

**MICROPROPAGAÇÃO, INDUÇÃO DE CALOS,
CARACTERÍSTICAS ANATÔMICAS E
MONITORAMENTO DOS BIOMARCADORES
DE *Uncaria tomentosa* WILLDENOW EX
ROEMER & SCHULTES DC E *Uncaria guianensis*
(AUBLET) GMELIN (UNHA DE GATO)**

RITA DE CASSIA ALVES PEREIRA

2004

RITA DE CASSIA ALVES PEREIRA

**MICROPROPAGAÇÃO, INDUÇÃO DE CALOS,
CARACTERÍSTICAS ANATÔMICAS E MONITORAMENTO
DOS BIOMARCADORES DE *Uncaria tomentosa* WILLDENOW EX
ROEMER & SCHULTES DC E *Uncaria guianensis* (AUBLET)
GMELIN (UNHA DE GATO)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fitotecnia, para a obtenção do título de “Doutor”.

Orientador

Prof. Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto

**LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2004**

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

Pereira, Rita de Cassia Alves

Micropropagação, indução de calos, características anatômicas e monitoramento dos biomarcadores de *Uncaria tomentosa* Willdenow Ex Roemer & Schultes DC e *Uncaria guianensis* (Aublet) Gmelin (Unha de Gato) / Rita de Cassia Alves Pereira. -- Lavras : UFLA, 2004.

186 p. : il.

Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Micropropagação. 2. Calo. 3. Alcalóide. 4. Característica anatômica.
5. Unha de gato. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD - 583.320446

- 631.53

RITA DE CASSIA ALVES PEREIRA

**MICROPROPAGAÇÃO, INDUÇÃO DE CALOS,
CARACTERÍSTICAS ANATÔMICAS E MONITORAMENTO
DOS BIOMARCADORES DE *Uncaria tomentosa* WILLDENOW EX
ROEMER & SCHULTES DC E *Uncaria guianensis* (AUBLET)
GMELIN (UNHA DE GATO)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fitotecnia, para a obtenção do título de “Doutor”.

APROVADA em 17 de dezembro de 2004

Prof^ª. Dr^ª. Ligia Maria Marino Valente - UFRJ

Prof. Dr. Evaristo Mauro de Castro - UFLA

Prof. Dr. Renato Mendes Guimarães - UFLA

Pesq. Dr. Leonardo Ferreira Dutra - Embrapa Florestas

**Prof. Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto
UFLA
(Orientador)**

**LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL**

Aos meus pais,

Abdenago (“*in memoriam*”) e Maria de Lourdes,

pelo incentivo, carinho, orações, amor e fé de que

tudo será melhor

OFEREÇO

À minha família, em especial às minhas irmãs, Maria das Graças,

Maria José, Arlete, Luíza, Fátima e minha sobrinha Ana Célia

DEDICO

“O ser humano está cada vez mais consciente da necessidade de buscar a integração do seu bem-estar físico e mental.

A partir dessa consciência busca soluções preventivas e terapêuticas que integrem a sabedoria da tradição, o conhecimento científico e a riqueza da natureza”.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela grandiosidade da vida.

A minha família pela confiança, apoio, carinho, compreensão durante todas as fases importantes de minha vida.

A Embrapa em especial ao Centro de Pesquisa Agroflorestal do Acre pela liberação para a realização do curso, bem como a oportunidade de aperfeiçoamento profissional e suporte financeiro.

A Universidade Federal de Lavras, através do Departamento de Agricultura pela oportunidade de realização do curso de Doutorado.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto, pela orientação, compreensão, amizade e ensinamentos, durante todo o curso.

A Profa Dra. Ligia Maria Marino Valente, por sua amizade, dedicação, confiança, incentivo, apoio nos trabalhos de fitoquímica, e ensinamentos para a vida.

Ao Professor Dr. Evaristo Mauro de Castro pelo apoio, amizade, atenção, colaboração científica e participação na banca examinadora.

Ao Professor Dr. Renato Guimarães pelo apoio científico e participação na banca examinadora.

Ao Pesquisador da Embrapa Floresta Dr. Leonardo Ferreira Dutra pela colaboração e participação na banca examinadora.

Ao Professor Dr. Gastão Espíndola pela grande força, amizade, e motivação.

A Universidade Federal do Rio de Janeiro, em especial aos Professores Luiz Nelson Ferreira Gomes, José Luis Mazzei da Costa, Luiz Antonio d'Ávila, Francisco Radier de Aquino-Neto e as estudantes de Iniciação Científica Priscila, Flaviane e Giselle pela colaboração nas análises dos trabalhos de fitoquímica.

A Fundação Osvaldo Cruz (RJ) através do Instituto de Tecnologia em Fármacos em especial aos Pesquisadores Antonio Carlos Siani, Paulo José Coelho Benevides e Maria Beatriz da Silva Almeida pelo apoio e permissão de utilizar as instalações para realização dos trabalhos de fitoquímica.

Ao colega Pesquisador da Embrapa Acre Dr. João Alencar de Souza pela amizade e apoio na realização deste trabalho.

Aos amigos de Pós-graduação Fabiano, Juliana, Flavia, Suzan, Regina Célia, Nilmar, Ricardo, Ana Valéria, Ana Paula, Roberto Dantas, Sandra e Mariana, pelos momentos de estudo, companheirismo e amizade.

Ao técnico de laboratório de Cultura de Tecidos, Evaldo pela colaboração na condução dos experimentos e aos funcionários do Horto de Plantas Medicinais Luiz e Geraldo pela ajuda e atenção sempre dispensada.

Aos estudantes de graduação Sara Dousseau, Adelita, Adriana, Vivian, e Alan, pela amizade e preciosa ajuda na realização dos experimentos.

Aos colegas da Embrapa Acre em especial aos pesquisadores Tadeu Marinho, João Batista, Luis Cláudio, Judson, Marcelo, Ivandir, Celso, Joana, e aos funcionários Francisco de Sales, Fátima, Anaide, Cila, Claudia, Suely e Zenaide por todo o carinho, amizade e apoio.

Ao Chefe Geral da Embrapa Acre Dr. Marcus Vinicius d'Oliveira e ao Chefe Geral da Embrapa Agroindústria Tropical Dr. Lucas Antonio de Souza Leite, pelo apoio, compreensão e solidariedade.

Aos médicos: Dr.Roberto Guimarães, Dr. Célio Galante, Dr. Wagner Brand, Dr. Mansur e Dr. Mário Hinoche, pelo profissionalismo e dedicação , nos momentos que necessitei.

As amigas: Profa. Nelly Furbetta, Márcia, (bibliotecária da UFLA), Ricardina, Angélica, Ana, Enilda, Isabel, Rosângela, Mila e Kelly.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para que eu pudesse concluir mais uma etapa da minha vida.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	i
LISTA DE FIGURAS.....	iv
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
CAPÍTULO I.....	1
1 INTRODUÇÃO GERAL	2
2 REFERENCIAL TEÓRICO	7
2.1 Caracterização das espécies e importância	7
2.1.1 Propriedades terapêuticas	10
2.2 Metabólitos primários e secundários	11
2.3 A Química dos alcalóides	12
2.4 Fitoconstituintes do gênero <i>Uncaria</i>	16
2.5 Os alcalóides de <i>Uncaria tomentosa</i> e <i>Uncaria guianensis</i>	17
2.6 Micropropagação	21
2.6.1 Reguladores de Crescimento	23
2.6.2 Meios de cultivo.....	24
2.6.3 Aclimatização	26
2.6.4 Anatomia das plantas micropropagadas.....	27
2.7 Produção de metabólitos secundários <i>in vitro</i>	29
2.8 Métodos analíticos no controle de qualidade de matéria primas vegetais. ...	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36
CAPÍTULO II - MICROPROPAGAÇÃO DE <i>Uncaria guianensis</i> (AUBL) GMEL. E <i>Uncaria tomentosa</i> (WILLD.) DC.	41
RESUMO.....	42
ABSTRACT.....	43
1 INTRODUÇÃO.....	44

2 MATERIAL E MÉTODOS	47
2.1 Estabelecimento <i>in vitro</i>	47
2.1.1 Procedência das sementes	47
2.1.2 Desinfestação das sementes	47
2.1.3 Efeito da sacarose e concentração do meio MS na germinação <i>in vitro</i> de embriões de <i>Uncaria guianensis</i>	48
2.1.4 Efeito de diferentes concentrações de benzilaminopurina na indução de brotações em embriões de <i>Uncaria guianensis</i>	48
2.1.5 Efeito da posição do explante na regeneração de brotos axilares <i>in vitro</i> de <i>Uncaria guianensis</i>	49
2.1.6 Indução de brotações em segmentos nodais de <i>Uncaria tomentosa</i>	49
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
3.1 Estabelecimento <i>in vitro</i>	51
3.1.1 Efeito da sacarose e concentração do meio MS na germinação <i>in vitro</i> de embriões de <i>Uncaria guianensis</i>	51
3.1.2 Efeito de diferentes concentrações de benzilaminopurina na indução de brotações em embriões de <i>Uncaria guianensis</i>	53
3.1.3 Efeito de giberelina e posição do explante no alongamento <i>in vitro</i> de <i>Uncaria guianensis</i>	56
3.1.4 Indução de brotações em segmentos nodais de <i>Uncaria tomentosa</i>	62
4 CONCLUSÕES.....	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
CAPÍTULO III - INDUÇÃO E ESTABELECIMENTO DA CURVA DE CRESCIMENTO DE CALOS DE <i>Uncaria guianensis</i> (AUBL.) GMEL. E <i>Uncaria tomentosa</i> (WILD.) DC.	72
RESUMO.....	73
ABSTRACT.....	74
1 INTRODUÇÃO.....	75
2 MATERIAL E MÉTODOS	79
2.1 Efeito de diferentes concentrações de auxinas na indução de calos em <i>Uncaria guianensis</i> e <i>Uncaria tomentosa</i>	79
2.2 Efeito de diferentes concentrações de Picloram na indução de calos em explantes foliares de <i>Uncaria guianensis</i>	80

