e RMN ^1H e ^{13}C (Saito, Oliveira e Alvarenga, 1985). Compostos identificados em folhas e células de *Cordia verbenaceae* L. (Boraginaceae) foram caracterizados como sendo flavonóides 7,4'-diidroxí-5'-carboximetoxiisoflavona e 7,4'-diidroxí-5'-metilisoflavona, através de espectrometria no IV, UV, EM e RMN ^1H (Lameira, 1997). A elucidação do flavonóide trixol em folhas frescas de *Trixis vauthhieri* DC (Asteraceae), que mostrou resultados tripanossomicidas eficientes em ensaios in vitro, foi possível pela utilização de técnicas modernas de RMN e de EM (Ribeiro et al., 1999). As naftoquinonas (lapachol, desidro- α -lapachina e α -lapachona) foram quantificadas no extrato etanólico das raízes de *Zeyheria montana* Mart. (Bignoniaceae), sendo suas estruturas confirmadas comparando-se os dados das espectrometrias no IV, RMN ^1H e ^{13}C e de massas com dados de literatura (Jácome et al., 1999).

Com relação ao isolamento dos constituintes voláteis, são conhecidas conhecem-se numerosas técnicas baseadas nos métodos de destilação aquosa. Os óleos essenciais, como misturas de compostos químicos vegetais voláteis

imiscíveis com a água são, na sua grande maioria, extraídos pelo processo de arraste a vapor d'água. A hidrodestilação e destilação com solventes constituem outras técnicas, também empregadas na extração de compostos voláteis. A técnica por arraste a vapor consiste em rasgar o material vegetal fresco e colocar em um recipiente através do qual se faz passar uma corrente de vapor d'água, com ou sem pressão (Craveiro et al., 1981; Matos, 1988 e Costa, 1994a). Este é o mais utilizado por apresentar extrema simplicidade, baixo custo, bom rendimento e facilidade de execução (Pereira, 1999).

Charles e Simon (1990), citados por Oliveira (1997), avaliaram três métodos de extração de óleo: extração por solventes, arraste a vapor e hidrodestilação, utilizando as espécies aromáticas *Ocimum kilimandscharicum* Guerke (Lamiaceae) e *O. micranthum*. Willd. (Lamiaceae). Verificaram que a quantidade obtida por arraste a vapor foi alta em comparação com outros métodos. Utilizando amostras de folhas secas de 10, 15, 20 e 75 g, os referidos autores mostraram que, para estas espécies, a quantidade da amostra não influencia o teor de óleo essencial. Baseados nestes dados, afirmam que pequenas quantidades de material podem ser usadas, sendo possível extrapolar as produções, e que a habilidade de coletar pequenas quantidades de material pode ter valor para pesquisas quando o material vegetal é limitado.

Hoje, as técnicas de análise dos óleos essenciais são, provavelmente, as mais avançadas e rápidas, permitindo, pelo uso do cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massa, a separação e identificação de constituintes presentes em pequeníssimas quantidades de óleo essencial (Matos, 1988); entretanto, dependendo do caso, outras técnicas espectrais são necessárias.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Agricultura e no Laboratório de Química Orgânica do Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras, no município de Lavras, Estado de Minas Gerais, Brasil.

3.1 Testes experimentais para a propagação *in vitro* de *Tournefortia cf paniculata*

3.1.1 Efeito da concentração dos sais do meio MS no estabelecimento de explante primário de *Tournefortia cf paniculata*

Segmentos nodais jovens derivados de planta cultivada por estaquia em casa de vegetação com idade de 5 meses, foram utilizados como fonte de explante primário. Estes foram lavados em água corrente por 30 minutos e em seguida desinfestados com uma solução de Q-Boa[®] a 40%, tendo uma concentração de hipoclorito de sódio, variando entre 1 a 1,5%, acrescido de 3 gotas de Tween 20, sob agitação mecânica por 10 minutos. Posteriormente, em câmara de fluxo laminar horizontal, estes foram lavados quatro vezes com água destilada autoclavada.

Os explantes foram excisados em tamanhos de 15 a 20 mm e inoculados verticalmente no meio de cultura, na proporção de um segmento por tubo. Quatro tratamentos (T) foram utilizados: T1= MS + 100 mg.L⁻¹ de ácido cítrico + 1,0 mg.L⁻¹ de AG₃ + 0,5 mg.L⁻¹ de ANA; T2 = MS + 100 mg.L⁻¹ de ácido cítrico; T3 = MS/2 + 100 mg.L⁻¹ de ácido cítrico; T4=MS/2 + 100 mg.L⁻¹ de ácido cítrico + 1,0 mg.L⁻¹ de AG₃ + 0,5 mg.L⁻¹ de ANA. Todos solidificados com 0,6% de ágar.

O material foi cultivado em tubos de ensaio de 25 x 150 mm tampados com tampa plástica e vedados com parafilme. Em cada tubo, utilizaram-se 15

mL de meio de cultura. Estes tiveram o seu pH ajustado a $5,7 \pm 1$ antes de serem autoclavados a 120°C , durante 20 minutos. Os explantes foram cultivados em fotoperíodo de 16/8 horas luz/escuro, sob intensidade luminosa de $25 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, à temperatura de $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

A avaliação foi realizada aos 28 dias quanto as variáveis de respostas: desenvolvimento de brotações, tamanho médio das brotações, formação de calos, matéria fresca, desenvolvimento foliar, formação de raízes e oxidação. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC), com 7 repetições por tratamento.

3.1.2 Efeito do meio de cultura no estabelecimento do explante secundário de *Tournefortia cf paniculata*

Segmentos nodais provenientes de plântulas de *Tournefortia cf paniculata* pré-estabelecidas in vitro, em meio WPM sem regulador de crescimento, com idade de 45 dias, foram excisados em câmara de fluxo laminar horizontal, em tamanhos entre 15 a 20 mm. Estes foram inoculados verticalmente na proporção de um segmento por tubo, em 15 mL de meio de cultura básico MS completo e diluído a metade dos sais dos macro e micronutrientes e meio de cultura básico WPM solidificado com 0,6% de ágar.

O material foi cultivado em tubos de ensaio de 25 x 150 mm, tampados com tampa plástica e vedados com parafilme. Em cada tubo utilizaram-se, aproximadamente, 15 mL de meio de cultura. Estes tiveram o seu pH ajustados a $5,7 \pm 1$ antes de serem autoclavados a 120°C , durante 20 minutos. Os explantes foram cultivados em fotoperíodo de 16/8 horas luz/escuro, sob intensidade luminosa de $25 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, à temperatura de $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

As variáveis de respostas avaliadas foram: número da brotação; tamanho da brotação; número de raiz; tamanho de raiz; matéria fresca da brotação; matéria seca da brotação; matéria fresca da raiz e matéria seca da raiz. O

delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC), perfazendo 16 repetições, que foram submetidos a 3 tratamentos, avaliados em duas épocas, aos 30 e 45 dias após a instalação do experimento. Foram aplicadas às médias entre os tratamentos o teste de Tukey.

3.1.3 Efeito da concentração de BAP na cultura de segmentos nodais de *Tournefortia cf paniculata*

Segmentos nodais provenientes de plântulas de *Tournefortia cf paniculata*, pré-estabelecidas in vitro, em meio WPM sem regulador de crescimento, com idade de 60 dias, foram excisados em câmara de fluxo laminar horizontal, em tamanhos aproximados de 15 a 20 mm, e inoculados verticalmente na proporção de um segmento por tubo, em meio básico WPM solidificado com 0,6% de ágar e suplementado com 0; 0,5 e 1,0 mg.L⁻¹ de BAP.

O material foi cultivado em tubos de ensaio de 25 x 150 mm, tampados com tampa plástica e vedados com parafilme. Em cada tubo utilizaram-se 15 mL de meio de cultura. Estes tiveram o seu pH ajustados a $5,7 \pm 1$, antes de serem autoclavados a 120°C, durante 20 minutos. Os explantes foram cultivados em fotoperíodo de 16/8 horas luz/escuro, sob intensidade luminosa de 25 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, à temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$.

Neste experimento foi feita uma avaliação aos 55 dias. Para as variáveis, número e tamanho da brotação, foram utilizadas 18 repetições por tratamento, sendo que 6 amostras de cada tratamento foram tomadas para avaliação da matéria seca da parte aérea. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, sendo as médias ajustadas por equações de regressão polinomial.

3.1.4 Alongamento e enraizamento das brotações em *Tournefortia cf paniculata*

A partir dos resultados do experimento anterior, individualizaram-se as rosetas obtidas pelos efeitos da citocinina (BAP) nos segmentos nodais de *Tournefortia cf paniculata*. Estas foram inoculadas em meio básico WPM solidificado com 0,6% de ágar, sob as mesmas condições de cultivo estabelecidas nos demais experimentos.

Neste ensaio, tivemos um tratamento em que foram utilizados explantes correspondentes aos tratamentos WPM+0,5 mg.L⁻¹ de BAP e WPM+1,0 mg.L⁻¹ de BAP do experimento anterior, perfazendo 50 repetições por concentração de BAP. O parâmetro avaliado foi apenas a formação completa da plântula.

3.1.5 Aclimação de *Tournefortia cf paniculata*

Plântulas micropropagadas a partir de segmentos nodais de *Tournefortia cf paniculata*, em meio WPM ausente de regulador de crescimento com idade de 55 dias, foram transferidas da condição *in vitro* para *ex vitro*. A aclimação foi realizada na casa de vegetação do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, onde as plântulas foram transferidas para copos plásticos com capacidade de 100 mL, contendo o substrato comercial (Plantimax[®]). Após 30 dias, as mudas foram transplantadas para vasos plásticos de 5 litros contendo o mesmo substrato. A irrigação foi feita pelo sistema de nebulização intermitente. A manutenção do nível de luz na casa de vegetação foi feita com sombrite a 50%. A avaliação foi realizada aos 30 e 150 dias, quanto a sobrevivência da planta.

3.2 Calogênese em folhas de *Tournefortia cf paniculata*

3.2.1 Efeito de diferentes concentrações de BAP e condições de luminosidade na indução de calos de *Tournefortia cf paniculata*

Folhas jovens provenientes da planta adulta cultivada em horta caseira, no município de Lavras, Minas Gerais, foram utilizadas como fonte de explante primário para indução de calos em *Tournefortia cf paniculata*. A planta fornecedora do material foi pulverizada, 4 dias antes da inoculação, com uma solução de 2 g.L⁻¹ de fungicida comercial Benlate®.

As folhas jovens foram selecionadas e lavadas em água corrente por 30 minutos, sendo, em seguida, desinfestadas com uma solução de Q-Boa® a 40%, acrescido de 3 gotas de Tween 20, sob agitação magnética por 10 minutos. Em câmara de fluxo laminar horizontal, estas foram lavadas por 5 vezes com água destilada autoclavada. As folhas foram excisadas com área aproximada de 100 a 150 mm², permanecendo parte da nervura central e parte do limbo, e inoculadas em meio básico MS suplementado com 0,5 mg.L⁻¹ de ANA+1,0 mg.L⁻¹ de BAP e com 0,5 mg.L⁻¹ de ANA+2,0 mg.L⁻¹ de BAP. Os tratamentos foram submetidos a duas condições de luminosidade, uma sob condições de fotoperíodo de 16/8 horas luz/escuro, sob intensidade luminosa de 25 μmol.m⁻².s⁻¹, à temperatura de 26 ± 1°C, e outra na ausência de luz, sob as mesmas condições de temperatura.

O meio de cultura foi solidificado com ágar a 0,6% e seu pH ajustado em 5,7 ± 1, antes de ser autoclavado a 120°C, por 20 minutos. O material foi cultivado em tubos de ensaio de 25 x 150 mm, tampados com tampa plástica e vedados com parafilme. Em cada tubo, sob a forma inclinada, foram utilizados 15 mL de meio de cultura.

Os explantes foram avaliados aos 40 dias. Os parâmetros avaliados foram presença de calos, tamanho do calos, cor do calos, presença de reações de

oxidação e presença de raízes. Para avaliação do parâmetro tamanho do calos, foram considerados P=pequeno (< 0,5 cm); M=médio (0,5 a 1,0 cm) e G=grande (> 1,0 cm).

Os calos do tratamento no escuro foram mantidos nos mesmos meios de indução, sendo repicados em intervalos de 27 a 30 dias. Na quarta subcultura, os calos do MS+0,5 mg.L⁻¹ de ANA+1,0 mg.L⁻¹ de BAP que apresentaram os mesmos aspectos das subculturas anteriores foram divididos em dois tratamentos MS+0,5 mg.L⁻¹ de ANA+0,5 mg.L⁻¹ de BAP e MS+0,5 mg.L⁻¹ de ANA+1,0 mg.L⁻¹ de BAP. Estes foram avaliados aos 28 dias.

3.2.2 Efeito de diferentes concentrações de TDZ na indução de calos de *Tournefortia cf paniculata*

Neste teste, as folhas foram obtidas a partir de plântulas estabelecidas in vitro em meio WPM. Estas foram excisadas em área aproximada de 100 a 150 mm², permanecendo parte da nervura central e parte do limbo, e inoculadas em meio básico MS suplementado com 0,5 mg.L⁻¹ de ANA+1,0 mg.L⁻¹ de TDZ (T1) e com 0,5 mg.L⁻¹ de ANA+2,0 mg.L⁻¹ de TDZ (T2).

O meio de cultura foi solidificado com ágar a 0,6% e seu pH ajustado em $5,7 \pm 1$, antes de ser autoclavado a 120°C, por 20 minutos. O material foi cultivado em tubos de ensaio de 25 x 150 mm, tampados com tampa plástica e vedados com parafilme. Em cada tubo, sob a forma inclinada, foram utilizados 15 mL de meio de cultura. Os parâmetros de indução avaliados aos 40 dias foram presença de calos, tamanho do calos, coloração, presença de reações de oxidação e presença de raízes. Para avaliação do parâmetro tamanho do calos, foram considerados P=pequeno (< 0,5 cm); M=médio (0,5 a 1,0 cm) e G=grande (> 1,0 cm). Os calos do T2 foram mantidos no mesmo meios de indução.

3.2.3 Estabelecimento da curva de crescimento de calos de *Tournefortia cf paniculata*

Calos derivados de segmentos foliares de *Tournefortia cf paniculata* mantidos em meio básico MS suplementado com 0,5 mg.L⁻¹ de ANA+1,0 mg.L⁻¹ de TDZ, tiveram sua curva de crescimento estabelecida.

Para a determinação desta curva, foram pesados 10 calos para cada ponto, retirados ao acaso, em intervalos de 4 em 4 dias, até o período de 40 dias. Avaliou-se o peso fresco e o peso seco dos calos, sendo os últimos submetidos à secagem em estufa ventilada a 45°C, até peso constante.

3.3 Abordagem fitoquímica

Foram analisadas amostras a partir das folhas *in vivo* e *in vitro*. Cada material foi submetido a uma metodologia de extração, conforme descritas abaixo. Com exceção dos componentes da fração volátil, todos os extratos foram purificados utilizando-se CLC e sílica gel 70-230 mesh da Merck®, eluída com solventes em ordem crescente de polaridade de acordo com cada caso em particular, sendo monitoradas com CCD preparativa em sílica gel G tipo 60 da Merck®.

Os extratos foram concentrados em evaporador rotatório Büchi R-114 sob pressão reduzida. Os espectros de infravermelho foram registrados no Departamento de Química Orgânica da UFLA, no espectrofotômetro modelo FTIR-8201 A, do fabricante Shimadzu, utilizando-se pastilhas de KBr como suporte. Os pontos de fusão foram determinados em aparelho de ponto de fusão Büchi 535. As análises de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa foram realizadas pelo Laboratório SINC do Brasil Instrumentação Científica Ltda., em aparelho Shimadzu modelo LCMS QP8000.

3.3.1 Abordagem fitoquímica a partir da planta in vivo de *Tournefortia cf paniculata*

As folhas foram coletadas em horta caseira da cidade de Lavras, às 13:00 horas no mês de novembro, época da floração. Estas foram trituradas com auxílio de um triturador tipo Politron®. Posteriormente, foram pesados 500 g de material verde e este foi, então, submetido à extração por maceração a frio, em ambiente ausente de luz, com solventes de polaridades crescentes. Primeiramente, macerou-se o material verde por 8 dias, em hexano; em seguida, este foi filtrado a vácuo, em funil de Büchner, e logo após o filtrado foi concentrado em evaporador rotatório, obtendo-se o extrato bruto hexânico. Secou-se o resíduo vegetal em estufa ventilada a 30°C. Após a secagem, macerou-se o resíduo em clorofórmio, submetendo-o à mesma metodologia acima, assim como com o acetato de etila e metanol. O processo de extração utilizado está esquematizado na Figura 3.

O extrato bruto clorofórmico (3,115 g) fracionado em CLC foi eluído na seguinte série de solventes: hexano; clorofórmio; acetato de etila; acetato de etila e metanol:clorofórmio 1:1; etanol; metanol e água, sendo monitorados com CCD. Em seguida, as frações foram concentradas em rotavapor. Destas, a fração acetato de etila e metanol:clorofórmio 1:1 foi submetida a um segundo fracionamento utilizando-se clorofórmio, acetato de etila e metanol como eluentes. Estas frações, após concentradas em evaporador rotatório, foram analisadas através de CCD. Da fração intermediária acetato de etila e metanol, após sucessivas recristalizações, isolou-se uma substância, a qual foi analisada em CCD, sendo o valor de R_f calculado a partir da média dos resultados de três placas; ponto de fusão; solubilidade, IV e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa.

Outra substância foi isolada, do extrato bruto acetato de etila (0,25 g), após fracionamento em CLC na série de eluentes: hexano; clorofórmio; acetato

de etila; etanol; metanol e ácido acético, monitorados com CCD e concentrados em rotavapor. Esta foi analisada através das mesmas técnicas utilizadas para o extrato bruto clorofórmico.

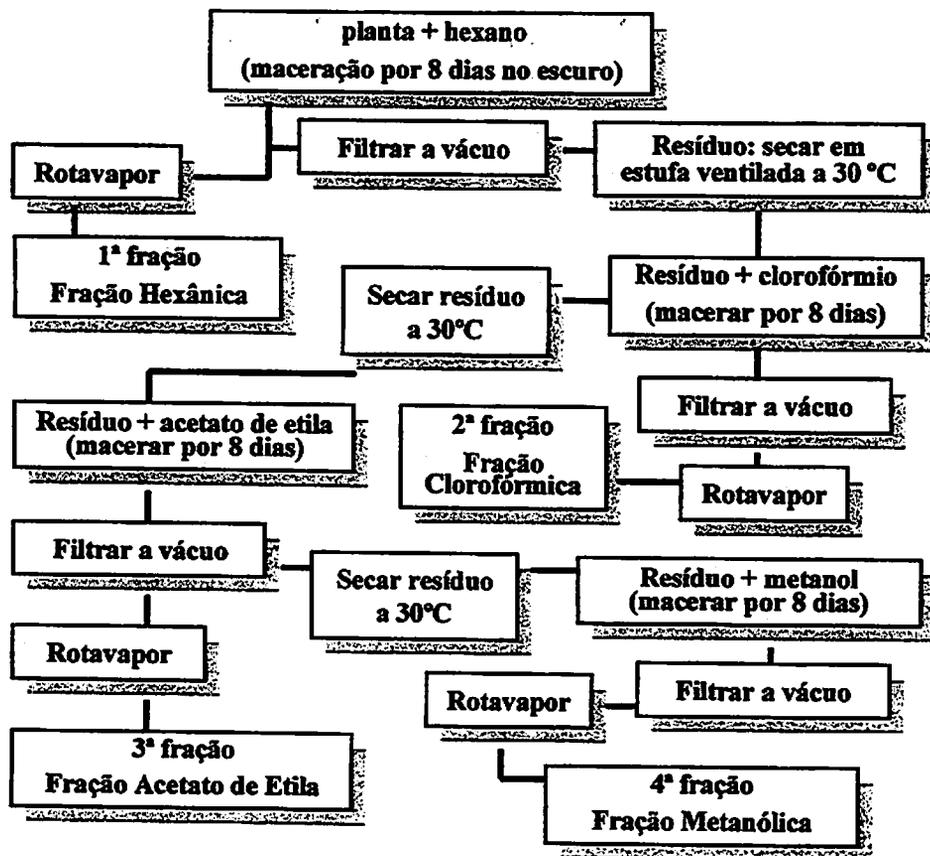


FIGURA 3 Esquema geral da extração dos metabólitos secundários com solventes de polaridades crescentes modificado (Matos, 1988). Laboratório de Química Orgânica, UFLA, Lavras, MG, 2000.

3.3.2 Abordagem fitoquímica dos componentes voláteis a partir da planta in vivo de *Tournefortia cf paniculata*

Foram utilizadas 13 g de folhas frescas rasgadas coletadas em horta caseira da cidade de Lavras, MG, em um dia com clima frio e nublado. Na extração dos componentes da fração volátil, utilizou-se a técnica de destilação por arraste a vapor d'água, que consiste em passar uma corrente de vapor d'água através de um recipiente que contém o material vegetal. Assim, o vapor d'água arrasta os produtos voláteis existentes no material e a mistura de vapores é conduzida a um condensador em que os vapores voltam ao estado líquido, sendo o hidrolato (mistura água/óleo essencial) recolhido em um balão coletor, mantido em água e gelo.

Foi coletado um litro de hidrolato, o qual foi dividido em 5 partes, sendo cada porção submetida à extração com 100 mL de diclorometano em funil de separação. Os extratos orgânicos provenientes deste fracionamento foram reunidos e secos com uma pequena porção de sulfato de magnésio anidro. O sal foi removido por filtração simples e o solvente evaporado em rotavapor, sendo determinada a massa residual.

Os componentes do óleo essencial tiveram sua solubilidade determinada e foram analisados em CCD em sílica gel G tipo 60 e sílica gel F, ambas da Merck®, sendo revelados em atmosfera de iodo e luz ultravioleta 254 nm, respectivamente. Posteriormente, foram levados para análise em IV, CG/EM e RMN ^{13}C e ^1H .

3.3.3 Abordagem fitoquímica a partir da plântula in vitro de *Tournefortia cf paniculata*

Plântulas obtidas in vitro em meio WPM, a partir de segmentos nodais de *Tournefortia cf paniculata*, tiveram suas folhas excisadas, as quais foram pesadas e estocadas em freezer à -20°C , até obtenção de 180 g de material verde.

Posteriormente, as folhas foram secas em estufa com circulação de ar a 30°C, obtendo-se 21 g de material seco. A extração foi processada com solventes de polaridade crescente, conforme descrito no item 3.3.1.

Fracionou-se 0,3 g de extrato bruto clorofórmico em CLC na série seguinte de eluentes: acetato de etila, etanol, metanol, ácido acético e ácido acético:água 3:2. Na fração ácido acético:água 3:2, após evaporação dos solventes, obtiveram-se cristais, os quais foram submetidos às análises rotineiras realizadas para as substâncias purificadas do extratos da planta in vivo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Testes experimentais para a propagação in vitro de *Tournefortia cf paniculata*

4.1.1 Efeito da concentração dos sais do meio MS no estabelecimento de explante primário de *Tournefortia cf paniculata*

O estabelecimento in vitro do explante proveniente de material in vivo, é uma das fases mais críticas em culturas de tecidos. Nesta fase o índice de sobrevivência costuma ser baixo em função da resistência do explante aos procedimentos de desinfecção, contaminação, oxidação e sua adequação às condições de cultivo estabelecidas.

Conforme já mencionado, é a primeira vez que se estuda o marmelinho in vitro. Portanto, em um estudo preliminar, segmentos nodais jovens provenientes de plantas cultivadas em casa de vegetação foram desinfestados com água sanitária comercial a 40% e estabelecidos em meio básico MS completo. Observou-se que a desinfestação do explante foi 85% eficiente, entretanto houve 100% de oxidação dos segmentos nodais inoculados no meio MS.

Para controlar a oxidação dos explantes, os segmentos nodais foram cultivados em meio básico completo e metade da força dos sais do MS suplementado com um antioxidante, o ácido cítrico. Observou-se que a concentração dos sais do meio MS foi circunstancial na indução de oxidação.

Caldas e Taketomi (1993), em testes iniciais com a cultura in vitro da casca e câmbio vascular de jabuticabeira (*Myrciaria cauliflora* Berg. (Myrtaceae)), observaram morte em todos os explantes devido a uma intensa oxidação e alta porcentagem de contaminação. Uma eficácia na redução da contaminação foi conseguida pela introdução de Benlate no meio nutritivo em concentrações de 10 a 100 mg.L⁻¹. Quanto à redução da oxidação, um fato interessante ocorreu, nos meios nutritivos utilizados por Caldas e Taketomi, MS; B5 (Gamborg et al, 1968, citado por Caldas e Taketomi, 1993); ½ Knop's (Gautheret, 1959, citado por Caldas e Taketomi, 1993) e modificações do meio Knop's, houve oxidação dos explantes e formação de mancha escura nos meios nutritivos. Entretanto, quando se eliminou, essencialmente, o FeEDTA de qualquer um destes meios, eliminou-se, também, a oxidação dos explantes, pois o ferro é cofator enzimático.

Tal fato pode ter ocorrido com o marmelinho, pois quando se reduz à metade a força dos sais, reduz-se, também, o FeEDTA. Os explantes cultivados com a força total dos sais do MS manifestaram maior oxidação do que os explantes em metade da força dos sais, e a suplementação do ácido cítrico não se mostrou muito eficiente em controlar a oxidação. Entretanto, para afirmar esta relação, novos testes deverão ser realizados com o material proveniente da planta in vivo.

Nesta fase de estabelecimento, foram também utilizadas no meio de cultura uma auxina (ANA) e uma giberelina (AG₃) para auxiliar na sobrevivência e crescimento do explante.

Observando-se a Tabela 3, nota-se que a concentração de sais no meio de cultura foi importante para o crescimento e desenvolvimento das brotações. Nos tratamentos em que havia metade da força de sais, houve considerável desenvolvimento de brotações. A suplementação de regulador de crescimento não foi eficiente na sobrevivência e qualidade destas brotações. A auxina e a giberelina induziram uma vitrificação (estado hiperhídrico) das folhas nestes brotos, as quais se apresentaram estreitas em relação à folha normal.

TABELA 3 Desenvolvimento de brotações; tamanho das brotações (cm); formação de calos; matéria fresca (g); aspectos das folhas e raízes e oxidação nos segmentos nodais provenientes de *Tournefortia cf paniculata* cultivadas em casa de vegetação. (T1= MS+100 mg.L⁻¹ de ácido cítrico+1,0 mg.L⁻¹ de AG₃ + 0,5 mg.L⁻¹ de ANA; T2 = MS+100 mg.L⁻¹ de ácido cítrico; T3 = MS/2+100 mg.L⁻¹ de ácido cítrico; T4=MS/2+100 mg.L⁻¹ de ácido cítrico+1,0 mg.L⁻¹ de AG₃ + 0,5 mg.L⁻¹ de ANA). Laboratório de Cultura de Tecidos, UFLA, Lavras, MG, 2000.

Variáveis de respostas	T1	T2	T3	T4
Desenvolvimento de brotações	-	-	100%	86%
Tamanho médio das brotações (cm)	-	-	0,96	0,58
Formação de calos	100%	100%	-	-
Matéria Fresca (g)	1,55	1,17	0,55	0,42
Folhas normais cor verde intenso	-	-	100%	-
Folhas estreitas vitrificadas	-	-	-	100%
Raízes grossas	100%	-	-	-
Oxidação	severa (-)	severa (+)	ausente	ausente

Em gemas apicais e basais de *Solidago microglossa* D.C. (Compositae) oriundas de casa de vegetação, Faria, Pinto e Deschamps (1993) também observaram que a utilização de reguladores de crescimento mesmo em baixas concentrações, não apresentaram vantagens, ao contrário causaram fitotoxidez ao tecido, e através dos resultados obtidos com o marmelinho, os melhores foram aqueles tratamentos que utilizaram a metade da força dos sais do meio MS, isento de regulador de crescimento.

Quando os segmentos nodais foram cultivados na força total de sais do MS, com e sem reguladores de crescimento, este induziu a formação de calos e não houve desenvolvimento das brotações, justificando-se os maiores pesos da matéria fresca apresentado na Tabela 3.

A Figura 4 nos mostra o aspecto das folhas nos tratamentos em que se desenvolveram brotações, oxidação e a formação de calos descritas anteriormente. Observa-se, também, a formação de raízes grossas nos sais completos do MS em virtude da presença da giberelina e auxina.