2.3 Estabelecimento da curva de crescimento de calos de <i>Uncaria guianensis</i> cultivados em meio suplementado com diferentes auxinas.....	81
2.4 Influência da origem do explante e concentração de Picloram na indução de calos em <i>Uncaria tomentosa</i>	82
2.5 Estabelecimento da curva de crescimento de calos de <i>Uncaria tomentosa</i> ..	83
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	84
3.1 Efeito de diferentes concentrações de auxinas na indução de calos em <i>Uncaria guianensis</i>	84
3.2 Efeito de diferentes concentrações de auxinas na indução de calos em <i>Uncaria tomentosa</i>	86
3.3 Efeito de diferentes concentrações de Picloram na indução de calos em explantes foliares <i>in vitro</i> de <i>Uncaria guianensis</i>	87
3.4 Estabelecimento da curva de crescimento de calos de <i>Uncaria guianensis</i> cultivados em meios suplementados com diferentes auxinas.....	89
3.5 Influência da origem do explante e concentração de Picloram na indução de calos em <i>Uncaria tomentosa</i>	92
3.6 Estabelecimento da curva de crescimento de Calos de <i>Uncaria tomentosa</i> ..	95
4 CONCLUSÕES.....	99
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100
CAPÍTULO IV - ANATOMIA FOLIAR COMPARADA DE <i>Uncaria guianensis</i> (AUBL.) GMEL. E <i>Uncaria tomentosa</i> (WILLDENOW EX ROEMER & SCHULTES) COMO SUBSÍDIO AO ESTUDO DE MICROPROPAGAÇÃO <i>IN VITRO</i>	104
RESUMO.....	105
ABSTRACT.....	106
1 INTRODUÇÃO.....	107
2 MATERIAL E METODOS	110
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	113
3.1 Anatomia comparada de <i>Uncaria guianensis</i> propagada <i>in vitro</i> e durante a aclimatização	113
3.2 Anatomia comparada de <i>Uncaria tomentosa</i> propagada <i>in vitro</i> e durante a aclimatização	121
4 CONCLUSÕES.....	129

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 130

CAPÍTULO V - MONITORAMENTO DOS ALCALÓIDES OXINDÓLICOS BIOMARCADORES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) E CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD) EM MATERIAIS VEGETATIVOS *IN VIVO* E *IN VITRO* E CALOS DE *Uncaria guianensis* E *Uncaria tomentosa*..... 134

RESUMO..... 135

ABSTRACT..... 136

1 INTRODUÇÃO..... 137

2 MATERIAL E MÉTODOS 141

2.1 Obtenção do material vegetal *Uncaria tomentosa* e *Uncaria guianensis* ... 141

2.1.1. A partir de calos originados de plântulas *in vitro* 141

2.1.2 A partir de calos originados de plântulas *in vivo* 142

2.1.3 A partir das plântulas cultivadas *in vitro* 142

2.1.4 A partir das plantas aclimatadas 143

2.1.5 A partir das plantas cultivadas *in vivo* 143

2.1.6 A partir de cascas das sementes 144

2.2 Análise cromatográfica do material vegetal 144

2.2.1 Amostra de referência (UTFA) 144

2.2.2 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)* 145

2.2.2.1 Preparação dos extratos brutos utilizados nas análises por CCD () 145

2.2.2.2 Preparação dos extratos semi-purificados utilizados nas análises por CCD..... 146

2.2.2.3 Análise cromatografia por CCD 146

2.2.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)..... 147

2.2.3.1 Preparação das frações enriquecidas em alcalóides para análise por CLAE 147

2.2.3.2 Preparação das soluções para análise por CLAE..... 147

2.2.3.3 Sistema cromatográfico utilizado nas análises por CLAE..... 147

2.2.3.4 Curva de calibração de isopteropodina 148

2.2.3.5 Identificação dos alcalóides oxindólicos biomarcadores nos cromatogramas em CLAE..... 148

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 150

3.1 Análise por Cromatografia de Camada Delgada (CCD)..... 150

3.1.1	Rendimento dos extratos metanólicos brutos e semi-purificados do material vegetal analisado	150
3.1.2	Análise por CCD dos calos originados de plântulas <i>in vitro</i>	150
3.1.3	Análise por CCD dos calos originados de folhas de plantas <i>in vivo</i> e plântulas de <i>Uncaria tomentosa</i> e <i>Uncaria guianensis</i>	151
3.2	Análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	152
3.2.1	Rendimento das frações enriquecidas em alcalóides utilizadas nas análises por CLAE.....	152
3.2.2	Identificação dos alcalóides oxindólicos biomarcadores nos cromatogramas em CLAE	152
3.2.3	Curva de calibração de isopteropodina	155
3.2.4	Teor de alcalóides totais em relação a isopteropodina nas amostras analisadas.....	156
3.2.5	Análise por CLAE dos alcalóides oxindólicos biomarcadores nas folhas das plantas-matrizes e cascas de sementes de <i>U. tomentosa</i> e <i>U. guianensis</i>	157
3.2.6	Análise por CLAE dos alcalóides oxindólicos biomarcadores nos calos originados de plântulas <i>in vivo</i>	158
3.2.7	Análise por CLAE dos alcalóides oxindólicos biomarcadores em plântulas <i>in vitro</i>	159
3.2.8	Análise por CLAE dos alcalóides oxindólicos a partir de folhas de plantas aclimatadas aos 30 e 45 dias	160
4	CONCLUSÕES.....	162
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	164
	ANEXOS.....	167

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Pág.

- TABELA 1.1.** Principais diferenças botânicas entre *Uncaria tomentosa* e *Uncaria guianensis*. UFLA, Lavras-MG, 2004. 10
- TABELA 1.2.** Principais alcalóides encontrados em *Uncaria guianensis* e *Uncaria tomentosa*. UFLA, Lavras-MG, 2004. 18

CAPÍTULO II

- TABELA 2.1.** Porcentagem de germinação de embriões e comprimento de brotações de *Uncaria guianensis* inoculados em diferentes concentrações de meio MS na ausência e presença de sacarose UFLA, Lavras-MG, 2004. 51
- TABELA 2.2.** Porcentagem de germinação, coloração, número de brotações, porcentagem de explantes que formaram raízes, comprimento de raízes, número médio de raízes/explantes, biomassa fresca e se e biomassa fresca de raízes a partir de embriões de *Uncaria guianensis* aos 60 dias de cultivo em meio MS suplementado com diferentes concentrações de BAP UFLA, Lavras-MG, 2004. 54
- TABELA 2.3.** Número médio de brotações em explantes foliares de unha de gato com diferentes números de gemas, inoculados em posição horizontal e posição vertical e ou não com GA₃. UFLA, Lavras-MG, 2004. 57
- TABELA 2.4.** Comprimento médio de brotações em explantes foliares de unha de gato com diferentes números de gemas, inoculados em posição horizontal e posição vertical e ou não com GA₃. UFLA, Lavras-MG, 2004. 58
- TABELA 2.5.** Média de fitomassa seca de brotações em explantes foliares de unha de gato com diferentes números de gemas, inoculados em posição horizontal e posição vertical e ou não com GA₃. UFLA, Lavras-MG, 2004. 61

CAPÍTULO III

- TABELA 3.1.** Efeito de diferentes auxinas na percentagem de indução e crescimento de calos obtidos a partir de explantes foliares de plantas cultivadas *in vivo* de *Uncaria guianensis*. UFLA, Lavras-MG, 2004. 84
- TABELA 3.2.** Efeito de diferentes auxinas na percentagem de indução e crescimento de calos obtidos a partir de explantes foliares de plantas cultivadas *in vivo* de *Uncaria tomentosa*. UFLA, Lavras-MG, 2004. 86
- TABELA 3.3.** Percentual de área coberta com calos, biomassa fresca e seca de calos em segmentos foliares de *Uncaria guianensis* cultivados em meio de cultivo MS suplementado com diferentes concentrações de Picloram. UFLA, Lavras - MG, 2004. 88
- TABELA 3.4.** Percentagem de área coberta de calos, biomassa fresca e coloração, em explantes foliares de *Uncaria tomentosa*, cultivados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de Picloram. UFLA, Lavras - MG, 2004. 93

CAPÍTULO IV

- TABELA 4.1.** Espessura média de tecidos e espessura total do limbo foliar de *U. guianensis* obtidas pela propagação *in vitro*, submetidas aos diferentes períodos de aclimatização e plantas adultas cultivadas em casa-de-vegetação. Lavras, MG, 2004. 114
- TABELA 4.2.** Médias do número de estômatos/mm², diâmetro polar e diâmetro equatorial dos estômatos na face abaxial em indivíduos de *U. guianensis* obtidos pela propagação *in vitro*, submetidas a períodos de aclimatização e plantas adultas cultivadas em casa-de-vegetação. UFLA, Lavras-MG, 2004. 116
- TABELA 4.3.** Espessura média de tecidos e espessura total do limbo foliar de *U. tomentosa* obtidas pela propagação *in vitro*, submetidas aos diferentes períodos de aclimatização e plantas adultas cultivadas em casa-de-vegetação. UFLA, Lavras-MG, 2004. 123

TABELA 4.4. Médias do número de estômatos/mm², diâmetro polar e diâmetro equatorial dos estômatos na superfície abaxial em indivíduos de *U. tomentosa* obtidos pela propagação *in vitro*, submetidas a períodos de aclimatização e plantas adultas cultivadas em casa-de-vegetação. UFLA, Lavras-MG, 2004. **127**

CAPÍTULO V

TABELA 5.1. Tempos de retenção relativos a isopteropodina dos alcalóides oxindólicos biomarcadores presentes nas amostras de *U. tomentosa* e *U. guianensis*, analisados por CLAE. UFLA/IQ/UFRJ, Lavras-MG, 2004. **153**

TABELA 5.2. Áreas dos picos das diversas concentrações de isopteropodina padrão para construção da curva de calibração para doseamento do teor de alcalóides por CLAE. UFLA/ IQ/UFRJ, Lavras-MG, 2004. **155**

TABELA 5.3. Teor de alcalóides totais determinados nos extratos metanólicos relativos às análises em cromatografia líquida de alta eficiência. UFLA/IQ/URFJ Lavras- MG, 2004. **157**

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I		Pág.
FIGURA 1.1.	Detalhes dos ramos com espinhos de <i>Uncaria tomentosa</i> e <i>Uncaria guianensis</i> UFLA, Lavras- MG, 2004.	9
FIGURA 1.2.	Principais classes de alcalóides. UFLA, Lavras-MG, 2004. ...	16
FIGURA 1.3.	Principais alcalóides presentes em <i>Uncaria tomentosa</i> e <i>Uncaria guianensis</i> . UFLA, Lavras-MG, 2004.	19
FIGURA 1.4.	Compostos encontrados nas espécies de <i>Uncaria tomentosa</i> e <i>Uncaria guianensis</i> . UFLA, Lavras-MG, 2004.	20
CAPÍTULO II		
FIGURA 2.1	Plântulas obtidas <i>in vitro</i> a partir de sementes de <i>Uncaria guianensis</i> após 34 dias de inoculação em meio com diferentes concentrações do meio MS na ausência (A) e presença de sacarose (B). UFLA, Lavras-MG, 2004.	53
FIGURA 2.2	Efeito de diferentes concentrações de BAP na indução de brotações em embriões de <i>Uncaria guianensis</i> . UFLA, Lavras-MG, 2004.	56
FIGURA 2.3	Aspecto geral da interação entre posição do explante horizontal e vertical na presença e/ou ausência de GA ₃ e número de gemas iniciais obtidas por inoculação de segmentos nodais de <i>Uncaria guianensis</i> . UFLA, Lavras-MG, 2004.	60
FIGURA 2.4	Efeito da concentração de BAP sobre o número de brotações formadas a partir de segmentos nodais de <i>Uncaria tomentosa</i> em meio WPM. UFLA, Lavras-MG 2004.	62