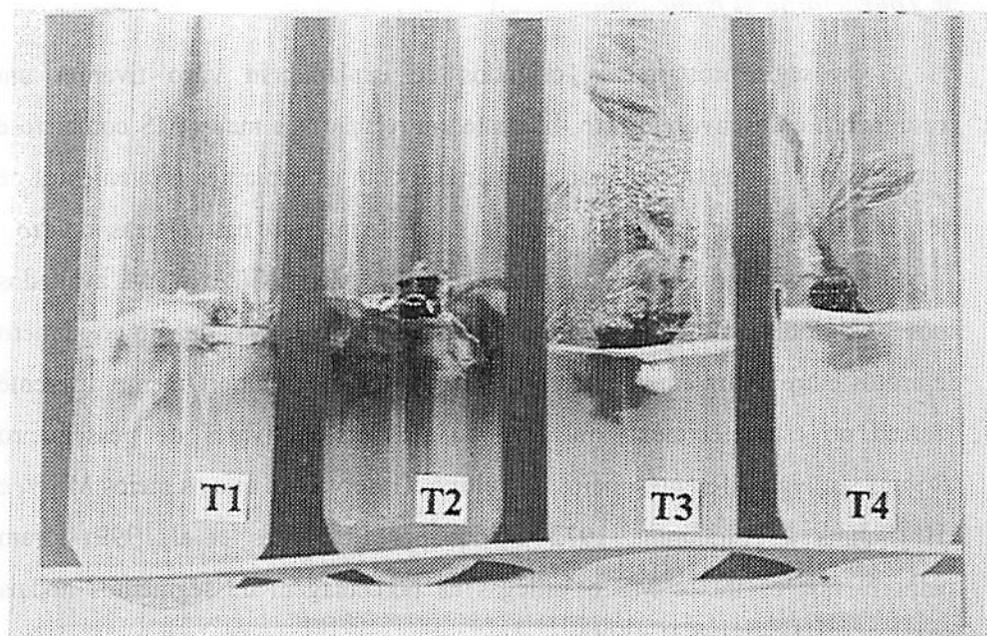


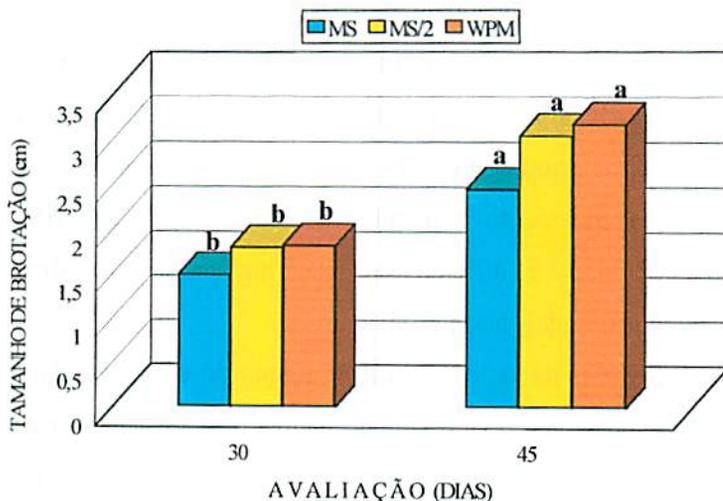
FIGURA 4 Morfogênese e calogênese de segmentos nodais de *Tournefortia cf paniculata* cultivados in vitro, em diferentes concentrações dos sais do meio MS. Laboratório de Cultura de Tecidos, UFLA, Lavras, MG, 2000.

4.1.2 Efeito do meio de cultura no estabelecimento do explante secundário de *Tournefortia cf paniculata*

Os segmentos nodais oriundos de explante in vitro tiveram um crescimento e desenvolvimento diferente em relação aos meios MS completo e metade da força dos sais quando comparados com os explantes provenientes de casa de vegetação, mostrando o quanto o explante interfere nas culturas in vitro.

Os segmentos nodais inoculados em meio MS; MS/2 e WPM, avaliados após 30 e 45 dias, não apresentaram diferenças significativas quanto ao número de brotos entre os tratamentos e épocas de avaliação. Comportamento diferente ocorreu no estabelecimento in vitro de algumas cultivares de pessegueiro (*Prunus* sp.), em diferentes meios de cultivo. Observou-se que os meios MS ¼ e SH (Schink e Hildebrant, 1972 citados por Rodrigues et al.,1999) foram melhores que os meios MS e Villegas na porcentagem de segmentos nodais brotados (Rodrigues et al.,1999).

Ao contrário, como podemos observar através da Figura 5, o tamanho da brotação apresentou diferença significativa quanto ao fator época de avaliação. Por outro lado, as médias do tamanho da brotação calculadas pelo teste de Tukey entre os tratamentos, não apresentaram diferenças estatísticas. Todavia, pela análise da Figura 5, percebe-se que o meio WPM em qualidade da plântula foi melhor dentre os três meios estudados. A mesma resposta foi encontrada em estudos com *Pterodon pubescens* Benth. (Leguminosae) realizados por Coelho (1999), em que os segmentos nodais foram melhor estabelecidos em meio WPM quando comparados com o meio MS. Em *Tournefortia cf paniculata*, quando se comparou o meio WPM com o meio básico completo do MS em relação ao tamanho das brotações, notou-se um incremento de 30% neste parâmetro. Além disso, quanto à aparência física da plântula in vitro, observou-se um crescimento vigoroso dos segmentos nodais inoculados no meio WPM, ao contrário dos outros tratamentos nos quais se percebeu amarelecimento de algumas folhas, que



Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

FIGURA 5 Tamanho médio de brotações formadas a partir de segmentos nodais de marmelinho cultivados in vitro em meios de cultura MS; MS/2 e WPM. Laboratório de Cultura de Tecidos, UFLA, Lavras, MG, 2000.

foi mais exacerbado no meio MS completo.

O meio de cultura MS é o meio mais concentrado em termos de micro e macronutrientes. Este comportamento das plântulas pode ter ocorrido em função de uma fitotoxidez causada pela alta concentração de sais deste meio. De acordo com Sato et al. (1999), o meio básico utilizado nesta fase de multiplicação, na cultura de tecidos, é o MS; entretanto, diversos trabalhos têm mostrado que a concentração de nitrato de amônio do MS é tóxica.

Resultados diferentes quanto à altura da brotação foram encontrados por Cerqueira (1999). Este, ao estudar o estabelecimento in vitro de segmentos nodais de *Tridax procumbens* L. (Asteraceae) em diferentes concentrações do meio MS (12,5; 25; 50 e 100%), observou que o tratamento com 50% da concentração do MS proporcionou maior altura da brotação, diferindo

estatisticamente dos demais tratamentos. Notou-se, neste estudo, que como o marmelinho, *Tridax procumbens*, mostrou-se sensível as altas concentrações dos sais do meio MS. Esta sensibilidade também foi detectada por Farias, Pinto e Lameira (1996) em estudos com arnica silvestre, *Solidago microglossa* D.C. (Compositae). O tratamento contendo metade dos sais do MS, dentre as concentrações de 25; 50 e 100% dos sais, foi o melhor para o estabelecimento in vitro dos segmentos nodais nesta espécie.

Analisando os dados da Tabela 4, quanto ao número e tamanho médio de raízes, observou-se a superioridade do meio WPM. Ao analisar as médias do número e tamanho das raízes entre os tratamentos observou-se que o meio WPM diferiu dos demais a nível de significância de 1%, pelo teste de Tukey (Figuras 6 e 7).

TABELA 4. Valores médios das variáveis de respostas dos segmentos nodais de marmelinho inoculados em meio MS; MS/2 e WPM aos 30 e 45 dias de cultivo. N.º(número); TAM(tamanho em centímetros); MF (matéria fresca em gramas); MS (matéria seca em gramas). Laboratório de Cultura de Tecidos, UFLA, Lavras, MG, 2000.

TRATAMENTO	AVALIAÇÃO	RAIZ			
		N.º	TAM (cm)	MF (g)	MS (g)
MS	30	0,9357	0,7375	0,0158	0,0013
	45	1,8884	2,4125	0,0735	0,0046
MS/2	30	1,3098	3,2812	0,0768	0,0069
	45	1,6806	3,2812	0,1279	0,0085
WPM	30	1,7939	4,9062	0,1056	0,0076
	45	3,0788	6,4687	0,1927	0,0098
PARTE AÉREA (BROTAÇÃO)					
MS	30	1,3483	1,4812	0,1230	0,0185
	45	1,3583	2,4375	0,2103	0,0273
MS/2	30	1,2916	1,7937	0,1253	0,0192
	45	1,2693	3,0375	0,2021	0,0267
WPM	30	1,2693	1,8125	0,1285	0,0165
	45	1,3500	3,1625	0,2426	0,0260

FIGURA 7. Tamanho médio das raízes formadas a partir de segmentos nodais de marmelinho cultivados in vitro em meios de cultura MS; MS/2 e WPM. Laboratório de Cultura de Tecidos, UFLA, Lavras, MG, 2000.

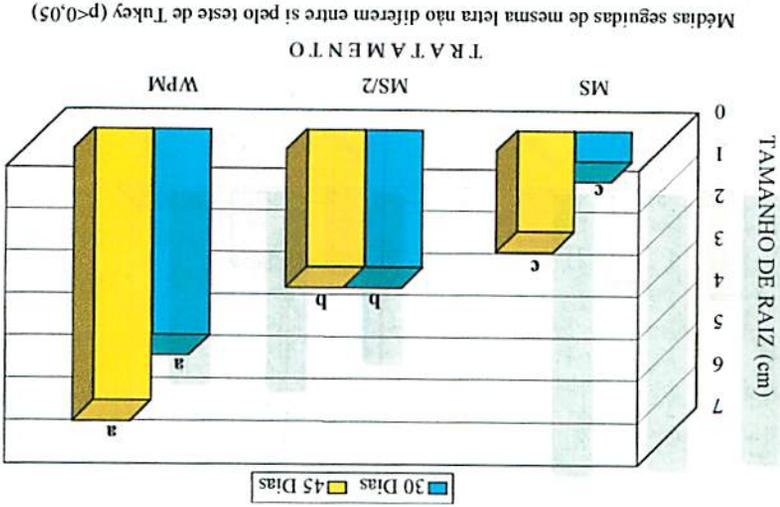
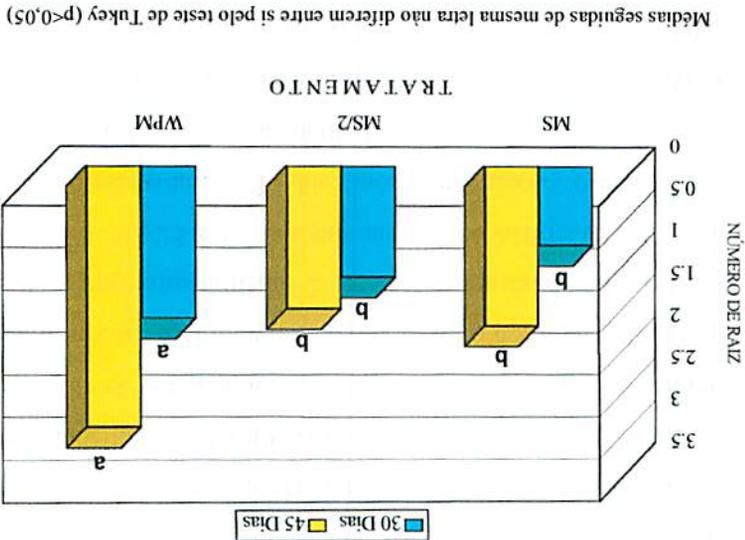


FIGURA 6. Número de raízes formadas a partir de segmentos nodais de marmelinho cultivados in vitro em meios de cultura MS; MS/2 e WPM. Laboratório de Cultura de Tecidos, UFLA, Lavras, MG, 2000.



Com isto, podemos inferir que não só os reguladores de crescimento afetam a indução e crescimento das raízes, mas também a concentração dos sais. Resultados semelhantes foram encontrados por Ishida et al., 1993. Estes observaram que as concentrações dos sais do MS também influenciaram no enraizamento in vitro de brotações adventícias do porta-enxerto de macieira 'M-7'. Brotos com aproximadamente 2 cm foram colocados para enraizar no meio MS com 100; 75; 50; 25 e 0% dos sais minerais e AIB (0,0; 1,0; 2,0 e 3,0 mg.L⁻¹). Na avaliação efetuada aos 30 dias após a inoculação, o melhor enraizamento obtido foi em 75% dos sais suplementado com 1,0 mg.L⁻¹ de AIB.

Em relação à matéria seca das raízes do marmelinho cultivadas in vitro (Figura 8), confirma-se a superioridade do meio básico WPM em relação ao meio básico MS e MS/2. Certamente, uma boa formação do sistema radicular propicia uma melhor aclimação das plântulas.

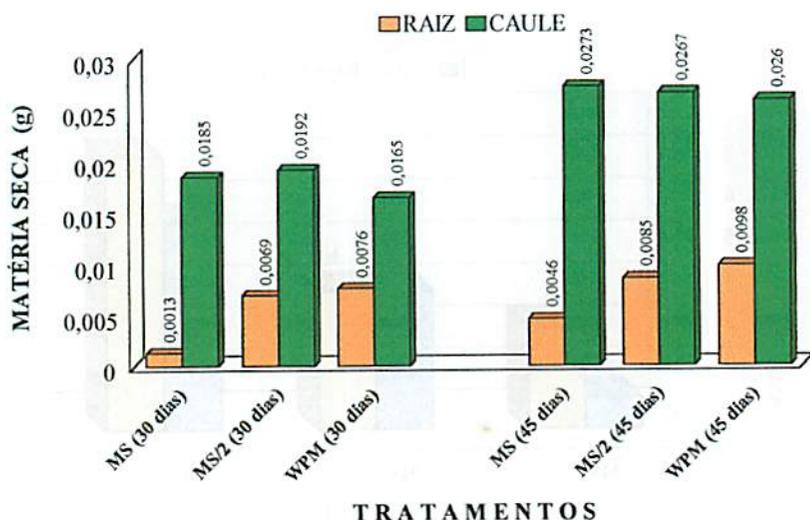


FIGURA 8. Matéria seca da raiz e parte aérea dos segmentos nodais de marmelinho cultivados in vitro em meios de cultura MS; MS/2 e WPM. Laboratório de Cultura de Tecidos, UFLA, Lavras, MG, 2000.



A melhor época de repicagem é aos 45 dias, pois se observa um desenvolvimento significativo a nível de 5% na parte aérea. O marmelinho, diferentemente da macieira estudada por Ishida et al. (1993), independe de reguladores de crescimento para o enraizamento das brotações, o que é uma vantagem do ponto de vista comercial.

4.1.3 Efeito da concentração de BAP na cultura de segmentos nodais de *Tournefortia cf paniculata*

Os segmentos nodais de marmelinho mostrou-se eficiente no estabelecimento in vitro, conforme discutido anteriormente; assim objetivou-se induzir múltiplas brotações, visando a obtenção de um protocolo de clonagem rápida.

O BAP tem sido muito eficaz para promover multiplicação em diversas espécies e é citado como a citocinina por excelência na multiplicação de brotações e indução de gemas adventícias. Grattapaglia e Machado (1990) afirmam que o BAP é a citocinina mais potente para promover a proliferação de partes aéreas, e é economicamente melhor por ser mais barato.

De fato, diante dos dados obtidos, o BAP mostrou-se eficiente para a indução de roseta (multibrotos) em segmentos nodais de marmelinho, como mostra a Figura 9. Cerqueira (1999), em estudos com a propagação in vitro de *Tridax procumbens*, concluiu que entre o BAP e o TDZ, o BAP foi o melhor regulador de crescimento em todas as variáveis de respostas analisadas (altura da plântula; número de brotos e raízes, peso da matéria fresca e seca da parte aérea). Os mesmos resultados já haviam sido obtidos por França et al. (1995), citados por França (1999), quando estudaram a indução de brotações em segmentos nodais de *Eclipta alba* L. Hassk. (Asteraceae).

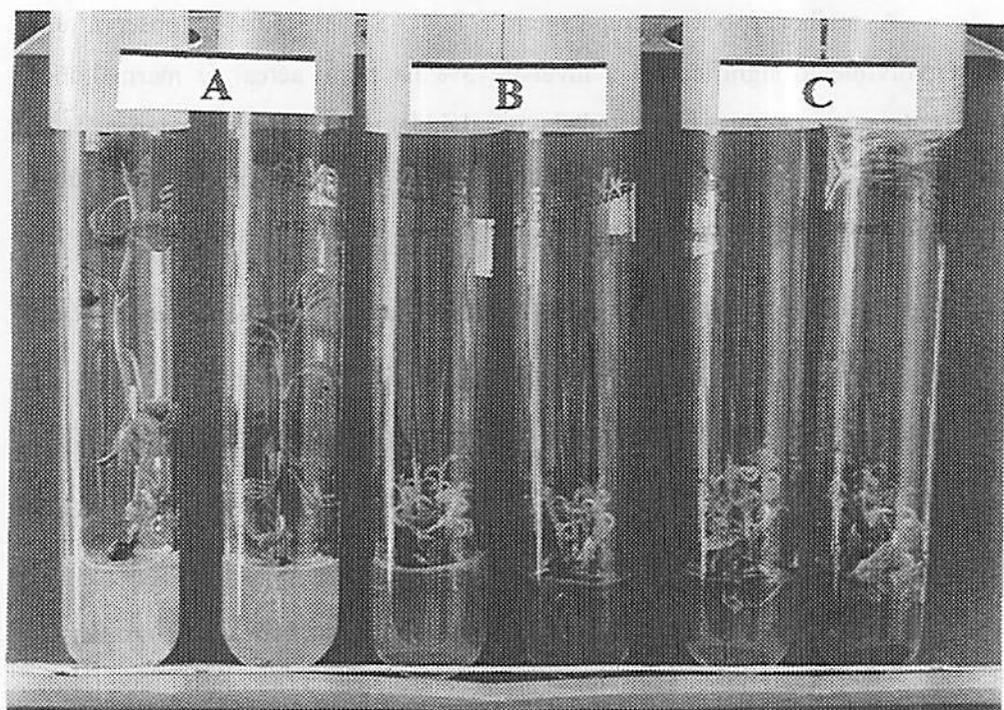


FIGURA 9 Efeito das concentrações crescentes de BAP em segmentos nodais de *Tournefortia cf paniculata* cultivadas in vitro em meio WPM suplementado com 0,0 (A); 0,5 (B); 1,0 (C) mg.L⁻¹ do regulador de crescimento. Laboratório de Cultura de Tecidos, UFLA, Lavras, MG, 2000.

Analisando a Tabela 5, podemos observar que no meio básico WPM não ocorreu indução de brotações, apenas o seu crescimento e desenvolvimento e, na suplementação deste meio com 0,5 e 1,0 mg.L⁻¹ de BAP, notou-se indução das brotações. Estes dados podem ser comparados com aqueles obtidos por Pereira (1999) em estudos com *Echinodorus cf scaber* Rataj (Alismataceae), popularmente conhecida como chapéu-de-couro. Em relação ao tamanho médio dos explantes, este autor obteve o melhor resultado utilizando apenas o meio MS e induziu até 7 brotações a partir de segmentos nodais em meio MS suplementado com 6 mg.L⁻¹ de BAP. Vantajosamente, o marmelinho exige uma

TABELA 5 Valores das médias ajustadas por equação de regressão para TB (tamanho de brotos em centímetros); NB (número de brotos) e PSPA (peso seco da parte aérea em gramas) em segmentos nodais de marmelinho em concentrações crescentes de BAP no meio WPM. Laboratório de Cultura de Tecidos, UFLA, Lavras, MG, 2000.

BAP (mg.L ⁻¹)	TB (cm)	NB	PSPA (g)
0,0	4,9300 a	1,0278 c	0,0325 a
0,5	2,8150 b	3,9444 b	0,0281 a
1,0	0,7000 c	6,8611 a	0,0238 a

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05)

concentração 5 vezes menor que o chapéu-de-couro na indução do mesmo número de brotos por explante.

Verificando o efeito do BAP na multiplicação *in vitro* nos segmentos nodais de *Cattleya walkeriana* Gardn. (Orchidaceae), Figueiredo et al. (1999) observaram que similarmente ao marmelinho, à medida que as concentração de BAP (0,0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg.L⁻¹) eram aumentadas no meio de cultura MS suplementado com os compostos orgânicos de White, era também aumentado o número de brotos formados por explante. Paralelamente, o tratamento sem regulador de crescimento foi o que apresentou maior média de crescimento dos explantes.

Observando a Figura 9, podemos notar que altas concentrações de citocinina induzem a formação de brotações mas, geralmente, inibem a formação de raízes. Estes dados estão de acordo com aqueles citados por Pierik (1987)¹ e Cerqueira (1999) em estudos de micropropagação de *Tridax procumbens*. Este obteve diminuição do número de raízes à medida que aumentou a concentração de BAP.

4.1.4 Alongamento e enraizamento das brotações de *Tournefortia cf paniculata*

As citocininas pertencem ao grupo de reguladores de crescimento utilizados para induzir brotações, sendo estas de tamanho reduzido, apresentando pequenas folhas e com uma aparência não muito normal. Assim, após a indução das multibrotações, é necessário o alongamento e o enraizamento das brotações. Deste modo, os multibrotos formados no meio básico WPM suplementado com 0,5 e 1,0 mg.L⁻¹ de BAP foram individualizados e cultivados em meio básico WPM para alongar e enraizar (Figura 10).

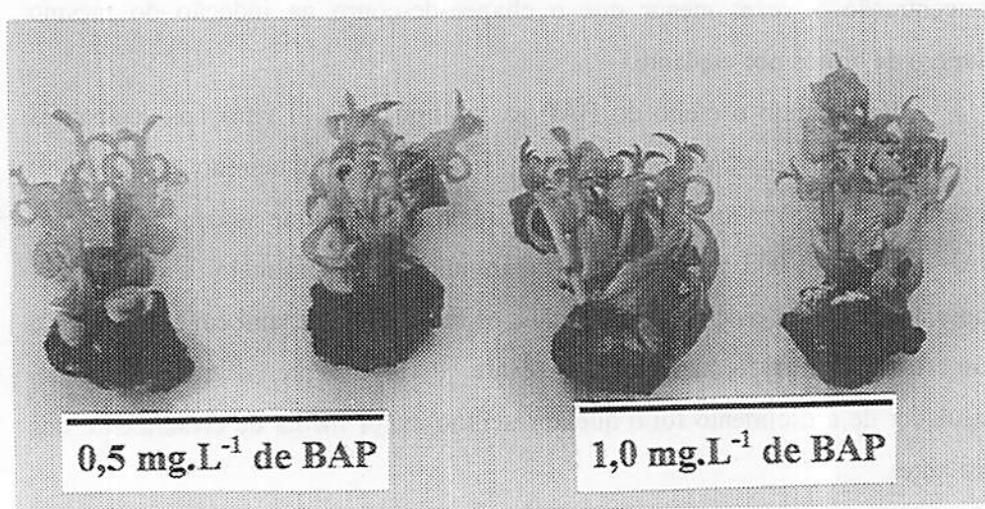


FIGURA 10. Multibrotações de *Tournefortia cf paniculata* desenvolvidas no meio WPM suplementado com 0,5 e 1,0 mg.L⁻¹ de BAP. Laboratório de Cultura de Tecidos, UFLA, Lavras, MG, 2000.

¹ O autor considera 1 a 10 mg.L⁻¹ de citocininas como concentrações elevadas.

Todas as brotações provenientes de ambos os meios de cultura enraizaram em WPM e tiveram um bom crescimento e desenvolvimento, sem a necessidade de utilizar reguladores de crescimento, conforme se pode observar na Figura 11.



FIGURA 11 Plântulas de *Tournefortia cf. paniculata* desenvolvidas a partir da individualização de rosetas cultivadas em meio WPM. Laboratório de Cultura de Tecidos, UFLA, Lavras, MG, 2000.

Pereira (1999), ao individualizar as multibrotações obtidas na inoculação de segmentos nodais de *Echinodorus cf scaber* em meio MS suplementado com 6 mg.L⁻¹ de BAP, obteve, também, enraizamento e desenvolvimento das brotações em meio MS ausente de regulador de crescimento. Resultados semelhantes foram encontrados em estudos com *Ipomoea batatas* L. (Convolvulaceae), feitos por Martins (1997), que obteve plântulas inteiras quando utilizou apenas o meio MS. Diferentemente, Lameira et al. (1993) encontraram uma eficiência de 100% de enraizamento em segmentos internodais de plântulas de ipecacuanha, *Cephaelis ipecacuanha* A. Richard. (Rubiaceae), quando utilizaram os reguladores de crescimento AIB (4,92 µM) e AG₃ (0,87 µM) no meio básico MS contendo 0,1% de carvão ativado. Evidentemente, a cultura de tecido torna-se mais vantajosa quando reguladores de crescimento são dispensáveis.

4.1.5 Aclimação de *Tournefortia cf paniculata*

Alguns problemas são freqüentemente encontrados nos processos de aclimação. No processo de transferência das plântulas obtidas in vitro para a condição ex vitro, a cutícula é freqüentemente menos desenvolvida devido a alta umidade relativa dos frascos ser de aproximadamente 100%, resultando em maior perda de água quando ocorre a remoção das plantas para o solo, onde a umidade do ar é bem inferior. As folhas são mais finas e fotossinteticamente menos ativas dificultando a adaptação às condições in vivo; a abertura dos estômatos causa um grande estresse de água durante as primeiras horas de aclimação. A pobre conexão vascular entre brotos e raízes pode reduzir a condução de água. A condição heterotrófica in vitro deve ser substituída pela autotrófica in vivo - o açúcar deve ser substituído através da fotossíntese (Pinto e Pasqual, 1990).

Além disso, em condição de cultivo in vitro, a utilização de ágar como substrato de sustentação faz com que a plântula desenvolva um sistema radicular bastante frágil (Miachir, 1992). Todavia, as plântulas micropropagadas a partir de segmentos nodais de *Tournefortia cf paniculata*, em meio WPM ausente de regulador de crescimento, aclimataram-se com 100% de sobrevivência na condição estabelecida de sombrite a 50%, não se observando problemas de adaptação. Ao contrário, o uso de sombrite 70% por 7 dias, seguido de sombrite 50% pelo mesmo período e sombrite 30% por 7 dias é que proporcionaram uma taxa de sobrevivência de plântulas de 97% na aclimação de *Maclura tinctoria* (L.) Don ex Stend. (Moraceae) estudada por Gomes et al. (1999). Na Figura 12, temos uma amostra de plantas de marmelinho aclimatizadas aos 30 e 150 dias, após a transferência para substrato comercial Plantimax[®] em casa de vegetação.

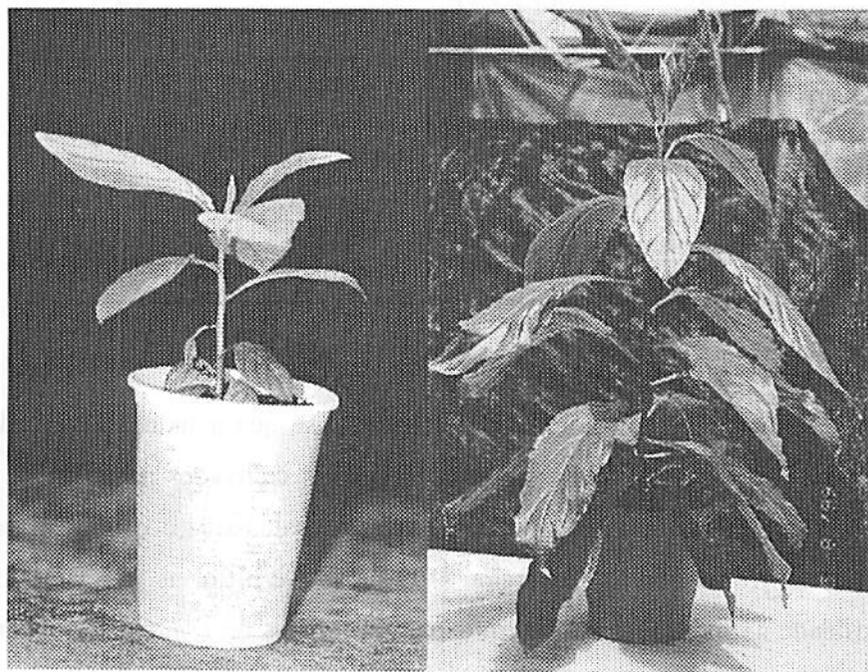


FIGURA 12 Plântulas de *Tournefortia cf paniculata* com 30 e 150 dias após a aclimação. Laboratório de Cultura de Tecidos, UFLA, Lavras, MG, 2000.

4.2 Calogênese em folhas de *Tournefortia cf paniculata*

4.2.1 Efeito de diferentes concentrações de BAP e condições de luminosidade na indução de calos de *Tournefortia cf paniculata*

O método de desinfestação foi eficiente para 83% dos explantes. A calogênese a partir das folhas de marmelinho no meio MS+0,5 mg.L⁻¹ de ANA+1,0 mg.L⁻¹ de BAP (T1) e MS+0,5 mg.L⁻¹ de ANA+2,0 mg.L⁻¹ de BAP (T2), sob condições de luz e escuro, apresentaram variações que podem ser observadas na Tabela 6.