FIGURA 2.5 Efeito da concentração de BAP sobre o comprimento das brotações formadas a partir de segmentos nodais de <i>Uncaria tomentosa</i> em meio WPM. UFLA, Lavras-MG 2004.	64
---	-----------

CAPÍTULO III

FIGURA 3.1. Aspecto de calos induzidos em explantes foliares de <i>Uncaria guianensis</i> , aos 50 dias de cultivo em meio MS suplementado com diferentes concentrações de auxinas. UFLA, Lavras - MG, 2004.	89
--	-----------

FIGURA 3.2. Curva de crescimento de calos de <i>Uncaria guianensis</i> a partir da fitomassa fresca cultivados em meio de cultivo suplementados com diferentes auxinas. UFLA, Lavras - MG, 2004.	90
--	-----------

FIGURA 3.3. Calos de <i>Uncaria guianensis</i> , cultivados em meio MS suplementados com diferentes concentrações de diferentes auxinas. UFLA, Lavras - MG, 2004.	92
---	-----------

FIGURA 3.4. Calogênese em explantes foliares de <i>Uncaria tomentosa</i> excisados de plantas germinadas <i>in vivo</i> (A) e de plântulas germinadas <i>in vitro</i> (B), inoculados em meio MS suplementados com diferentes concentrações de Picloram. UFLA, Lavras - MG, 2004.	94
---	-----------

FIGURA 3.5. Curva de crescimento de calos de <i>Uncaria tomentosa</i> , a partir da fitomassa fresca cultivados em meios suplementados com diferentes de auxinas. UFLA, Lavras-MG, 2004.	96
--	-----------

FIGURA 3.6. Aspecto dos calos de <i>Uncaria tomentosa</i> induzidos em meio de cultivo diferentes auxinas. UFLA, Lavras-MG, 2004.	97
---	-----------

CAPÍTULO IV

FIGURA 4.1. Folha de <i>Uncaria guianensis</i> , de plantas estabelecidas em casa-de-vegetação. UFLA, Lavras - MG, 2004.	113
--	------------

FIGURA 4.2. Seção transversal de folhas <i>U. guianensis</i> , evidenciando o mesofilo. UFLA, Lavras-MG, 2004.	117
FIGURA 4.3. Seção paradérmica de folhas de <i>Uncaria guianensis</i> . UFLA, Lavras-MG, 2004.	119
FIGURA 4.4. Seção transversal de folhas de <i>Uncaria guianensis</i> , evidenciando a nervura central. UFLA, Lavras-MG, 2004. ...	121
FIGURA 4.5. Seção transversal de folhas <i>U. tomentosa</i> , evidenciando o mesofilo. A- <i>in vitro</i> B-30 dias de aclimatização C-60 dias de aclimatização D-adultas estabelecidas em casa-de-vegetação. A barra corresponde a 50µm. UFLA, Lavras-MG, 2004.	122
FIGURA 4.6. Seção transversal de folhas de <i>Uncaria tomentosa</i> , evidenciando a nervura central. A- <i>in vitro</i> . B- 30 dias de aclimatização. C-60 dias de aclimatização. D- adultas estabelecidas em casa-de-vegetação. A barra corresponde a 100 µm. UFLA, Lavras-MG, 2004.	125
FIGURA 4.7. Seção transversal de folhas de <i>Uncaria tomentosa</i> , evidenciando a nervura central. A- <i>in vitro</i> . B-30 dias de aclimatização. C-60 dias de aclimatização. D- adultas estabelecidas em casa-de-vegetação. A barra corresponde a 100 µm. UFLA, Lavras-MG, 2004.	126

CAPÍTULO V

FIGURA 5.1. Estruturas químicas de alcalóides oxindólicos biomarcadores de <i>Uncaria guianensis</i> e <i>Uncaria tomentosa</i> . UFLA/UFRJ/DQI, Lavras-MG, 2004.	140
FIGURA 5.2. Esquema geral de obtenção de extratos metanólicos de <i>Uncaria tomentosa</i> e <i>Uncaria guianensis</i> . UFLA/UFRJ/DQI, Lavras-MG, 2004.	146

- FIGURA 5.3.** Placa cromatográfica para análise em CCD das amostras de plântulas de *Uncaria guianensis* e *Uncaria tomentosa*. UFLA/UFRJ/DQI, Lavras-MG, 2004. **151**
- FIGURA 5.4.** Cromatograma em CLAE da amostra certificada de referência (UTFA) com a identificação dos seis alcalóides biomarcadores das espécies estudadas. UFLA/IQ/UFRJ, Lavras-MG, 2004. ESP = especiofilina; UNCF = Uncarina F; MIT = mitrafilina; PT = pteropodina; IMIT = isomitrafilina; IPT = isopteropodina. **154**
- FIGURA 5.5.** Curva de calibração para doseamento do teor de alcalóides em CLAE relativo a isopteropodina. UFLA/IQ/UFRJ. Lavras, MG, 2004. **156**
- FIGURA 5.6.** Material vegetal utilizado para extração de alcalóides em CCD e CLAE. (A) = Calos; (B) 1 = plântula de *Uncaria guianensis*, 2 = plântula de *Uncaria tomentosa*; (C) = plantas de *Uncaria guianensis* aclimatadas aos 30 dias; (D) = plantas de *Uncaria guianensis* aclimatadas aos 45 dias; (E) = plantas de *Uncaria tomentosa* aclimatadas aos 30 dias; (F) = plantas de *Uncaria tomentosa* aclimatadas aos 45 dias; (G) = planta matriz de *Uncaria tomentosa* com 24 meses; (H) planta matriz de *Uncaria guianensis* com 24 meses. **161**

RESUMO

PEREIRA, Rita de Cássia Alves. **Micropropagação, indução de calos, características anatômicas e monitoramento por biomarcadores de *Uncaria tomentosa* Willdenow Ex Roemer & (Schultes) DC e *Uncaria guianensis* (Aublet) Gmelin (unha de gato)**. 2004. 186p. Tese (Doutorado em Agronomia) Universidade Federal de Lavras, Lavras- MG.¹

Dentre as diversas plantas medicinais encontradas na Amazônia destacam-se duas espécies conhecidas popularmente por “unha de gato”: *Uncaria guianensis* e *Uncaria tomentosa*. Suas propriedades medicinais são atribuídas a efeitos imuno-estimulantes, antiinflamatórios e inibidores de crescimento de células cancerígenas. Nos últimos anos a conservação desta espécie está sendo ameaçado, devido principalmente a coletas indiscriminadas. Em muitos casos, a solução para obtenção da matéria- prima é o cultivo das espécies condicionado a fatores ambientais e/ou genéticos, que influenciam na qualidade e quantidade de compostos químicos presentes nas plantas. Reconhecendo a necessidade de se produzir informações científicas sobre plantas medicinais bem como a carência de estudos sobre micropropagação de *Uncaria tomentosa* e *Uncaria guianensis*, os objetivos deste trabalho foram: estabelecer uma metodologia para multiplicação *in vitro* das duas espécies; avaliar o efeito de reguladores de crescimento na indução de calos; caracterizar alguns aspectos de anatomia foliar na condição *in vitro*, na fase de aclimatização e em plantas em casa de vegetação destas espécies; extrair e identificar constituintes químicos majoritários nestas plantas *in vitro* e *in vivo*. O melhor meio para indução de brotações múltiplas para *Uncaria guianensis* foi o MS; para *Uncaria tomentosa*, o WPM suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de BAP. Na indução de calos, a partir de explante foliares, o melhor tratamento se confirmou com a adição de picloram ao meio, para ambas as espécies. A curva de crescimento apresentou padrão sigmóide com cinco fases distintas, num período de 35 a 40 dias para as duas espécies. Com relação à anatomia foliar, os resultados indicaram que as plântulas *in vitro* possuem os tecidos foliares pouco desenvolvidos e alta densidade estomática, exigindo maiores cuidados na etapa inicial da aclimação. Por meio de análise de CCD/CLAE, verificou-se presença dos alcalóides oxindólicos nas amostras de folhas *in vivo* e *in vitro* e cascas de sementes das espécies em estudo.

¹ Comitê Orientador: Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto (Orientador)- UFLA, Dra Ligia Maria Marino Valente-UFRJ, Dr. Evaristo Mauro de Castro-UFLA.

ABSTRACT

PEREIRA, Rita de Cassia Alves. **Micropropagation, callus induction, anatomical characteristics and monitoring by biomarkers of *Uncaria tomentosa* (Willdenow Ex Roemer & Schultes) DC and *Uncaria guianensis* (Aublet) Gmelin (cat's claw).** 2004. 186p. Thesis (Doctorate in Agronomy) Federal University of Lavras, Lavras- MG.¹

Among various medicinal plants found in the Amazon two species known as “cat’s claw” are highlighted: *Uncaria guianensis* and *Uncaria tomentosa*. Their medicinal properties are attributed to their immuno-stimulating, anti-inflammatory and carcinogenic cell growth inhibitor effects. In recent years the preservation of these species has been threatened due to their indiscriminate harvest. In many cases, the right solution for obtaining the raw material is the cultivation of the species conditioned to its characteristic environmental and or genetic factors that influence the quality and quantity of the chemical compounds in the plants. Recognizing the necessity to have scientific information about the medicinal plants as well as the lack of studies on *Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis* micropropagation, this work has as objectives: the establishment of one methodology for the *in vitro* multiplication of the two species; the evaluation of the growth regulator effect in the callus induction; the characterization of several anatomical leaf aspects *in vitro*, in the acclimatization phase and in greenhouse plants from these species; the extraction and identification of the majority of chemicals constituent in the *in vitro* and *in vivo* plants. The best medium for multiple shoot induction of *Uncaria guianensis* was MS; for *Uncaria tomentosa* WPM supplied with 1,0 mg L⁻¹ BAP. Concerning callus induction, from leaf explants the better treatment was one which had picloram added to the medium for both species. The growth curve showed a sigmoidal pattern with five distinct phases in a period of 35 to 40 days for the two species. In respect to leaf anatomy, the results indicated that the *in vitro* plantlets have less developed leaf tissue and large stomatos numbers demanding much more care in the initial acclimatization phase. Using TLC/HPLC analysis, the presence of oxindole alkaloids *in vitro* and *in vivo* leaf samples and in seed shells from those species studied was verified.

¹ Guidance Committee: Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto (Advisor), UFLA, Dra Ligia Maria Marino Valente-UFRJ, Dr. Evaristo Mauro de Castro- UFLA.

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO GERAL

O homem, por sua necessidade de sobrevivência e pelo seu elevado poder de agente catalisador de transformações das matérias, apoiado nos avanços tecnológicos, vem ao longo dos tempos apurando sua intervenção com vistas à modificação do meio em que vive, buscando fontes alternativas de alimentos e de combate às moléstias, e várias outras formas capazes de ratificar sua prevalência, sendo os reinos animal e vegetal os principais reservatórios de sua afirmação.