TABELA 6 Parâmetros avaliados na indução de calos em folhas de *Tournefortia cf paniculata* em diferentes concentrações de BAP e luminosidade: presença de calos (PC); tamanho calos (cm); oxidação (Oxid.). Laboratório de Cultura de Tecidos, UFLA, Lavras, MG, 2000.

Tratamento	Regime	PC	Tamanho (cm)			Oxid.
			<0,5	0,5 a 1,0	>1,0	
T1	Escuro	12(16)	1	7	4	-
	Luz	11(16)	8	3	-	9
T2	Escuro	15(16)	2	10	3	1
	Luz	08(16)	5	2	1	7

Sob condições de luminosidade, observou-se que a indução dos calos ocorreu de forma bastante lenta em relação àqueles cultivados na ausência de luz. A presença de luz também influenciou as reações de oxidação, apresentando coloração marrom escuro. Cerqueira (1999), ao verificar as condições de luminosidade na indução de calos em explantes foliares de *Tridax procumbens*, oriundos de casa de vegetação, em meio MS acrescido de ANA e BAP, ambos na concentração de 2,0 mg.L⁻¹, obteve respostas diferentes quando comparados ao marmelinho. Segundo este, quando os explantes de *Tridax* foram expostos à

luz, apresentaram calos de cor verde, sugerindo um processo de biossíntese de clorofila. Ao contrário, reações de oxidação foram observadas quando o marmelinho foi exposto à luz. No escuro, Cerqueira (1999) observou que os calos exibiram coloração branco-amarelado e apresentaram uma considerável consistência, enquanto na indução de calos em marmelinho, uma coloração creme claro e consistência friável foram observadas. A exposição à luz na indução de calos em segmentos internodais em *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae), em meio de cultura MS suplementado com uma combinação de ANA (1,34 μM) e AIB (4,92 e 2,46 μM), apresentou os melhores resultados obtidos pelos estudos de Becker (1997). Estas diferenças ocorrem comumente, pois vários fatores, como tipo de explante, meio nutritivo, concentração de reguladores de crescimento, dentre outros, interferem na aparência física dos calos.

Com relação à luz, sabemos que esta é um fator indispensável para desencadear as rotas metabólicas na planta, podendo inclusive participar de reações oxidativas. Segundo Pinto e Pasqual (1990), células danificadas com o corte, especialmente de espécies lenhosas, liberam compostos fenólicos, os quais se oxidam escurecendo o meio de cultura e tornando-o tóxico ao explante. Estes compostos geralmente são derivados da rota do chiquimato, em que oxidações fenólicas são comuns durante os processos biossintéticos. Outro fator que pode ser atribuído como co-responsável pela oxidação é aquele que estimula a enzima citocinina oxidase. Segundo Gaspar et al. (1996), alguns tipos de compostos fenólicos, tais como 2,6-dimetoxifenol e 3,5-dimetoxi-4-hidroxiacetofenona, parecem estimular tal enzima.

Na Tabela 6, podemos observar que entre os tratamentos no escuro, ambos são adequados para indução; entretanto, quando se utilizaram 2,0 mg.L^{-1} de BAP, obtiveram-se 94% de indução, e com 1,0 mg.L^{-1} de BAP, obtiveram-se apenas 75%. A coloração inicial dos calos, conforme já referido, foi creme-

esverdeado, e após subseqüentes repicagens, eles não mantiveram esta coloração, apresentando um marrom claro, que não apresentou mudanças até a terceira subcultura. Após a quarta subcultura, ao final de 27 dias, dos 180 tubos de cada tratamento, 51,4% e 100% dos calos dos tratamentos T1 e T2, respectivamente, apresentaram uma coloração marrom escuro. Os calos do T1 que não oxidaram por completo, apresentaram uma coloração heterogênea marrom-claro a marrom. Em todas as condições, os calos apresentaram uma consistência friável.

De acordo com estas observações, podemos levantar a hipótese de que os fenômenos oxidativos ocorreram de forma gradativa. Provavelmente, a alta porcentagem de oxidação dos calos do T2 na quarta subcultura foi devida à maior concentração de BAP, enquanto os do T1 apresentaram-se com aspecto físico melhor. Entretanto, estes não foram recuperados, provavelmente por causa da acumulação de metabólitos tóxicos no meio. Resultados diferentes foram obtidos por Pereira et al. (1993) na manutenção de calos provenientes de folhas jovens de *Tithonia diversifolia* (Helms) Gray (Asteraceae). Este obteve indução efetiva de calos em combinações de ANA/BAP nas concentrações de 2,5-5,0 mg.L⁻¹ e 1,0-2,0 mg.L⁻¹, respectivamente. Estes, subcultivados sistematicamente em meio 2,5 mg.L⁻¹ de ANA e 2,0 mg.L⁻¹ de BAP, apresentaram-se bastante homogêneos e friáveis.

4.2.2 Efeito de diferentes concentrações de TDZ na indução de calos de *Tournefortia cf paniculata*

Os calos induzidos com o regulador de crescimento TDZ apresentaram uma melhor aparência física em relação àqueles induzidos com BAP. Entretanto, temos que considerar que os calos induzidos com TDZ foram com explantes foliares estabelecidos in vitro, e aqueles induzidos com BAP foram com explante oriundo de casa de vegetação. Os calos induzidos com TDZ mostraram

uma coloração heterogênea branco-leitosa e creme-esverdeada, não apresentando, portanto, problemas de oxidação. Similarmente, estudos realizados por Abreu (1998) mostraram que a melhor fonte de explante para a indução de calos em *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae) foi a partir plântulas estabelecidas in vitro.

As avaliações realizadas aos 40 dias na indução dos calos estão apresentadas na Tabela 7, em que podemos perceber que o meio MS+0,5 mg.L⁻¹ de ANA+2,0 mg.L⁻¹ de TDZ (T2) foi superior na indução quando comparado com o meio MS+0,5 mg.L⁻¹ de ANA+1,0 mg.L⁻¹ de TDZ (T1).

TABELA 7 Parâmetros avaliados na indução de calos em folhas de *Tournefortia cf paniculata* em diferentes concentrações de TDZ: presença de calos (PC); tamanho calos (cm); oxidação (Oxid.); presença de raiz (PR). Laboratório de Cultura de Tecidos, UFLA, Lavras, MG, 2000.

Tratamento	Regime	PC	Tamanho (cm)			Oxid.	PR
			<0,5	0,5 a 1,0	>1,0		
T1	Escuro	30(30)	28	04	-	-	11
T2	Escuro	30(30)	-	23	07	-	02

Nos dados obtidos pelo T1, observamos que o balanço hormonal auxina/citocinina não se equilibrou adequadamente, pois cerca de 37% dos explantes desenvolveram raízes, enquanto naqueles obtidos no T2, apenas 7% dos calos manifestaram rizogênese, mostrando que houve suplantação da citocinina sobre a auxina.

Na manutenção do T2 no mesmo meio de cultivo, observou-se que os calos não apresentaram a coloração inicial, a qual foi marrom-claro a marrom.

Optou-se, então, pela redução à metade da concentração de TDZ, permanecendo a coloração marrom claro após várias subculturas. Em todas as condições, os calos apresentaram consistência friável. Segundo citações de Pinto e Pasqual (1990), os calos podem perder sua necessidade de reguladores de crescimento após repetidas subculturas, tornando-se autotrófico com relação a reguladores. Assim, provavelmente, a diminuição na concentração de TDZ contribuiu para que os calos não oxidassem.

Nos estudos de Becker (1997) com *Phyllanthus niruri* para determinação do melhor regulador de crescimento na indução de calos, este observou que o TDZ não foi o mais eficiente dentre os 4 testados (2,4-D, TDZ, ANA e AIB). Entretanto, na manutenção em meio MS suplementado com 2,46 μM de AIB, os melhores resultados foram aqueles em que se havia utilizado 4,54 μM de TDZ na indução.

4.2.3 Estabelecimento da curva de crescimento de calos de *Tournefortia cf paniculata*

As Figuras 13 e 14 ilustram a curva de crescimento dos calos, da matéria fresca e seca, respectivamente, mantidos em meio MS+0,5 mg.L^{-1} de ANA+1,0 mg.L^{-1} de TDZ. Observou-se que o perfil da curva de crescimento obtido para *Tournefortia cf paniculata* foi semelhante às curvas de crescimento encontradas, na literatura, para outras culturas, apresentando 5 fases distintas, proporcionando curvas do tipo sigmóide.

Analisando-se esta curva de crescimento, observam-se resultados similares àqueles encontrados por Lameira (1997) na curva de crescimento de calos de *Cordia verbenacea*. A fase lag, em que as células preparam-se para a divisão, foi de aproximadamente 4 dias, seguida da fase exponencial de crescimento celular, até o 12º dia. O período de crescimento linear ocorreu entre o 12º dia e 34º dia. Nesse período, as células crescem, porém ocorre uma

redução na taxa de divisão celular. O período de desaceleração do crescimento dos calos ocorreu entre o 34º e o 37º dia. Segundo Smith (1992), é nesse período que se deve fazer a transferência do cultivo para um novo meio nutritivo devido à exaustão dos nutrientes, produtos tóxicos, secagem do ágar e a redução de O₂ no interior das células e calos.

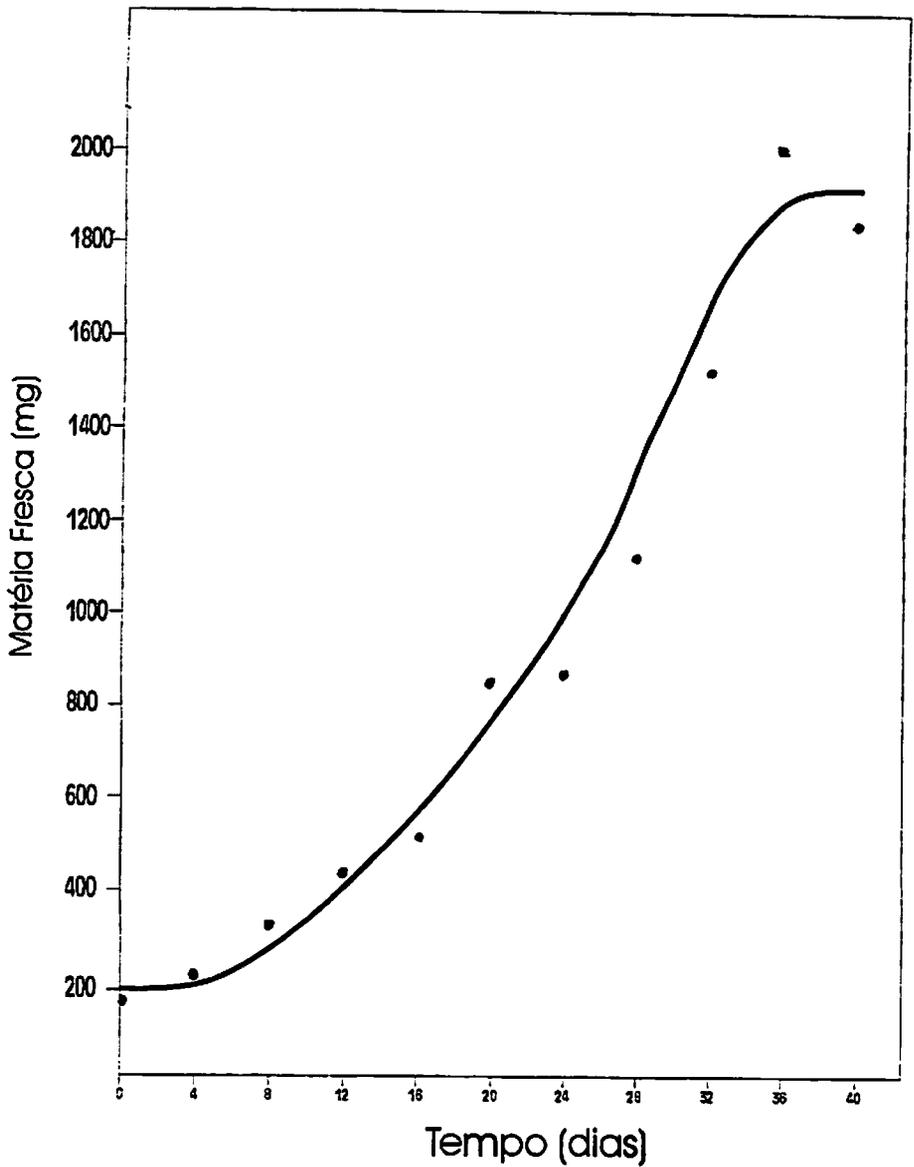


FIGURA 13 Curva de crescimento de calos da matéria fresca (g) formados a partir de segmentos foliares de *Tournefortia cf paniculata*, durante 40 dias. Laboratório de Cultura de Tecidos, UFLA, Lavras, MG, 2000.

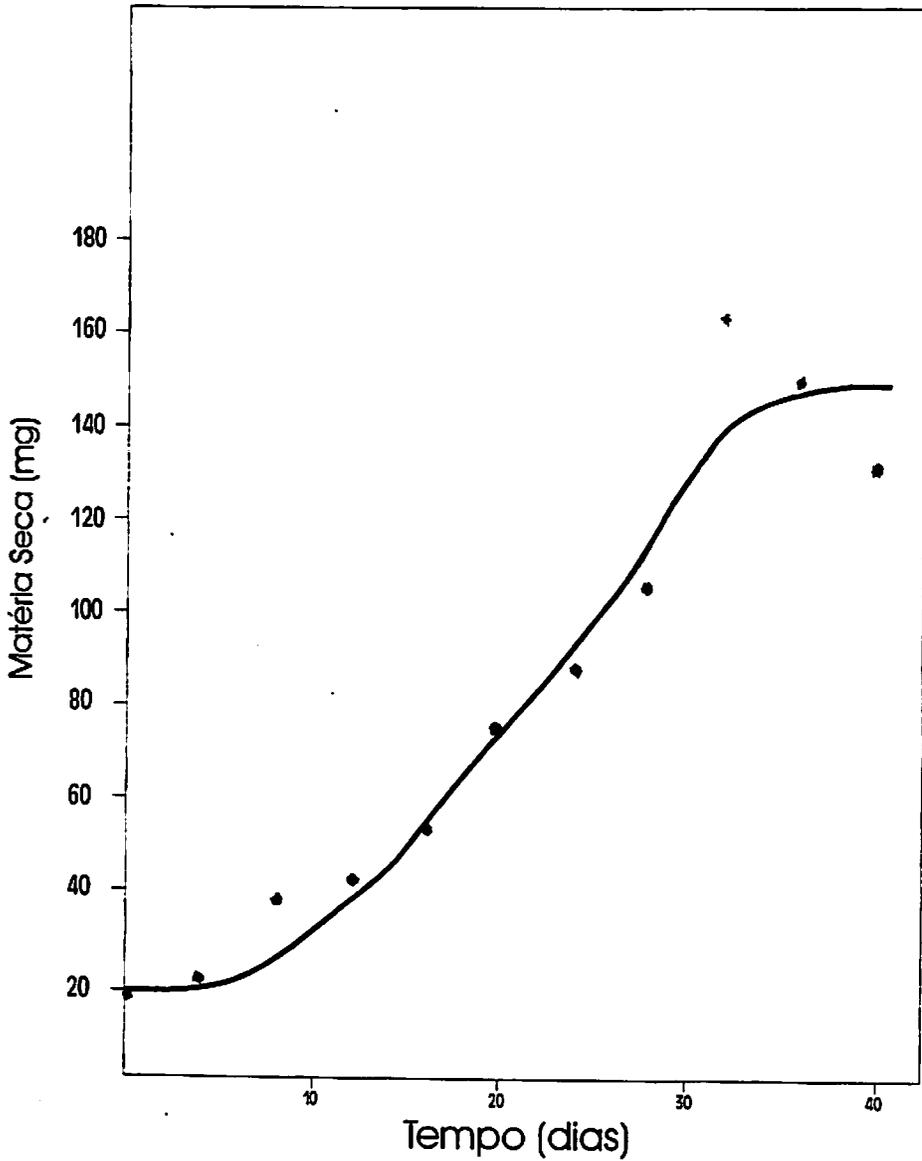


FIGURA 14 Curva de crescimento de calos da matéria seca (g) formados a partir de segmentos foliares de *Tournefortia cf paniculata*, durante 40 dias. Laboratório de Cultura de Tecidos, UFLA, Lavras, MG, 2000.