No ano 3000 a.C., a China já se dedicava ao cultivo de plantas medicinais, e mantém, atualmente, laboratórios de pesquisa e cientistas trabalhando no desenvolvimento de produtos farmacêuticos a partir de plantas medicinais de uso popular (Martins et al., 1998).

Os trabalhos de pesquisa com plantas medicinais, via de regra, originam medicamentos num menor intervalo de tempo, com custo muitas vezes inferior e, conseqüentemente, mais acessível à população. Estima-se que aproximadamente 80% da população brasileira não tenha acesso aos medicamentos considerados essenciais. Por outro lado, segundo dados da Organização Mundial de Saúde, cerca de 80% da população mundial fazem uso de algum tipo de medicamento para alívio de sintomatologias desagradáveis, mas apenas 30% desse total por prescrição médica (Cechinel Filho & Yunes, 1998).

A ação desordenada e predatória do homem sobre a natureza representa conseqüências desastrosas para o equilíbrio ecológico do planeta Terra. Diante disso, a Amazônia, considerada uma das últimas reservas florestais do mundo, vem sofrendo intensas pressões no sentido de preservar suas potencialidades

naturais, desprovida da adoção do modelo de desenvolvimento praticado nas regiões economicamente mais desenvolvidas do planeta (Homma, 1989).

A alternativa de “Desenvolvimento Auto-Sustentado da Floresta”, ainda em fase inicial de experimentação, visto que pela natureza dos elementos que compõem esta região enfocada lhe são naturalmente ditadas algumas linhas balizadoras visando a sua exploração racional com desenvolvimento equilibrado a produção de fitoterápicos insere-se quase obrigatoriamente nesse contexto, (Kitamura, 1994).

O Brasil possui grande biodiversidade de 55.000 espécies de plantas, enquanto os Estados Unidos e Canadá apenas 700. Dentre aproximadamente 250.000 espécies vegetais existentes no mundo, segundo estudos de Ming et al. (1979), cerca de 50% possuem alguma propriedade farmacêutica, mas apenas 1% delas foi motivo de estudos adequados.

As estatísticas relativas ao mercado de fitoterápicos mostram que o consumo destes produtos no Brasil e no exterior tem aumentado consideravelmente nos últimos anos. O mercado internacional de medicamentos, do qual 255 produtos derivam de espécies vegetais, movimenta anualmente muitos bilhões de dólares americanos. O mercado de fitoterápicos também apresenta vantagem adicional porque os volumes transportados são pequenos com grande valor agregado (Silveira, 1996).

Além disso, é necessário obter informações básicas, agronômicas e fitoquímicas das espécies medicinais, pois a escassez de informações sobre quais princípios ativos existem e a falta de conhecimento sobre potencialidade de comercialização dos recursos naturais são muito grandes.

Dentre as diversas plantas medicinais encontradas na Amazônia, destacam-se duas espécies conhecidas popularmente por “unha de gato”: *Uncaria guianensis* (Aublet) Gmelin e *Uncaria tomentosa* (Willdenow ex

Roemer & Schultes) DC, consideradas espécies heliófitas, de rápido crescimento e que se desenvolvem bem em associação com *Cecropia sp*, *Ochroma pyramidale*, *Vernonia sp*, *Inga sp*, *Himathantus sucumba*, *Ficus sp*, entre outras (Bendezú, 1995). Suas propriedades medicinais são atribuídas a efeitos imunestimulantes, anti-inflamatórios e inibidores de crescimento de células cancerígenas (Carotenudo, 1997).

Apesar das múltiplas propriedades curativas da unha de gato, suas indicações farmacológicas, em fase de estudos, contam com escassos protocolos de pesquisa (Lombardi & Zevallos, 1998).

Nos últimos anos, em decorrência de sua importância comprovada para usos medicinais, a conservação desta espécie está sendo ameaçada, haja vista as informações de que a unha de gato corre risco de desaparecimento, em consequência de coletas indiscriminadas e/ou pelos desmatamentos realizados em áreas de ocorrência natural da espécie (Miranda et al., 2001).

O problema principal da unha de gato como produto é a heterogeneidade de características químicas que se pode encontrar no mercado levando-se em conta que o abastecimento de matéria vegetal provém de bosques naturais. Nestas condições, a diversidade genética intra-específica pode ser muito variada devido a cruzamentos ou a ecótipos ligados à distribuição geográfica. A tecnologia de clonagem *in vitro*, apoiada por um trabalho sistemático de seleção de características desejáveis, poderá contribuir para a obtenção de plantas de qualidade garantida, substituindo o emprego dos métodos tradicionais de propagação (Obregon Vilches, 1997).

Como principais características que se pretende selecionar em unha de gato, mencionam-se as seguintes: conteúdo de elementos químicos desejáveis, maior conteúdo de alcalóides utilizáveis, maior número de elementos químicos contidos, menor percentual de substâncias tóxicas, homogeneidade do conteúdo

de substâncias gerais e resistência a condições de domesticação. A homogeneidade no conteúdo de substância em uma determinada parte da planta, considerada como matéria-prima, permitirá às ciências farmacológica e médica trabalhar com protocolos de investigação controlada, facilitando os estudos relativos à dosagem e aplicações no tratamento de diversas enfermidades às quais se atribui o efeito benéfico (Torrejón, 1997).

Fisiologicamente, outra vantagem da tecnologia *in vitro*, por suas possibilidades de multiplicação em qualquer época do ano, é a de se poder utilizar materiais genéticos que normalmente tem o inconveniente de perder sua capacidade regenerativa, a qual dificulta a propagação vegetativa para se obter descendência garantida (Bajaj et al., 1988).

As razões técnicas expostas justificam a aplicação de tecnologia *in vitro* para a propagação de unha de gato. Estas razões não se ligam necessariamente a fatores econômicos. Por esta ótica, o interesse também é notório. A possibilidade de multiplicação de tecidos em pouco espaço e em menor tempo é a mais interessante.

Em curto tempo pode-se obter um lote de plantas com características genéticas conhecidas e que vão produzir matéria prima homogênea destinada à comercialização (Ammirato, 1983). Estima-se que com variedades selecionadas e a tecnologia *in vitro* seja possível comercializar, em dois anos, o que por via clássica necessita de oito a dez anos.

Reconhecendo a necessidade de se produzir informações científicas sobre plantas medicinais e a carência de estudos sobre micropropagação de *U. tomentosa* e *U. guianensis*, os objetivos do presente trabalho foram:

- Estabelecer uma metodologia para multiplicação *in vitro* das duas espécies;
- Avaliar o efeito de reguladores de crescimento na indução de calos;

- Analisar a estrutura anatômica de folhas e apresentar as variações nas dimensões anatômicas e na frequência de estômatos, visando mostrar a plasticidade anatômica;
- Monitorar por cromatografia de camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) a presença de alcalóides oxindólicos biomarcadores de *Uncaria tomentosa* e *Uncaria guianensis*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Caracterização das espécies e importância

Uncaria guianensis (Aubl.) Gmel e *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. foram originalmente descritas em 1791 e 1830, respectivamente, mas somente em 1950 é que o biólogo alemão Brell coletou amostras destas espécies na selva peruana, e as enviou para diferentes laboratórios europeus visando o estudo botânico. O conhecimento geral destas espécies se desenvolveu a partir de 1974 (Cabieses, 1994).

Popularmente conhecidas como unha de gato, unha de cigana, carrapato-amarelo, garra de gavião, cat's claw (inglês), pertencem à família Rubiaceae. O gênero *Uncaria* Schreb é composto de pelo menos 60 espécies das quais 39 tem-se difundido principalmente na Ásia e África. A *Uncaria tomentosa* é encontrada em diversas áreas da América do Sul e Central (Brasil, Belize, Costa Rica, Colômbia, Equador, Guatemala, Guianas, Honduras, Nicarágua, Panamá, Peru, Paraguai, Trinidad e Venezuela), ocorrendo em altitudes de 800 a 2500 metros sobre o nível do mar (Obregon Vilches, 1997). Já a *Uncaria guianensis* distribuiu-se apenas no Brasil, Venezuela, Bolívia, Peru e Paraguai, encontrada em altitudes menores de 0 a 500 metros (Alonso, 1998). No Brasil, estas espécies são encontradas na Amazônia ocidental, (Amazonas, Acre e Rondônia) e Mato Grosso (Lorenzo & Matos, 2002).

Ambas as espécies são arbustos vigorosos, pouco ramificados, perenifólias de ramos trepadores, com um espinho em forma de gancho em cada axila foliar. O caule apresenta textura fibrosa-laminar, coloração mesclada de marrom avermelhado e creme, chegando a atingir 30m de comprimento, com a peculiaridade de armazenar água para satisfazer as próprias necessidades vitais da planta, quando as chuvas são escassas. Este líquido armazenado no caule tem

um discreto sabor amargo e é um poderoso energizante utilizado para saciar a sede, fome e cansaço dos povos da floresta (Alonso, 1998). As folhas são simples, de 5-10cm de comprimento, oblongas, opostas, de coloração verde claro com presença de estípulas interpeciolares e espinhos axilares maciços e lenhosos levemente curvados. Apresentam inflorescências em glomérulos axilares, pedunculados, de forma perfeitamente globosa, com flores hermafroditas de cor branco-amarelada. O fruto é uma cápsula onde se encontram sementes fusiformes e longitudinais. A raiz é cilíndrica com segmentos papilosos (Lorenzo & Matos, 2002).

Na selva peruana, o período de floração e frutificação da *Uncaria guianensis* ocorre de fevereiro a maio e de abril a junho, respectivamente (Flores, 1995; Quevedo, 1995). No caso da *U. tomentosa* a floração é em torno do mês de setembro. Tem-se observado que os insetos são os principais agentes polinizadores, apesar do vento também ter influência. Após a polinização, o desenvolvimento dos frutos até o estágio de maturação ocorre de seis a oito semanas. O ciclo de produção de sementes para as duas espécies é anual, ressaltando-se que a unha de gato é uma espécie perenifólia (Flores, 1995).

A *Uncaria tomentosa* (Figura 1.1A) é uma das mais utilizadas na medicina tradicional e diferencia-se da *Uncaria guianensis* principalmente pelos espinhos menos curvos de tamanho variável, e consistência lenhosa, hastes mais anguladas e folhas um pouco menores (3-5 cm), enquanto que na *Uncaria guianensis*, os espinhos são grossos e retorcidos em forma de gancho (Figura 1.1B). A propagação das duas espécies pode ser feita por sementes ou por meios vegetativos (Revilla, 2001).

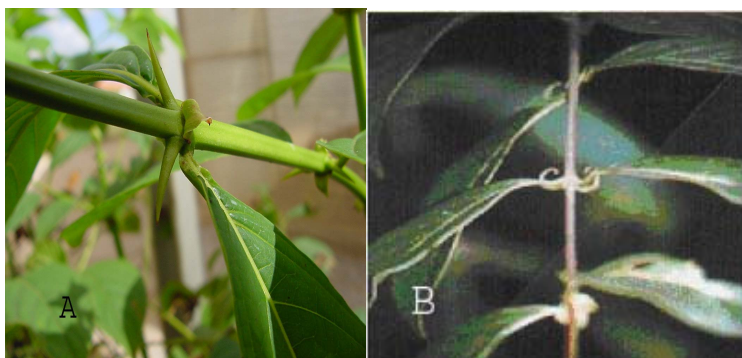


FIGURA 1.1. Detalhes dos ramos com espinhos de *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC (1A) e *Uncaria guianensis* (Aubl) Gmelin (1B) UFLA, Lavras-MG, 2004.