A fase estacionária, na qual não há síntese de biomassa, ocorreu a partir do 38º dia. Lameira (1997) reporta que nesta fase ocorre o maior acúmulo de metabólitos secundários.

Resultados semelhantes foram encontrados por Deccetti et al. (1999), os quais obtiveram um padrão sigmóide da curva e cinco fases de crescimento distintas no estudo do crescimento de calos em explantes foliares de bertalha, *Baussingaultia baselloides* HBK (Basellaceae); entretanto, a fase lag perdurou até o 10º dia de cultivo. A fase exponencial ocorreu do 10º ao 20º dia de cultivo, seguida da fase linear, até o 30º dia, e fase de desaceleração, entre o 30º e 35º dia. A fase estacionária ocorreu do 35º ao 42º dia de cultivo.

4.3 Abordagem fitoquímica

4.3.1 Abordagem fitoquímica a partir da planta in vivo de *Tournefortia cf paniculata*

O resíduo isolado e purificado do extrato bruto obtido em clorofórmio (16,5 mg), denominado A6, caracteriza-se por um pó fino de coloração creme-clara e inodor. Esta solubiliza-se em metanol e apresenta ponto de decomposição a 225°C. Através de CCD, detectou-se apenas uma mancha, sendo o melhor comportamento cromatográfico ocorrido com a eluição em metanol, cujo valor de Rf foi 0,79 após revelação em atmosfera de iodo. O peso molecular fornecido pela cromatografia líquida acoplada à espectrômetro de massa foi de 199,0 g/mol. O espectro de infravermelho apresentado pela Figura 15 caracteriza um composto com grupo funcional amida. Neste destacam-se, na região compreendida entre 3600-2700 cm⁻¹, uma banda larga atribuída aos estiramentos da ligação O-H e N-H sobrepostos com os sinais de absorções dos grupos metilas (-CH₃), metilênicos (-CH₂) e metínicos (-CH), que ocorrem entre 3000-

2700 cm^{-1} . Estas absorções se apresentam como um sinal largo devido à ocorrência de pontes de hidrogênio. Observam-se, também, sinais de absorções fortes na região compreendida entre 1639-1550 cm^{-1} , característica de deformações da ligação N-H de amidas primárias ou secundárias sobrepostas com estiramento da ligação C=O. Próximo a 1400 cm^{-1} , encontram-se bandas de absorções que são atribuídas a estiramentos das ligações C-N. Sinais característicos de vibrações de estiramentos da ligação C-O são observados na região entre 1053-1022 cm^{-1} .

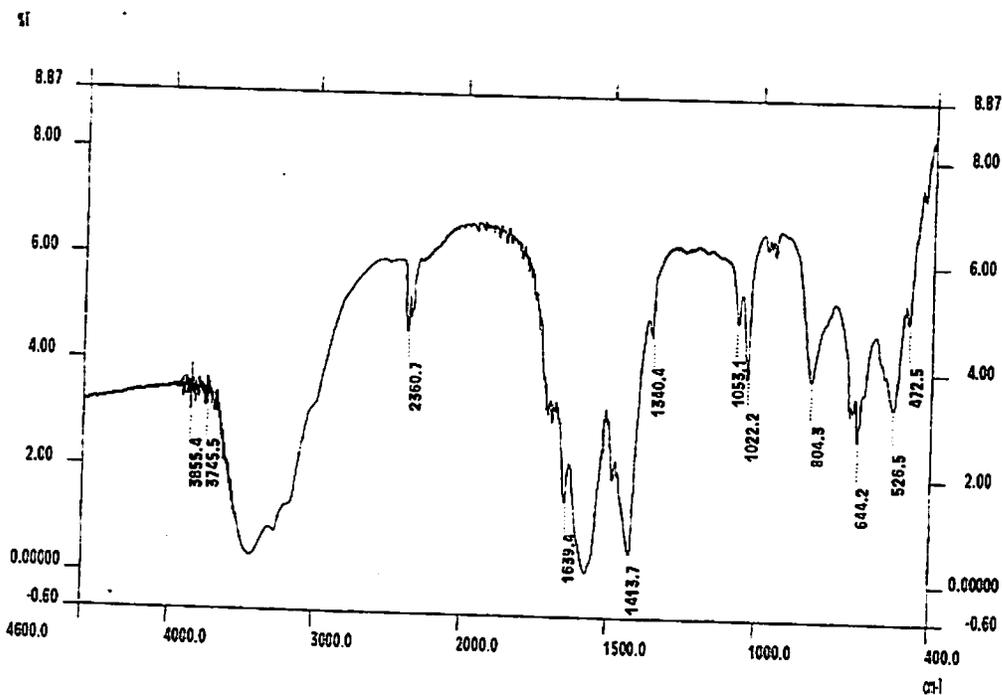


FIGURA 15 Espectro de infravermelho da amostra A6 de *Tournefortia cf paniculata*. Laboratório de Química Orgânica, UFLA, Lavras, MG, 2000.

A substância isolada e purificada do extrato bruto em acetato de etila (15,7 mg), denominada A7, foi obtida na eluição da fração intermediária entre metanol e ácido acético. Esta apresenta-se por um pó fino de coloração bege e inodor; solubiliza-se em metanol e apresenta ponto de decomposição a 210°C. A análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa nos forneceu um peso molecular de 199,0 g/mol. Pela análise do espectro de IV apresentado na Figura 16, verificamos uma banda larga situada aproximadamente entre 3629-2700 cm^{-1} , atribuída aos estiramentos simétricos e assimétricos das ligações O-H e N-H sobrepostos com os sinais de absorções de estiramento da ligação C-H dos grupos metilas (-CH₃), metilênicos (-CH₂) e

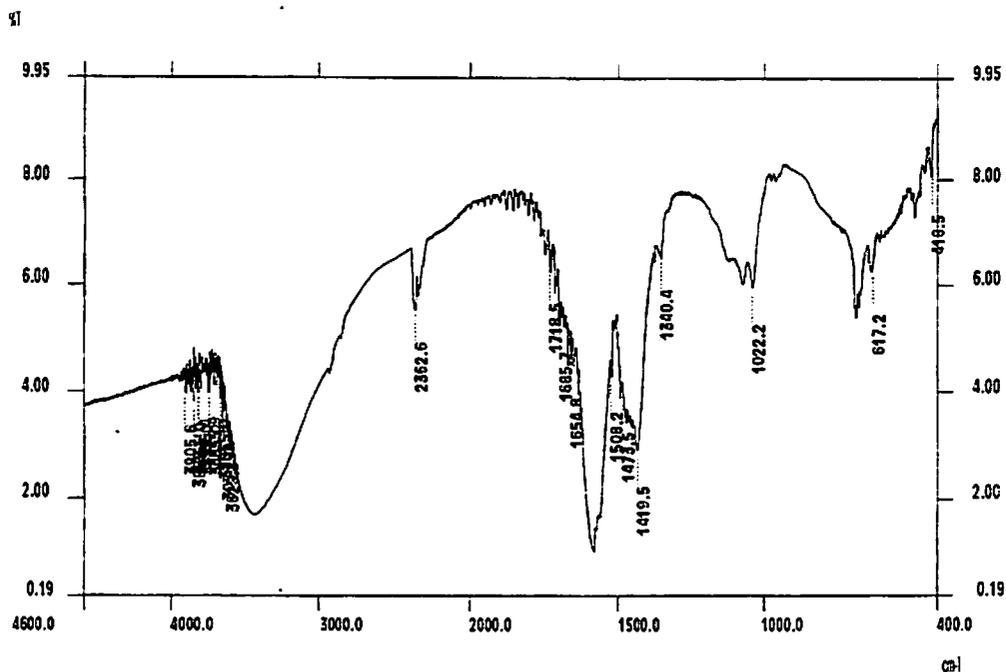


FIGURA 16 Espectro de infravermelho da amostra A7 de *Tournefortia cf paniculata*. Laboratório de Química Orgânica, UFLA, Lavras, MG, 2000.

metínicos (-CH), que ocorrem próximo a 2970-2760 cm^{-1} . Sinais fortes de absorções são observados na região próxima a 1570 cm^{-1} , característicos de deformações angulares das ligações N-H de amidas primárias ou secundárias sobrepostas com estiramento da ligação C=O. Aproximadamente entre 1452-1415 cm^{-1} , encontram-se bandas de absorções que são atribuídas a estiramentos das ligações C-N. Sinais característicos de vibrações de estiramentos da ligação C-O são observados na região entre 1047-1022 cm^{-1} .

Devido à semelhança dos espectros de infravermelho e igualdade de massa molecular, podemos sugerir que as amostras A6 e A7 se tratam do mesmo composto. Entretanto, somente com dados de RMN ^{13}C e ^1H poderemos afirmar tal resultado.

4.3.2 Abordagem fitoquímica dos componentes voláteis a partir da plântula *in vivo* de *Tournefortia cf paniculata*

A massa obtida da fração volátil das folhas do marmelinho caracteriza um líquido viscoso amarelo esverdeado, de odor refrescante picante, com rendimento percentual de 0,385 g. Os desenvolvimentos cromatográficos em CCD, utilizando-se sílica gel 60 G e sílica gel GF₂₅₄, procederam-se de forma unidimensional e ascendente, sendo que o melhor resultado obtido foi com a mistura binária ácido acético:metanol 1:2. As placas cromatográficas preparadas em sílica gel 60G e sílica gel GF₂₅₄ foram reveladas em iodo (Rf: 0,68) e luz ultravioleta 254 nm (Rf: 0,60), respectivamente. O espectro de infravermelho, apresentado na Figura 17, apresenta características de grupamentos C=O de compostos carbonilados. Destacam-se sinais de absorções de estiramento da ligação C-H de grupos metilas, metilênicos e metínicos, que ocorrem aproximadamente entre 2960-2854 cm^{-1} . Aproximadamente em 1732 cm^{-1} nota-se um pico de absorção, o qual é característico de estiramentos das ligações C=O

de ésteres, que ocorrem na região compreendida entre 1750-1735 cm^{-1} (Silverstein, Bassler e Morrill, 1994 e Pavia, Lampman e Kriz, 1996). Entre 1260-1000 cm^{-1} ocorrem fortes bandas de absorções que podem ser atribuídas a vibrações de estiramentos simétricos das ligações C-O. Com base nos dados de infravermelho, podemos inferir que o óleo obtido apresenta, entre outros, componentes com grupamentos característicos de ésteres conjugados. Entretanto, somente com os dados das análises de CG/MS e RMN ^{13}C e ^1H poderemos inferir a estrutura química do composto majoritário predominante nesta amostra.

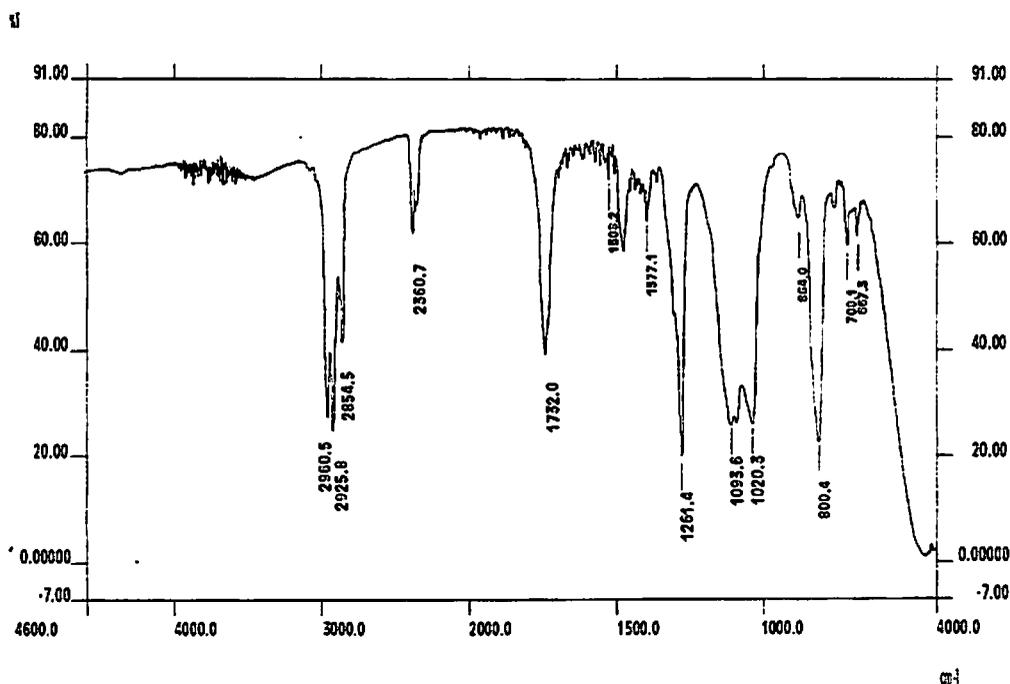


FIGURA 17 Espectro de infravermelho do óleo essencial de *Tournefortia cf paniculata*. Laboratório de Química Orgânica, UFLA, Lavras, MG, 2000.