Existem, segundo alguns autores, três variedades de *U. tomentosa* que no fenótipo não apresentam diferenças entre si; mas ao se observar a cor da casca recém-cortada e a cor da raiz, são diferenciados três tipos: cinza esbranquiçado, marrom e vermelho escuro (Obregon Vilches, 1997).

Na Tabela 1.1 constam as principais diferenças botânicas entre *Uncaria tomentosa* e *Uncaria guianensis*.

TABELA 1.1. Principais diferenças botânicas entre *Uncaria tomentosa* e *Uncaria guianensis*. UFLA, Lavras-MG, 2004.

Características Botânicas	<i>Uncaria tomentosa</i>	<i>Uncaria guianensis</i>
Porte	arbusto trepador	arbusto trepador ou rasteiro
Espinhos adultos	dirigidos para baixo não retorcidos	recurvados como chifres de carneiros
Consistência do limbo	membranoso	coriáceo
Cor do limbo	Verde amarelado opaco	Verde escuro brilhante
Número de nervuras	7-10	8-9
Flores	sésseis	pediceladas
Corola	glabra	pilosa

Fonte: Obregon Vilches (1997).

2.1.1 Propriedades terapêuticas

A planta começou a despertar o interesse científico somente na década de 70, quando foram realizadas inúmeras pesquisas na Europa que acabaram comprovando o seu valor terapêutico (Obregon Vilches, 1997). Vários estudos foram realizados na Áustria, Alemanha, Inglaterra, Hungria, Itália, Peru e Brasil. No ano de 1997 mais de 50 formas de suplementos dietéticos à base de unha de gato foram introduzidos no mercado farmacêutico nos Estados Unidos.

Os princípios ativos de maior interesse são os alcalóides oxindólicos que estão presentes nas raízes e cascas destas espécies. Vários estudos, relatam que estes alcalóides têm o poder de estimular o sistema imunológico em até 50%

(Aquino 1991, Recio, 1995), induzindo, em todo mundo, o amplo uso no tratamento da AIDS, câncer e de outras doenças que afetam o sistema imunológico (Gontuzzo, 1993).

2.2 Metabólitos primários e secundários

Os produtos orgânicos de origem vegetal podem ser classificados como metabólitos primários ou secundários. Os metabólitos primários são substâncias encontradas na maior parte dos organismos, em geral em quantidades relativamente elevadas e que fazem parte do metabolismo essencial da célula. Assim, podem ser considerados como metabólitos primários de plantas os compostos como o amido, a celulose, os ácidos graxos, os óleos vegetais, as vitaminas, entre outros. Esses compostos representam a base química da maior parte dos produtos vegetais comercializados. Devido à sua frequência, apresentam, em geral, baixo valor agregado. Em alguns casos, os metabólitos primários podem ser utilizados como intermediários na produção de fármacos semi-sintéticos de alto valor agregado, como ocorre no caso do estigmasterol de soja empregado na produção de hormônios esteroidais (Gottlieb et al., 1996).

Por outro lado, os metabólitos secundários, derivados biossintéticos de metabólitos primários, apresentam distribuição limitada na natureza e, em geral, são restritos a grupo taxonômico. Esses produtos desempenham um importante papel nas relações das plantas com o meio ambiente que as cerca e determinam assim, em muitos casos, a capacidade de sobrevivência delas. Os metabólitos secundários estão envolvidos em processos tais como a atração de polinizadores, resposta a patógenos e pragas, adaptação a distintas condições de estresse, competição com outras plantas, etc. (Balandrin & Klocke, 1988).

Os metabólitos secundários, em grande parte, apresentam intensa atividade biológica, são eficientes em baixas concentrações e atuam como

inseticidas (piretróides, rotenona, nicotina, azadiractina), antimicrobianos (quinonas, cumarinas, sesquiterpenos, cânfora, vários fenóis), adoçantes (esteviosídeos, glicirizinas), reguladores de crescimento vegetal (brassinolida, brassinosteróides), anticancerígenos (etoposídeo, taxol), anti-helmínticos (ascaridol, eucaliptol), anestésicos (eugenol), sedativos (boril ésteres), entre outros (Bruneton, 1993).

As concentrações desses metabólitos nas plantas são em geral baixas, se comparadas com os metabólitos primários e, freqüentemente a sua biossíntese é restrita a alguns tipos de células e tecidos especializados, fatos que dificultam os processos de produção, extração e purificação. Por exemplo, os terpenos, (-) bisabolol, (-) bisabolonóxido, (-) abisabololóxido e o sesquiterpeno-lactona, matricina, os mais importantes compostos farmacológicos derivados da *Matricaria chamomilla* (camomila), são encontrados unicamente, em glândulas localizadas nos capítulos florais (Reichling & Beiderbeck, 1991).

2.3 A Química dos alcalóides

A seqüência de obtenção de produtos, a partir de uma amostra vegetal, constitui um processo bastante complexo se for considerada a diversidade de compostos que podem estar presentes como: carboidratos, substâncias peptídicas, glicosídeos, taninos e outros polifenóis, lipídios, óleos voláteis, resinas e combinações, alcalóides, entre outros (Mora, 1993).

É importante conhecer a classificação taxonômica da planta a estudar, já que o conhecimento da família e gênero da espécie simplificarão o trabalho do pesquisador na identificação dos alcalóides como componentes de um determinado grupo e taxonomia. Cada planta tem características próprias para produzir uma ou outra substância química, por isso são necessários e importantes os estudos fitoquímicos (Cabieses, 1994).

Os alcalóides formam um grupo muito vasto de metabólitos secundários que podem ocorrer tanto em microorganismos como em plantas superiores e inferiores e ainda em animais, apesar de nestes últimos só com baixíssima frequência. A biossíntese dos alcalóides inclui sempre pelo menos um aminoácido. São também incorporadas outras unidades provenientes de piruvato, malonato ou mevalonato (Salisbury & Ross, 1991; Oliveira & Martins, 1998).

Com precursores de origem biossintética tão distinta, é fácil entender a complexidade e a diversidade estrutural que se encontram nestes metabólitos, sendo hoje conhecidos mais de 5.500 alcalóides, dos quais 150 procedentes da família Rubiácea a qual pertencem as espécies *Uncaria tomentosa* e *Uncaria guianensis* (Raymond-Hamet, 1952).

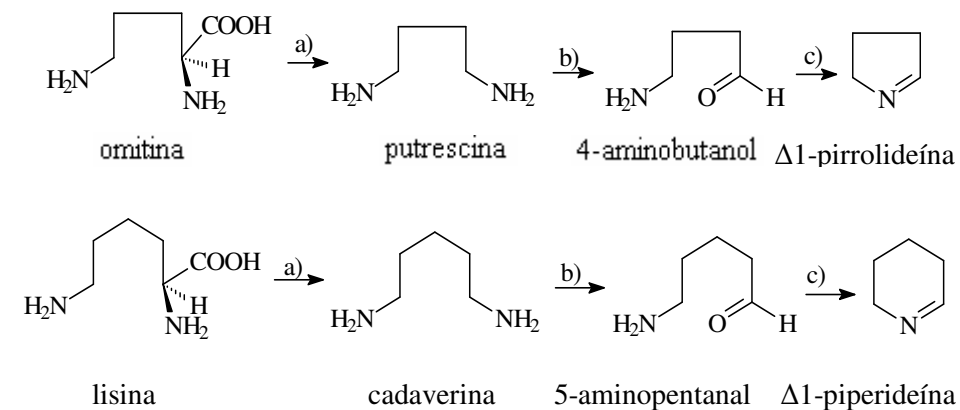
Podem ser encontrados alcalóides em todas as partes de um vegetal, contudo em um ou mais órgãos haverá acúmulo preferencial dessas substâncias: tecidos com crescimento ativo, células epidérmicas e hipodérmicas e vasos lactíferos. Raramente estão presentes em estruturas secundárias, mesmo em casca de *Cinchona* que podem conter até 12% de alcalóides, encontrados apenas no parênquima. No aspecto intracelular, os alcalóides são sintetizados no retículo endoplasmático, concentrando-se em seguida nos vacúolos e, dessa maneira, não aparecem em células jovens antes de ocorrer a formação dessas estruturas (Henriques et al., 1999).

O local de armazenamento dos alcalóides é diferente daquele no qual é sintetizado. Após o transporte para os sítios de armazenagem, podem acontecer modificações estruturais secundárias (Roberts et al., 1996).

A maioria dos alcalóides é derivada do metabolismo dos amino-ácidos alifáticos precursores de alcalóides (ornitina, lisina) e aromáticos (fenilalanina, tirosina, triptofano) e ácido antranílico. A partir dos aminoácidos mencionados e, em função da estrutura do metabólito final, são sistematizados. Muitas

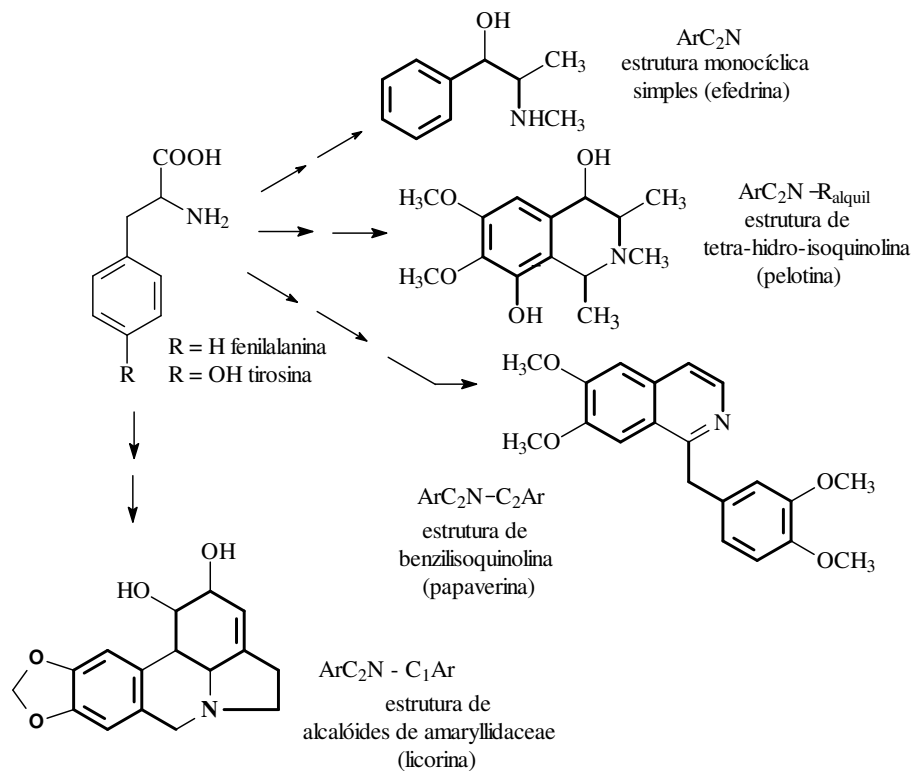
pesquisas evidenciam que esses metabólitos exercem várias atividades biológicas, sendo as mais comuns: anti-hipertensivos, antimalárico, antitumorais, depressor cardíaco, diuréticos, miorelaxante, antiviral, entre muitos outros (Henriques et al. 2001). A Figura 1.2 mostra as principais classes de alcalóides.