4.3.3 Abordagens fitoquímicos a partir da planta in vitro de *Tournefortia cf paniculata*

A substância isolada do material in vitro, denominada A11 (4,5 mg), caracteriza-se por cristais de coloração branco leitosa, de odor ácido; solubiliza-se em metanol e decompõe-se a 234°C. Não foram observadas manchas nas CCD realizadas; entretanto, o espectro de infravermelho apresentado na Figura 18 mostra, na região compreendida entre 3629-2800 cm^{-1} , uma banda larga atribuída aos estiramentos das ligações O-H sobrepostos com os sinais de absorções de estiramento da ligação C-H dos grupos metilas, metilênicos e metínicos. Esta banda larga pode ser atribuída a pontes de hidrogênio da hidroxila alcoólica. Sinais de absorções entre 1654-1620 cm^{-1} são atribuídos à presença de grupos carbonila conjugados. Entre 1200-1050 cm^{-1} ocorre uma absorção forte correspondente a vibrações de estiramentos das ligações C-O. O peso molecular fornecido pela cromatografia líquida acoplada à espectrômetro de massa foi de 199,0 g/mol.

17

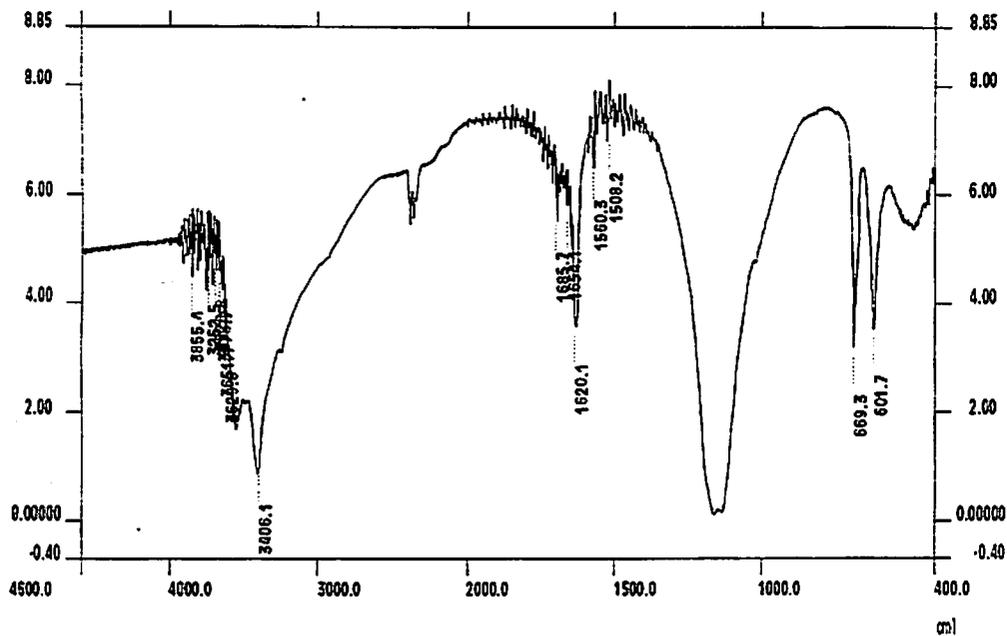


FIGURA 18 Espectro de infravermelho da amostra A11 de *Tournefortia cf paniculata*. Laboratório de Química Orgânica, UFLA, Lavras, MG, 2000.

5 CONCLUSÕES

- Os segmentos nodais são explantes eficientes para o estabelecimento de *Tournefortia cf paniculata* in vitro;
- o meio WPM ausente de regulador de crescimento é o mais eficiente para o desenvolvimento e crescimento da plântula;
- a melhor época de repicagem é aos 45 dias;
- a suplementação com $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP induz formação de múltiplas brotações (7 brotações/segmento);
- as brotações enraizam em WPM ausente de regulador de crescimento e aclimatam com 100% de sobrevivência;
- o melhor tratamento na indução de calos em explantes foliares de *Tournefortia cf paniculata* foi a combinação de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA e $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de TDZ em meio básico MS, sob ausência de luz e explante proveniente de cultura in vitro e combinações de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA e $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de TDZ são mais eficientes na manutenção dos calos;
- a curva de crescimento celular dos calos mantidos no meio MS suplementado com $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA e $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de TDZ apresentou padrão sigmóide e 5 fases distintas, num período de 40 dias de crescimento in vitro;
- na abordagem fitoquímica, isolou-se e purificou-se uma substância das folhas in vivo que apresenta peso molecular de $199,0 \text{ g/mol}$, e devido à semelhança dos dados das análises espectrométricas, inferimos tratar-se da mesma substância, a qual apresenta os seguintes grupos químicos: carbonila (C=O); amino (-NH); hidroxila (-OH); metilas, metilênicos e metínicos (-CH);
- a substância isolada e purificada das folhas in vitro apresenta peso molecular de $199,0 \text{ g/mol}$, ponto de fusão 234°C e apresenta os seguintes grupos químicos: carbonila (C=O); hidroxila (-OH); metilas, metilênicos e metínicos (-CH);

-dentre os componentes encontrados no óleo essencial, provavelmente o majoritário apresenta um grupo carbonílico, característico de um éster conjugado.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, I.N. Propagação *in vivo* e *in vitro*, calogênese, nutrição mineral e quantificação de mucilagem em *Cissus sicyoides*. Lavras: UFLA, 1998. 101p. (Dissertação - Mestrado em Fisiologia Vegetal).
- ALFERMANN, A. W.; PETERSEN, M. Natural product formation by plant cell biotechnology. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, The Hague, v.43, p.199-205, 1995.
- BAJAJ, Y.P.S.; FURMANOWA, M.; OLSZOWSKA, O. Medicinal, aromatic, and industrial materials from plant. In: BAJAJ, Y. P. S. (ed.). **Medicinal and aromatic plant 1**. Berlin: Spring-Verlag, 1988. p.60-103. (Biotechnology in Agriculture and Forestry, 4)
- BALANDRIN, M. F.; KLOCKE, J. A. Medicinal, aromatic, and industrial materials from plant. In: BAJAJ, Y. P. S. (ed.). **Medicinal and aromatic plant 1**. Berlin : Spring-Verlag, 1988. p.3-33. (Biotechnology in Agriculture and Forestry, 4)
- BECKER, L. Propagação vegetativa *in vivo* de *Phyllanthus corcovadensis* Muell. Arg. e *in vitro*, indução de calos, nutrição, extração e quantificação de alcalóides na espécie *Phyllanthus niruri* L. (quebra-pedras). Lavras: UFLA, 1997. 96p. (Dissertação - Mestrado em Fisiologia Vegetal).
- BOTSARIS, A.S. **Fitoterapia chinesa e plantas brasileiras**. São Paulo: Icone, 1995. p.37
- BROWN, J. T. The initiation and maintenance of callus cultures. In: POLIARD, J.W.; WALKER, J.M. **Plant cell and tissue culture**. Clifton, New Jersey: Humana Press, 1990. p.57-63. (Methods in Molecular Biology, 6)
- CALDAS, L.S. Cultura de tecidos e biotecnologia. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS, 1., 1986, Brasília. **Anais...** Brasília: EMBRAPA, 1986. p.37-38.
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (ed). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: BCTP/EMBRAPA-CNPq, 1990. p.37-70.

- CALDAS, L.S.; TAKETOMI, C. Desinfestação e controle de oxidação de explantes lenhosos de jaboticabeira e goiabeira para cultura de tecidos. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v.5, n.1, p.107, jun. 1993. Suplemento do CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 4, Fortaleza, 1993.
- CASSELLS, A.C. Setting up a commercial micropropagation laboratory. In: BAJAJ, Y.P.S. (ed). **High-tech and micropropagation 1**. Berlin: Springer-Verlag, 1991. p.17-30. (Biotechnology in Agriculture and Forestry, 17)
- CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, São Paulo, v.1, n.21, p.99-105, 1998.
- CERQUEIRA, E.S. **Propagação e calogênese *in vitro* em erva-touro (*Tridax procumbens* L.), uma planta medicinal**. Lavras: UFLA, 1999. 81p. (Dissertação - Mestrado em Fisiologia Vegetal).
- COELHO, M.C.F. **Germinação de sementes e propagação *in vitro* de sucupira branca [*Pterodon pubescens* (Benth.) Benth.]**. Lavras, MG: UFLA, 1999. 119p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia)
- COLLIN, H. A.; DIX, P. J. Culture systems and selection procedures. In: DIX, J.P. **Plant cell line selection: procedures and applications**. New York, 1990. p.6.
- CORRÊA, A.G. Taxol: da descoberta ao uso terapêutico. **Química Nova**, São Paulo, v.18, n.5, p.460-467, 1995.
- CORRÊA JUNIOR, C.; MING, L.C.; SCHEFFER, M.C. **Cultivo de plantas medicinais e romáticas**. 2.ed. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 1994. p.3.
- COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 2.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1982. v.3, p.193, 926, 940.
- COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 4.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkiana, 1994a. v.2, p.1033-1036.
- COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 5.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkiana, 1994b. v.1, p.4, 436-441.

- CRAVEIRO, A.A.; FERNANDES, A.G.; ANDRADE, C.H.S.; MATOS, F.J.A.; ALENCAR, J.W.; MACHADO, M.I.L. **Óleos essenciais de plantas do nordeste**. Fortaleza: UFC, 1981. 210p.
- CROCOMO, O.J.; MELO, M. Practical aspects of the production of secondary metabolites by plant cell cultures. In: CROCOMO, O.J.; SHARP, W. R.; MELO, M. (eds). **Biotechnology para produção vegetal**. Piracicaba: CEBTEC/FEALQ, 1991. p.373-389.
- DECETTI, S.F.C. et al. Estudo do crescimento de calos em explantes foliares de bortalha (*Bausingaultia baselloides* HBK). **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v.11, p.68-69, jun. 1999. Suplemento do CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 7, Brasília, 1999.
- EINSET, J. W. Woody plant micropropagation with cytokinins. In: BAJAJ, Y.P.S. (ed). **High-Tech and Micropropagation 1**. Berlin: Springer-Verlag, 1991. p.190-201. (Biotechnology in Agriculture and Forestry, 17)
- FALKENBERG, M.B.; SANTOS, R.I.; SIMÕES, C.M.O. Introdução a análise fitoquímica. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; et al. (org.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Florianópolis, Porto Alegre: UFRGS/UFSC, 1999. p.163-179.
- FARIA, J.L.D; PINTO, J.E.B.P.; DESCHAMPS, C. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Solidago microglossa* a partir de gemas apicais e basais. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v.5, n.1, p.113, jun. 1993. Suplemento do CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 4., 1993, Fortaleza.
- FARIAS, J.L.D; PINTO, J.E.B.P.; LAMEIRA, O.A. Estabelecimento *in vitro* de arnica silvestre (*Solidago microglossa* D.C.) através de segmento nodal. In: SEMINÁRIO MINEIRO DE PLANTAS MEDICINAIS, 2., 1996, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 1996. p.33.
- FARNSWORTH, N.R.; AKERELE, O.; BINGEL, A.S.; SOEJARTO, D.D.; GUO, Z. Medicinal plants in therapy. **Bulletin of World Health Organization**, Geneva, Switzerland, v.6, n.63, p.965-981, 1985.
- FIGUEIREDO, M.L.; PRAXEDES, S.C.; OLIVEIRA, A.K.D.; CÂMARA, F.A.A.Efeito do BAP na multiplicação *in vitro* de *Cattleya walkeriana*

- Gardn. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v.11, p.164, jun. 1999. Suplemento do CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 7., 1999, Brasília.
- FRANÇA, S. C. Abordagens biotecnológicas para obtenção de substâncias ativas. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; et al. (org.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre, Florianópolis: UFRGS/UFSC, 1999. p.101-121.
- GASPAR, T.; KEVERS, C.; PENEL, C.; et al. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, Columbia, v.32, p.272-289, Oct./Dec. 1996.
- GEORGE, E.F. The components of culture media. In: GEORGE, E.F. (ed.). **Plant propagation by tissue culture: part 1 the technology**. 2.ed. England: Exegetics, 1993a. Cap.9. p.275-285.
- GEORGE, E.F. Plant growth regulators. In: GEORGE, E.F. (ed.). **Plant propagation by tissue culture: part 1 the technology**. 2.ed. England: Exegetics, 1993b. Cap.11. p.420-479.
- GOMES, G.A.C.; PAIVA, R.; PAIVA, P.D.O. Acimação de plântulas de moreira (*Maclura tinctoria*) obtidas *in vitro*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v.11, p.96, jun. 1999. Suplemento do CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 7., 199, Brasília.
- GOTTLIEB, O.R.; BORIN, M.R.M.B. Natural products research in Brazil. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.49, n.5/6, p.315-320, 1997.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (eds). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPq, 1990. p.99-170.
- GUANG-ZHI, Z. *Anisodus acutangulus*: Production of scopolamine and hyoscyamine in cell cultures. In: BAJAJ, Y. P. S. (ed.) **Medicinal and Aromatic Plant 2**. Berlin: Springer-Verlag, 1989. p.23-46. (Biotechnology in Agriculture and Forestry, 7)
- ISHIDA, J.S. : PASQUAL, M.; RAMOS, J.D. et al. Efeitos dos sais do "MS", ácido indolbutírico, sacarose e ágar sobre o enraizamento *in vitro* de brotações adventícias do porta-enxerto de macieira "M-7". **Revista**

- Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v.5, n.1, p.105, jun. 1993. Suplemento do CONGRESSO BRASILEIRO DE FISIOLOGIA VEGETAL, 4., 1993, Fortaleza.
- ISHIKURA, N. *Cryptomeria japonica* Don (Japanese Cedar): in vitro production of volatile oils. In: BAJAJ, Y. P. S.(ed). **Medicinal and Aromatic Plant 2**. Berlin: Spring-Verlag, 1989. p.129-134. (Biotechnology in Agriculture and Forestry, 7)
- JÁCOME, R.L.R.P.; OLIVEIRA, A.B.; RASLAN, D.S.; MÜLLER, A.; WAGNER, H. Análise de naftoquinonas em extratos brutos de raízes de *Zeyheria montana* M. (bolsa-de-pastor). **Química Nova**, São Paulo, v.2, n.22, p.175-177, 1999.
- JOLY, A.B. **Botânica: chaves de identificação**. São Paulo: Nacional, 1970. 159p.
- JOLY, A.B. **Botânica: introdução a taxonomia vegetal**. 11.ed. São Paulo: Nacional, 1993. p.578.
- KLAYMAN, D. L. Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. **Science**, London, v.228, n.4703, p.1049-1055, May 1985.
- KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J.H. **Química farmacêutica**. São Paulo: Guanabara Dois, 1982. p.335-336.
- KRIKORIAN, A.D.; KELLY, K.; SMITH D.L. Hormones in tissue culture and micropropagation. In: DAVIES, P.J. (ed.) **Plant hormones and their role in plant growth and development**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1988. p.593-613.
- KURTZ, S. L.; HARTMAN, R. D.; CHU, I. Y. E. Current methods of commercial micropropagation. In: **Cell Culture and somatic cell genetics of plants**. California: Academic Press, 1991. v.8, p.7-37..
- LAMBERT, J. B.; SHURVELL, H.F.; LIGHTNER, D.A.; COOKS, R.G. **Organic structural spectroscopy**. New Jersey: Prentice-Hall, 1998. 568p.
- LAMEIRA, O.A. **Propagação in vitro e in vivo, dinâmica de crescimento de células, nutrição e identificação de flavonóides em erva-baleeira (*Cordia***

- verbenacea* L.). Lavras, MG: UFLA, 1997. 87p. (Tese - Doutorado em Fitotecnia).
- LAMEIRA, O.A.; COSTA, M.P.; PINTO, J.E.B.P.; SANTIAGO, E.J.A. Propagação clonal *in vitro* de *Cephaelis ipecacuanha* A. Richard através de segmentos internodais. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, Brasília, v.5, n.1, p.100, jun. 1993. Suplemento do CONGRESSO BRASILEIRO DE FIOLOGIA VEGETAL, 4., 1993, Fortaleza.
- LLOYD, G.; McCOWN, B. **Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture.** *Int. Plant Prop. Soc. Proc.*, n.30, p.421-427, 1980.
- MARTINS, D.(dirceum@ufba.br).E-mail para Sociedade Brasileira de Química(pn-net@SBQ.Org.BR.[mensagem capturada em 14 de jul.1999.].
- MARTINS, M. **Utilização de anticorpos para caracterização da síntese de esporamina em diferentes tecidos de *Ipomoea batatas* obtidos de plantas cultivadas *in vivo* e *in vitro*.** Lavras: UFLA, 1997. 71p. (Dissertação - Mestrado em Fisiologia Vegetal).
- MATOS, F.J.A. **Introdução à fitoquímica experimental.** Fortaleza: UFC, 1988. 126p.
- MATOS, F.J.A. Living pharmacies. *Ciência e Cultura*, São Paulo, v.49, n.5/6, p.409-412, 1997.
- MIACHIR, J.I. **Proposição de um protocolo de cultura de tecidos para produção de compostos secundários para *Curcuma zedoaria* Roscoe.** Piracicaba, SP: ESALQ, 1992. 126p. (Dissertação - Mestrado em Ciências).
- MISAWA, M.; HAYASHI, M.; TAKAYAMA, S.A Cumulation of antineoplastic agents by plant tissue cultures. In: NEUMANN, K.H.; BARZ, W.; REINHARD, E. **Primary and secondary metabolism of plant cell cultures.** Berlin: Springer-Verlag, 1985. p.235-246.
- MODESTO, Z.M.M.; SIQUEIRA, N.J.B. **Botânica.** São Paulo: EPU, 1981. n.p. Currículo de Estudos de Biologia.
- MORS, W. Plantas medicinais. *Ciência Hoje*, São Paulo, v.1, n.3, p.14-19, 1982.

- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-479, 1962.
- OLIVEIRA, J. E. Z. Variabilidade isozimática e do teor de óleo essencial em acessos de *Bidens pilosa* L. Viçosa, MG: UFV, 1997. 72p. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento).
- PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S. **Introduction to spectroscopy - a guide for students of organic chemistry**. 2.ed. Washington: Harcourt Brace College, 1996. 511p.
- PEREIRA, F.D. Propagação *in vitro* e identificação de metabólitos secundários em chapéu de couro (*Echinodorus cf scaber* Rataj), uma planta medicinal. Lavras, MG: UFLA, 1999. 111p. (Dissertação - Mestrado em Fisiologia Vegetal).
- PEREIRA, P.S.; PEREIRA, A.M.S.; DIAS, D.A.; FRANÇA, S.C. Influência de auxinas, citocininas e luz na indução e manutenção de calos de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray.. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v.5, n.1, p.102, jun. 1993. Suplemento do CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 4., 1993, Fortaleza.
- PETRI, G.; BAJAJ, Y.P.S. *Datura spp.*: in vitro regeneration and the production of tropanes. In: BAJAJ, Y.P.S. (ed.) **Medicinal and Aromatic Plant 2**. Berlin: Springer-Verlag, 1989. p.135-161. (Biotechnology in Agriculture and Forestry, 7)
- PIERIK, R.L.M. **In vitro culture of higher plants**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1987. 344p.
- PINTO, J.E.B.P.; PASQUAL, M. **Introdução a cultura de tecidos**. Lavras: ESAL, 1990. 73p. (Apostila).
- PIO CORREA, M. Marmelinho. In: **DICIONARIO das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal/Ministério da Agricultura, 1978. v.5, p.153.
- PLETSCH, M. Compostos naturais biologicamente ativos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Uberlândia, v.4, p.12-15, jan/fev, 1998.

- RIBEIRO, A.; PILÓ-VELOSO, D.; HOWARTH, O.; ROMANHA, A.J.; ZANI, C.L. Constituintes tripanossomicidas da *Trixis vauthieri* DC (Asteraceae). In: SEMINÁRIO MINEIRO DE PLANTAS MEDICINAIS, 5., 1999, Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora: ICB/UFJF, 1999. p.8.
- ROBBERS, J.E.; SPEED IE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e farmacobiotecnologia**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1997. 372p.
- RODRIGUES, A.C.; FACHINELLO, J.C.; FORTES, G.R.L. et al. Estabelecimento *in vitro* de *Prunus* sp. Em diferentes meios de cultivo. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v.11, p.76, jun. 1999. Suplemento do CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 7., 1999, Brasília.
- SAITO, M.L.; OLIVEIRA, F.; ALVARENGA, M.A. Alantoína e outros constituintes químicos de *Cordia ecalyculata* Vell. **Revista de Farmacia e Bioquímica da USP**, São Paulo, v.1, n.21, p.14-19, jan./jun. 1985.
- SATO, A.Y.; MARIA, J.; JUNQUEIRA, C.S. Efeito da concentração de nitrato de amônio no desenvolvimento *in vitro* da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) com e sem BAP. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v.11, p.78, jun. 1999. Suplemento do CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 7., 1999, Brasília.
- SAKUTA, M.; KOMAMINE, A. Cell growth and accumulation of secondary metabolites. In: CONSTABEL, F.; VASIL, I.K. (eds.). **Cell culture and somatic cell genetics of plants: cell culture in phytochemistry**. San Diego: Academic Press, v.4, cap.5, p.97-114, 1987.
- SCRAGG, A.H. Secondary products from cultured cells and organs:II.Large scale culture. In: DIXON, R.A.; GONZALES, R.A. (eds). **Plant Cell Culture: a practical approach**. 2.ed. Oxford: Oxford University Press, 1994. (The practical Approach Series)
- SEABROOK, J.E. A. Laboratory culture. In: STABA,E.J. (ed). **Plant tissue culture as a source of biochemicals**. Boca Raton: CRP Press,1980. p.1-20.
- SHRINER, R.L.; FUSON, R.C.; CURTIN, D.V. **Identificação sistemática dos compostos orgânicos: manual de laboratório**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1983. p.12, 75-77.

- SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, C. ; MORRILL, T. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. 387p.
- SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *in vitro*. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, Cambridge, n.11, p.118-130, 1957.
- SMITH, R.M. **Plant tissue culture: techniques and experiments**. San Diego: Academic Press, 1992. 171p.
- STÖCKIGT, J.; OBITZ, P.; FALKENHAGEN, H.; LUTTERBACH, R.; ENDREB, S. Natural products and enzymes from plant cell cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v.43, p.97-109, 1995.
- SUDHA, C. G.; KRISHNAN, P. N.; PUSHPANGADAN, P. *In vitro* propagation of *Holostemma annulare* (Roxb.) Schum., a rare medicinal plant. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, Columbia, V.33, p.57-63, Jan./Mar. 1998.
- TABATA, M. Recent advances in the production of medicinal substances by plant cell cultures. In: BARZ, W.; REINHARD, E.; ZENK, M.H. (ed.). **Proceedings in life sciences - plant tissue cultures and its biotechnological applications**. Berlin: Springer-Verlag, 1977. p.3-16.
- TISSERAT, B. Embryogenesis, organogenesis na plant regeneration. In: DIXON, R.A. (ed.) **Plant cell culture, a practical approach**. Oxford: IRL Press, 1985. p.79-105.
- VALTUEÑA, J.A. Apresentação. In: ENCICLOPÉDIA das plantas mágicas: plantas mágicas. São Paulo: Planeta, 1998. v.40, p.14-15.
- VITTA, F.A. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Boraginaceae. **Boletim de Botânica**, São Paulo, n.13, p.235-239, 1992.
- WINK, M. Physiology of secondary product formation in plants. In: CHARLWOOD, B. V.; RHODES, M. J. C. (ed.). **Secondary products from plant tissue culture**. Oxford: Clarendon Press, 1990. p.23-42.

ANEXOS

ANEXO A		Página
TABELA 1 A	Resumo na análise de variância do número de brotações (NB), tamanho de brotações (TB), matéria fresca das brotações (MFB) e matéria seca das brotações (MSB) nas avaliações (30 e 45 dias) e tratamentos (MS; MS/2 e WPM) dos segmentos nodais de marmelinho cultivados in vitro. UFLA, Lavras, MG, 2000.....	77
TABELA 2 A	Resumo na análise de variância do número de raiz (NR), tamanho de raiz (TR), matéria fresca da raiz (MFR) e matéria seca da raiz (MSR) nas avaliações (30 e 45 dias) e tratamentos (MS; MS/2 e WPM) dos segmentos nodais de marmelinho cultivados in vitro. UFLA, Lavras, MG, 2000.....	78
TABELA 3 A	Resumo da análise de variância para TB (tamanho de brotações em centímetros); NB (número de brotações) e PSPA (peso seco da parte aérea em gramas) em segmentos nodais de marmelinho em concentrações crescentes de BAP no meio WPM. UFLA, Lavras, MG, 2000.....	79
TABELA 4 A	Regressão polinomial para TB (tamanho de brotações em centímetros); NB (número de brotações) e PSPA (peso seco da parte aérea em gramas) em segmentos nodais de marmelinho em concentrações crescentes de BAP no meio WPM. UFLA, Lavras, MG, 2000.....	79

TABELA 1 A Resumo na análise de variância do número de brotações (NB), tamanho de brotações (TB), matéria fresca das brotações (MFB) e matéria seca das brotações (MSB) nas avaliações (30 e 45 dias) e tratamentos (MS; MS/2 e WPM) dos segmentos nodais de marmelinho cultivados in vitro. UFLA, Lavras, MG, 2000.

CAUSA DA VARIAÇÃO	G.L.	QUADRADO MÉDIO			
		NB	TB	MFB	MSB
Avaliação	1	0,0125408 ^{NS}	33,6066699 [*]	0,2064429 [*]	0,0018166 [*]
Tratamento	2	0,0430995 ^{NS}	2,6253137 ^{NS}	0,0045131 ^{NS}	0,0000313 ^{NS}
Avaliação X Tratamento	2	0,0222095 ^{NS}	0,3319782 ^{NS}	0,0029750 ^{NS}	0,0000058 ^{NS}
Repetição (Avaliação. X Tratamento)	18	0,0333798	2,6277083	0,0106917	0,0001636
Resíduo	72	0,0330559	1,8361805	0,008409	0,0000811
TOTAL	95				

^{NS} não significativo.

^{*} significativo a nível de 5% de probabilidade

TABELA 2 A Resumo na análise de variância do número de raiz (NR), tamanho de raiz (TR), matéria fresca da raiz (MFR) e matéria seca da raiz (MSR) nas avaliações (30 e 45 dias) e tratamentos (MS; MS/2 e WPM) dos segmentos nodais de marmelinho cultivados in vitro. UFLA, Lavras, MG, 2000.

CAUSA DA VARIAÇÃO	G.L.	QUADRADO MÉDIO			
		NR	TR	MFR	MSR
Avaliação	1	18,1429803 **	27,9503789 ^{ns}	0,1023120 ^{ns}	0,1762763 **
Tratamento	2	10,3563639 *	136,6068923 **	0,0877318 ^{ns}	0,1760469 **
Avaliação X Tratamento	2	1,7128092 ^{ns}	7,0129327 ^{ns}	0,0029455 ^{ns}	0,1664102 **
Repetição (Avaliação. X Tratamento)	18	0,4052515	4,4498606	0,0113196	0,0001534
Resíduo	72	0,6507349	6,1715286	0,0102849	0,0001766
TOTAL	95				

^{ns} não significativo.

** significativo a nível de 1% de probabilidade

* significativo a nível de 5% de probabilidade.

TABELA 3 A Resumo da análise de variância para TB (tamanho de brotações em centímetros); NB (número de brotações) e PSPA (peso seco da parte aérea em gramas) em segmentos nodais de marmelinho em concentrações crescentes de BAP no meio WPM.. UFLA, Lavras, MG, 2000.

FONTE DE VARIACÃO	G.L.	QUADRADO MÉDIO		
		TB	NB	PSPA
Regressão Linear	1	53,6787005 **	102,0833333 **	0,0002279 *
Regressão Quadrática	1	19,5363993 *	0,0277778 ^{ns}	0,0000483 ^{ns}
Resíduo	15	2,5390233	4,1888889	0,0000490

* Significativo a 5% de probabilidade.

** Significativo a 1% de probabilidade.

^{ns} não significativo.

TABELA 4 A Regressão polinomial para TB (tamanho de brotações em centímetros); NB (número de brotações) e PSPA (peso seco da parte aérea em gramas) em segmentos nodais de marmelinho em concentrações crescentes de BAP no meio WPM.. UFLA, Lavras, MG, 2000.

FONTE DE VARIACÃO	EQUAÇÃO	COEFICIENTE DE DETERMINAÇÃO (R ²)
Tamanho de Brotações	$Y = 5,7 - 13,07X + 8,84X^2$	R ² = 1,0
Número de Brotações	$Y = 1,03 + 5,84X$	R ² = 0,9
Peso Seco da Parte Aérea	$Y = 0,03 - 0,01X$	R ² = 0,8