A) ALCALÓIDES DERIVADOS DE ORNITINA E LISINA

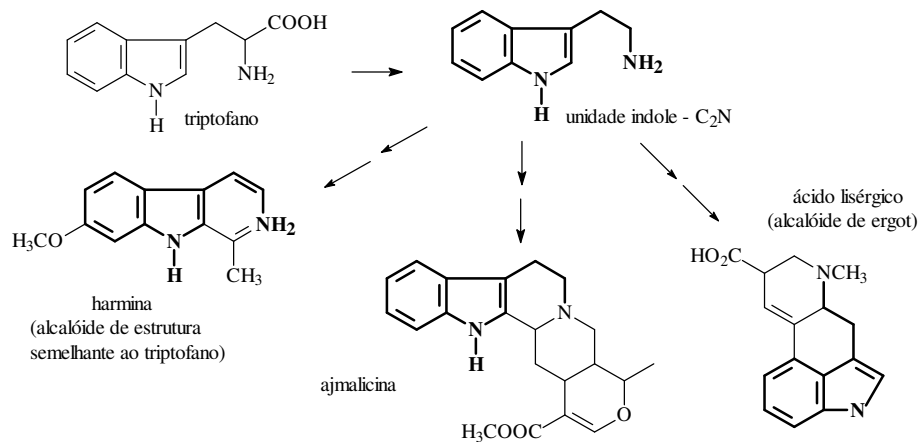


a) descarboxilação; b) "transaminação"; c) condensação intramolecular.

B) ALCALÓIDES DERIVADOS DE FENILALANINA E TIROSINA



C) ALCALÓIDES DERIVADOS DE TRIPTOFANO



D) ALCALÓIDES DERIVADOS DE ÁCIDO ANTRANÍLICO

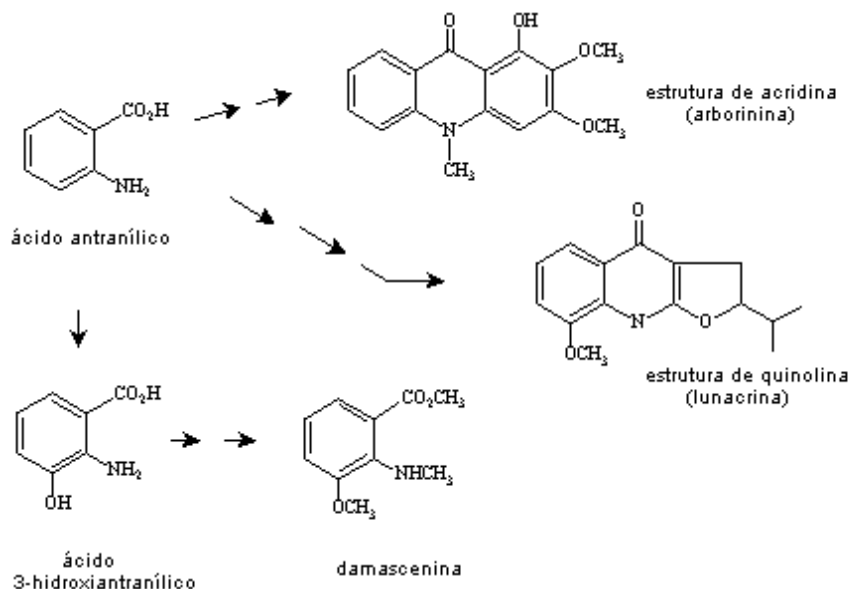


FIGURA 1.2. Principais classes de alcalóides. Adaptado de Simões et al., 1999 UFLA, Lavras-MG, 2004.

2.4 Fitoconstituintes do gênero *Uncaria*

Os estudos das espécies do gênero *Uncaria* remontam de muitos anos, existindo grande diversidade deles publicados em vários países. Muitas espécies têm sido objeto de estudos botânicos, químicos e farmacológicos. Os principais constituintes são os alcalóides, como os encontrados na espécie *Uncaria rhynchophylla* (Miq.) Jacks, da qual foram isolados Hirsutina, Hirsuteína, Rincofilina e Dihidrocorinanteína, com ação vasodilatadora das artérias coronárias e cerebrais (Horie et al., 1992). Da espécie *Uncaria callophylla* (Bl) Ex Korth se extraiu o alcalóide Gambirina utilizado para diminuir a pressão sanguínea (Mok et al., 1992).

O gênero *Uncaria*, típico de regiões tropicais, é representado na América do Sul e Central pelas espécies *U.tomentosa* e *U. guianensis*. Nestas plantas são encontrados alcalóides oxindólicos, N-oxi-oxindólicos e indólicos, triterpenos glicosilados, taninos e flavonóides. Dentre esses metabólitos, seis alcalóides oxindólicos pentacíclicos são considerados seus biomarcadores: Pteropodina, Isopteropodina, Mitrafilina, Isomitrafilina, Especiofilina e Uncarina F (Wagner et al., 1985).

Outros constituintes foram encontrados nestas espécies e têm constituído motivo de investigações; compostos glicosídeos do ácido quinóvico extraídos da casca foram identificados por Aquino et al., (1989) e sete destes que demonstram ser os responsáveis pelos efeitos antiinflamatórios, têm merecido ampla atenção dos cientistas, pois são capazes de inibir inflamações em até 69% (Cerri, 1988; Recio, 1995).

2.5 Os alcalóides de *Uncaria tomentosa* e *Uncaria guianensis*

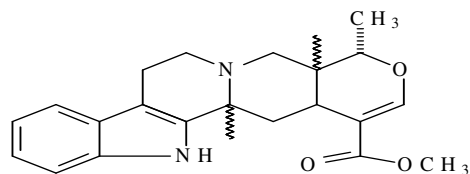
Os alcalóides dessas espécies são encontrados nas diferentes partes da planta: raízes, cascas, ramos, folhas, flores e sementes, e exercem uma grande ação fitoterápica, sendo os principais pertencentes ao grupo oxindólico: Rincofilina, Isorincofilina, Mitrafilina, Isomitrafilina, F-mitrafilina, Hirsuteína, Hirsutina, Dihidrocorianteína, Isopteropodina, Pteropodina, Especiofilina e Uncarina F. Também foram isolados alcalóides indólicos pentacíclicos e tetracíclicos e outros alcalóides oxindólicos tetracíclicos (Perazzo, 2004) Tabela 1.2.

TABELA 1.2. Principais alcalóides encontrados em *Uncaria guianensis* e *Uncaria tomentosa*. UFLA, Lavras-MG, 2004.

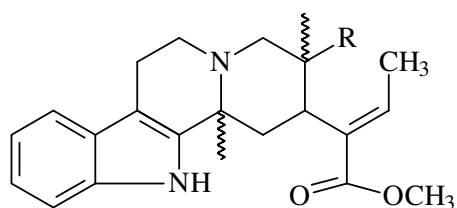
	Alcalóides pentacíclicos	Alcalóides tetracíclicos
Alcalóides oxindólicos	Pteropodina	Rhyncophhylina
	Isopteropodina	Corynexeína
	Especiofilina	Isocorynexeína
	Uncarina F	
	Mitrafilina	
	Isomitrafalina	
Alcalóides indólicos	Akuamigina	Hisrutina
	Tetrahidroalstorina	Dihidrocorynantheina
	Isoamalicina	Hirsuteína
		Coryanteína

Fonte: Perazzo, (2004).

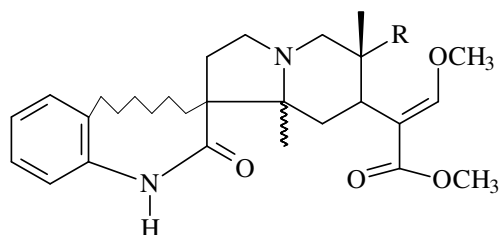
Na Figura 1.3 são apresentados principais esqueletos alcalóides e na Figura 1.4 outros compostos encontrados em *Uncaria guianensis* e *Uncaria tomentosa*.



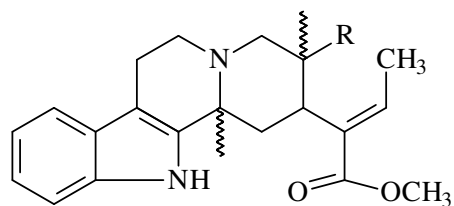
Anel pentacíclico



Anel indólico tetracíclico

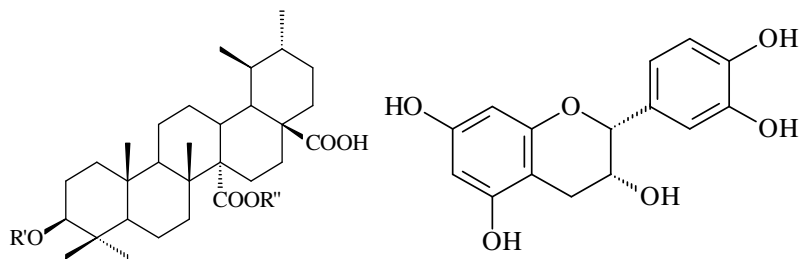


Anel oxindólico tetracíclico



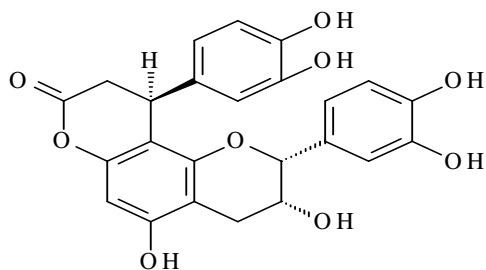
Anel indólico tetracíclico

FIGURA 1.3. Principais esqueletos dos alcalóides presentes em *Uncaria tomentosa* e *Uncaria guianensis* UFLA, Lavras-MG, 2004.



Genina comum aos glicosídeos do
Ácido quinóico e triterpenos
polioxigenados

Procianidina Epicatechina



Procianidina Cinchonaina lb.

FIGURA 1.4. Compostos encontrados nas espécies de *Uncaria tomentosa* e *Uncaria guianensis*. UFLA, Lavras-MG, 2004.

Em abril de 1994, Keplinger registra a patente 5302, 611 Norte Americana: “Oxindole alkaloids having properties stimulating the immunologic system & preparation containing the same”, baseado em estudos de *Uncaria tomentosa* (Obregon Vilches, 1997).

O conteúdo total destes alcalóides nas diferentes partes da planta de *Uncaria tomentosa* é o seguinte: flores: 2,10%; folhas: 1,59%, cascas - 0,50% e ramos com espinhos - 0,32% (Quiroz et al., 2004). Na literatura não constam dados específicos referentes à espécie *Uncaria guianensis*.

De acordo com investigações realizadas em 1985 pelo cientista Dr. Wagner e colaboradores do Instituto de Biologia Farmacêutica da Universidade de Munich (Alemanha), pôde-se comprovar, dentre outras coisas, que os alcalóides de *Uncaria tomentosa* têm efeito multiplicador sobre o sistema imunológico (Aquino et al., 1989).

2.6 Micropropagação

Os impactos mais importantes e transcendentais na aplicação da biotecnologia estão acontecendo no setor agropecuário, tanto em países desenvolvidos como naqueles em desenvolvimento. As ferramentas biotecnológicas têm demonstrado ser de grande utilidade para melhorar os cultivos agrícolas em propagação massiva de plantas superiores, melhoramento genético, conservação e distribuição de germoplasma vegetal (Ferreira et al., 1998).

O êxito social e econômico, presumivelmente escasso em curto prazo, poderá justificar o avanço de inovações no campo de melhoramento genético, ao prever as evidências com respeito a quanto e como a biotecnologia serve as classes mais pobres e aos objetivos da atividade agrária sustentável. O interesse de aplicar ferramentas biotecnológicas indica várias e justificadas razões para se aplicar na unha de gato; do ponto de vista genético, as técnicas *in vitro* separam o órgão ou fragmento de órgão visando regeneração e formação de partes que faltam para constituir uma planta completa (Tapia & Dominguez, 1997).

A micropropagação de plantas aromáticas e medicinais *in vitro* vêm-se difundindo nos últimos anos e dentre os principais benefícios há: possibilidade de aumento rápido do número de indivíduos geneticamente idênticos, a partir de plantas selecionadas; a produção de mudas durante todo o ano, mesmo em regiões nas quais a planta não apresenta condições para a propagação sexuada;

produção de plantas com elevada qualidade sanitária, em geral livre de bactérias, fungos, e nematóides; a obtenção de plantas altamente homogêneas, a partir de plantas heterozigotas, possibilitando o aproveitamento da heterose (vigor híbrido), sem as limitações da produção de semente; possibilidade de conservação de germoplasma, garantindo a manutenção da biodiversidade e o melhoramento genético de plantas por meio da associação de métodos de cultura de tecidos e regeneração de plantas *in vitro* (Echeverrigaray et al., 2001).

A micropropagação vem sendo objeto de um grande número de revisões nas últimas décadas, levantando aspectos associados à composição de meios de cultivo reguladores de crescimento, condições de luminosidade, fontes de carbono, agentes geleificantes, manipulação e controle das condições ambientais responsáveis pelas alterações estruturais e fisiológicas durante o cultivo *in vitro* (Bajaj et al., 1988). A influência do genótipo sobre comportamento *in vitro* tem merecido especial interesse e mostrado que ajustes devem ser realizados para distintos genótipos visando à otimização dos processos de micropropagação deles (Evans et al., 1981).

As técnicas de micropropagação utilizadas em plantas aromáticas e medicinais dependem fundamentalmente dos objetivos da propagação e das características da planta. Assim, sistemas de propagação por meio de cultura de meristemas, cultura de calos, cultura de anteras, cultura de protoplastos têm sido aplicados a plantas aromáticas e medicinais (Bajaj et al., 1988).

A micropropagação de plantas aromáticas e medicinais é realizada, preferencialmente, por meio da cultura de meristemas ou de brotos. Alternativamente, em situações específicas nas quais um grande número de mudas se faz necessário, utiliza-se à regeneração direta a partir de explantes foliares ou caulinares e a embriogênese somática (George, 1993). Nesses casos,

avaliações devem ser realizadas com o objetivo de estabelecer a uniformidade morfológica e a identidade genética do material produzido.

2.6.1 Reguladores de Crescimento

Em geral, os reguladores de crescimento utilizados para induzir à proliferação de brotos são as citocininas. Esses compostos derivados da adenina (isopenteniladenina, benziladenina, cinetina) ou da uréia (tiadiazuron, N-(2-cloro-4-piridil)-N-feniluréia) são adicionados aos meios de cultivo em concentrações que variam, em geral, entre 1 e 2 mg.L⁻¹. Tanto o tipo de citocinina quanto a concentração do regulador influenciam a resposta *in vitro*, sendo necessária a avaliação de distintas combinações para a otimização das condições de micropropagação de uma dada planta (Grattapaglia et al., 1987). Por exemplo, em *Lavandula vera* L., as maiores taxas de multiplicação são obtidas com 0,5 a 1,0 mg.L⁻¹ de tiadiazuron (TDZ) e com 0.5 mg.L⁻¹ de benzil-amino-purina (BAP). Entretanto, as plântulas cultivadas na presença de TDZ apresentam sinais de hiper-hidratação, que restringem o emprego deste regulador (Andrade et al., 1999).

Altas concentrações ou alguns tipos de citocininas fortes levam à formação de brotos adventícios e, em muitos casos, acarretam mudanças fisiológicas indesejáveis, tais como a hiper-hidratação que limita o crescimento e a multiplicação. A benzil-amino-purina (BAP) é, provavelmente, a mais utilizada das citocininas, devido à sua alta eficiência e baixo custo. Quando este regulador não oferece resultados satisfatórios, a cinetina (CIN) e a 2-isopenteniladenina (2-iP) são recomendadas (Schloupf et al., 1995).

Em muitos casos, a adição de baixas concentrações de auxinas favorece a multiplicação; as mais utilizadas são o ácido indolacético (AIA), o ácido

indolbutírico (AIB) ou o ácido naftalenacético (ANA) em concentrações da ordem de 0,1 a 1 mg.L⁻¹. (Schloupf et al., 1995).

Geralmente as plântulas micropropagadas na presença de citocininas, não apresentam raízes. Para induzir o enraizamento é necessário muitas vezes proceder à transferência das plântulas para meios específicos. Para a maior parte das espécies, os meios de enraizamento possuem 0,1 a 1 mg.L⁻¹ de ANA ou AIB, concentração de sais reduzida, alta concentração de açúcar (3 a 4%) e carvão ativado. Nesses meios, as plântulas alongam, enraízam e apresentam todas as estruturas necessárias para o seu desenvolvimento no solo. Entretanto, dadas às particularidades de cada planta, testes devem ser realizados para avaliar as melhores condições para o enraizamento (George, 1993).

Em sistemas nos quais a micropropagação é obtida por meio da regeneração direta, o efeito dos reguladores de crescimento se mostra ainda mais evidente e concentrações maiores de citocininas se tornam, em geral, necessárias. No caso da camomila romana (*Anthemis nobilis* L.), altas taxas de regeneração são obtidas a partir de explantes foliares cultivados em meio contendo 1,0 mg.L⁻¹ de BAP e 0,2mg.L⁻¹ de ANA (Echeverrigaray et al., 2000).

2.6.2 Meios de cultivo

Além dos reguladores de crescimento, o meio de cultivo (sais minerais, vitaminas, fonte de carbono e agente geleificante) também interfere no desenvolvimento das plântulas *in vitro*, já que afeta diretamente a nutrição daquelas. Várias soluções salinas têm sido utilizadas para o desenvolvimento de culturas de tecidos de plantas, que apresentam variações nas concentrações de sais, na fonte de nitrogênio e dos outros compostos essenciais. A solução salina mais empregada, tanto em plantas aromáticas e medicinais quanto em outras

espécies vegetais, é a solução proposta originalmente para o cultivo de tabaco (*Nicotiana tabaccum* L.) por Murashige & Skoog (1962).

A fonte de carbono mais utilizada é sacarose, em concentrações de 1 a 3%. Entretanto, em alguns casos, como na *Mentha piperita* L., a glicose mostra-se mais eficiente, fato pelo qual é importante avaliar distintas fontes de carbono quando se pretende trabalhar com uma nova planta (Echeverrigary et al., 2001).

As distintas formulações de meios variam quanto às vitaminas adicionadas, mas todas incluem, pelo menos, a tiamina e o inositol. A primeira participa como co-fator no metabolismo de carboidratos e está diretamente envolvida na síntese de vários aminoácidos, enquanto o inositol entra na formação de pectina, hemicelulose, fosfolipídios e, conseqüentemente, na troca de íons (George, 1993).

O agente geleificante mais usado para a formulação de meios sólidos é o ágar, em concentrações de 0,7 a 1%. Em alguns casos, entretanto, podem ser empregados com vantagem meios líquidos com pontes de papel ou meios sólidos com gelrite (0,1 a 0,2%). O pH dos meios é ajustado, em geral, para $5,7 \pm 0,1$, pela adição de hidróxido de potássio ou hidróxido de sódio (Bajaj et al., 1988).

Durante o processo de propagação, as condições físicas às quais são submetidas as plântulas também exercem papel fundamental no desenvolvimento delas. Em geral, fotoperíodo de 16 horas com 1000 a 3000 lux e temperaturas de 25⁰C têm-se mostrado adequados para a micropropagação da maioria das espécies vegetais. Algumas, porém, requerem temperaturas distintas, variações no fotoperíodo e na intensidade de luz recebida, e até diferentes comprimentos de luz para distintas etapas do processo. Por exemplo, em muitas espécies, a luz vermelha estimula o enraizamento (George, 1993).

No caso de muitas plantas aromáticas e medicinais, torna-se necessária adição de compostos antioxidantes ao meio de cultivo, já que se caracterizam por produzir concentrações elevadas de fenóis e outros metabólitos que levam à morte dos explantes. Para evitar esses problemas, os meios podem ser acrescidos de carvão ativado ou de polivinilpirrolidona (PVP). A utilização desses agentes deve ser feita com as devidas precauções, porque limitam a disponibilidade de alguns componentes do meio e, principalmente, de reguladores de crescimento (Echeverrigaray et al., 2001).

2.6.3 Aclimatização

Em geral, as plantas derivadas do cultivo *in vitro* requerem um período de aclimatização durante a transferência para a casa de vegetação ou para o campo, em função de alteração na estrutura e de fisiologia induzidas (*in vitro*)s as quais diminuem a capacidade dessas plantas em suprir a necessidade de energia e de carbono, através da fotossíntese, e também de manter um balanço hídrico favorável (Sutter & Langhans, 1979; Sutter, 1988).

Os processos envolvem a modificação gradual das condições ambientais, fundamentalmente da temperatura e da umidade relativa, por exercer influencia direta e positiva sobre as características *in vitro* e sobre a influencia fotossintética.

Essa mudança gradual pode ser obtida pela utilização de caixas especiais, umidificadores, ou coberturas plásticas, mantendo as plantas, já transferidas para o solo, sob condições de temperatura semelhantes àquelas nas quais estavam anteriormente. Uma boa lavagem das raízes, visando eliminar resíduos de meio de cultivo, o tratamento com fungicidas e utilização de solos esterilizados, melhoram a sobrevivência das plantas (Echeverrigaray et al., 2001).

2.6.4 Anatomia das plantas micropropagadas

Estudos sobre sementes e suas transformações até a formação da plântula envolvem conhecimentos básicos. Para Crestana & Beltrati (1988), estudos anatômicos e morfológicos da germinação de sementes de espécies florestais tropicais são fundamentos urgentes, à medida que cresce a demanda por seus produtos, e são reduzidas drasticamente às populações naturais em face das alterações ambientais provocadas, principalmente, pelo desmatamento continuado.

Na propagação de *Uncaria tomentosa* e *Uncaria guianensis* utilizam-se basicamente sementes em bosques naturais (Bendezú, 1995). Estas espécies apresentam processo germinativo lento, e a protrusão radicular e da parte aérea pode apresentar desuniformidade (Pereira et al., 2003; 2004).

A excessiva perda de água que contribui para a dessecação das mudas após a transferência, tem sido atribuída a diversas anormalidades induzidas pelas condições *in vitro* como: pouca formação de cera epicuticular aliada à alteração na composição química das ceras, com o aumento na proporção de componentes hidrofóbicos; deficiência no mecanismo de fechamento estomático; aumento na frequência de estômatos; localização mais superficial dos estômatos na epiderme das folhas; reduzida diferenciação do mesofilo das folhas com alta proporção de espaços intercelulares (Deberg & Maene, 1984).

Castro (2002), caracterizando a variação na anatomia foliar de guaco (*Mikania glomerata*) desenvolvida em diferentes níveis de sombreamento (0%, 30%, 50% e 70% da radiação solar incidente), observou aumento da espessura foliar nas plantas submetidas a maior intensidade de radiação. As plantas cultivadas a 30% de sombreamento na região adaxial apresentaram maior frequência e índices estomáticos. O número de vasos do xilema do pecíolo de guaco com 70% de sombreamento foi menor que os demais tratamentos em

estudo. Com relação ao comprimento do pecíolo, eles foram mais curtos no tratamento de maior intensidade de radiação. Presença de endoderme com estrias de Caspary na folha de *Mikania glomerata* também foram observadas.

Os principais fatores que provocam alterações significativas na estrutura e funcionamento dos tecidos são a alta umidade relativa do ar no interior do recipiente de cultivo e a baixa irradiância que leva à incapacidade de sobrevivência das mudas produzidas *in vitro*, quando submetidas às condições adversas do ambiente natural (Sciutti & Morini, 1990).

Plantas obtidas por micropropagação são freqüentemente afetadas por excessiva presença de fatores do meio de cultura que conduzem à degeneração metabólica e morfológica dos tecidos, descritas em diferentes terminologias: vitrificação, hiperhidratação, translucidez, transparência e suculência (Ziv, 1991).

Nos estudos de morfo-anatomia devem ser levadas em consideração as idades dos órgãos, sua posição no ramo, situação aos fatores de luz e ao suprimento hídrico, pois se sabe que existe uma estreita relação entre a morfologia e a anatomia dos órgãos vegetais frente ao ambiente em que a espécie se desenvolve. Estudos com várias espécies de uso medicinal evidenciam plasticidade fisiológica e anatômica sob diferentes condições ambientais (Clark & Menary, 1980; Atroch, 1999; Gonçalves, 2001).

Estudos histológicos demonstram que os órgãos vegetativos de plantas desenvolvidas *in vitro* apresentam tecidos e estruturas pouco diferenciados, se comparados com plantas cultivadas em casa de vegetação (Fidelis, 1998; Santos, 2001).

2.7 Produção de metabólitos secundários *in vitro*

A limitação dos ambientes naturais, a baixa concentração de alguns produtos de interesse, as dificuldades agrícolas encontradas em algumas plantas aromáticas e medicinais têm estimulado, nos últimos anos, as pesquisas no sentido da produção *in vitro* de metabólitos secundários como uma alternativa aos processos agrícolas tradicionais.

As principais vantagens da produção de metabólitos vegetais *in vitro* são: a independência de fatores ambientais, o aumento do controle da produção, o uso de linhagens celulares que garantem uma qualidade consistente do produto, a simplificação do processamento e recuperação, o aproveitamento de novos passos de síntese a partir de linhagens mutantes, a viabilização econômica de produtos oriundos de espécies de difícil cultivo, a utilização de elicitores ou indutores no direcionamento da produção e o aproveitamento das biotransformações que ocorrem durante o cultivo de células vegetais *in vitro* (Fowler, 1987; Mantel et al., 1994).

A produção *in vitro* de metabólitos secundários apresenta grande potencial para o estudo dos processos biossintéticos desses metabólitos, já que as culturas celulares podem ser submetidas a distintas condições físicas e químicas capazes de reprimir ou estimular a produção de um determinado metabólito.

A idéia de produzir metabólitos secundários *in vitro* deve, entretanto, ser tomada com as devidas precauções, pois na prática nem sempre é possível atingir os resultados desejados. Vários fatores limitam a utilização dessa tecnologia, e dentre entre eles pode-se ressaltar a diferença de resposta de distintas plantas em culturas de tecidos ou de células e a capacidade de produção de determinados metabólitos por parte de células desdiferenciadas em concentrações satisfatórias Bajaj et al., 1988).

Além disso, vários aspectos tecnológicos devem ser levados em consideração para uma produção em escala comercial. No momento, poucos são os exemplos de utilização em escala comercial de culturas celulares para a produção de metabólitos secundários. Podem ser citados como exemplos bem-sucedidos à produção de chikonina (Fujita et al., 1981), de vincristina e vinblastina (Schiel & Berlin, 1987) e de nicotina em bioreatores com volumes de até 20.000 litros (Hashimoto et al., 1982).

A escolha de um tipo de cultura depende fundamentalmente do tipo do metabólito a ser produzido e da espécie vegetal utilizada. Alguns compostos são produzidos em órgãos específicos através de células especializadas, limitando assim as opções de cultura àquelas que apresentem tais tipos de células. Por outro lado, a resposta diferencial de diferentes plantas *in vitro* propicia um ou outro método de cultura de tecidos, já que elas respondem distintamente aos reguladores de crescimento. Por exemplo, a produção de pró-azulenos e camazuleno em calos de *Matricaria chamomilla* L. varia em dependência do órgão utilizado para a produção de calos (gemas, hipocótilos, raízes ou inflorescências) e combinação de reguladores de crescimento empregados na indução e manutenção dos calos (Bertarello Zeni, 1996).

Antes do início do estudo de produção de metabólitos secundários *in vitro*, é interessante conhecer e dominar a produção de calos e avaliar a sua síntese dos metabólitos. Calo é um agregado de massa celular, com crescimento desordenado e certo grau de diferenciação (Torres et al., 2000) em resposta a uma injúria química, como concentração de sais e fitorreguladores, ou injúria física, como ferimentos nos tecidos. Calos podem ser iniciados *in vitro* através de pequenos pedaços de plantas em um meio de crescimento e condições estéreis.

Sob o estímulo de substâncias endógenas de crescimento ou fitorreguladores de crescimento adicionados ao meio, o metabolismo das células que estavam em um estado inativo é revertido, e iniciam divisão ativa. Durante este processo, diferenciação e especialização celular que ocorrem em plantas intactas são revertidos, e o explante dará origem a um novo tecido que é composto de células do tipo meristemáticas e não especializadas, ou com certo grau de diferenciação. Embora calos permaneçam desorganizados, podem ser formados alguns tipos de células especializadas novamente (George, 1993).

O rápido crescimento e a alta estabilidade genética de culturas de raízes transformadas com *Agrobacterium rhizogenes* têm estimulado a aplicação dessas raízes na produção de metabólitos secundários (Rhodes et al., 1990; Saito et al., 1992). Além disso, a transformação via *Agrobacterium* com o uso de vetores binários abre as portas à manipulação genética da produção de metabólitos vegetais (Gelvin, 1998).

Para que um cultivo de células em suspensão alcance um nível de produção rentável, é necessário aumentar ao máximo a velocidade de biossíntese, já que as células são muito heterogêneas com respeito ao metabolismo secundário. Este fato torna necessário um programa de seleção prévia, com as seguintes etapas: a iniciação de cultura celular heterogênea, a clonagem e seleção de linhagens celulares com alta produção e adequação das condições de cultivo para a otimização da produção. A seleção de clones baseia-se na recuperação de variantes somaclonais associados direta ou indiretamente à produção de metabólitos secundários (Rotgé, 1991). Diversos autores têm revisado o tema mostrando a importância de cada uma dessas fases no desenvolvimento de sistemas de produção de metabólitos secundários *in vitro* (Bajaj et al., 1988).

2.8 Métodos analíticos no controle de qualidade de matéria primas vegetais.

Conforme a Organização Mundial da Saúde, entre as especificações necessárias ao controle efetivo de qualidade de produtos fitoterápicos encontram-se aquelas relativas à qualidade e integridade do material vegetal (Word, 1993).

No Brasil, os produtos fitoterápicos passaram a ser considerado, oficialmente, como medicamentos, a partir da publicação da portaria número 6,. Para o seu registro no Ministério da Saúde, a nova legislação passou a exigir a apresentação de documentação comprobatória da eficácia, segurança e estabilidade, através da aplicação de métodos analíticos e biológicos validados (Brasil, 1995).

A análise fitoquímica preliminar, no entanto, pode identificar os grupos de metabólitos secundários relevantes na planta de interesse. Os pontos básicos para o desenvolvimento desse estudo consistem em escolha da planta a ser estudada, identificação botânica, coleta e preparação do material, prospecção preliminar de sua composição química, isolamento e purificação dos constituintes principais, determinação da estrutura molecular do composto químico isolado e purificado (Matos, 1988; Simões et.al., 1999).

As atividades relacionadas com o estudo químico e farmacognóstico das plantas significam importante papel no suporte da qualidade dos produtos para o mercado. A análise e a caracterização das frações e substâncias moleculares nos extratos (constituintes; “marcadores”) estabelecem a identidade química do vegetal. Esta fase é indispensável para o planejamento e monitoramento das etapas de transformação tecnológica, assim como para a garantia da qualidade dos produtos intermediários (Siani, 2003).

A preparação dos extratos brutos das plantas é o ponto de partida para identificar, isolar e purificar os seus constituintes físicos (Matos, 1988). A

escolha por um método de extração vai depender da textura e do conteúdo de água presente no material a ser extraído, bem como do tipo de substância que se deseja isolar (Ferri, 1996).

Se por um lado às dificuldades de extração e purificação têm feito com que muitos metabólitos secundários, identificados em plantas superiores, sejam atualmente produzidos através de síntese química, (como o ácido acetilsalicílico), por outro lado, a complexidade de alguns produtos tem garantido a sua produção biológica. Os produtos naturais e seus derivados representam aproximadamente 50% das drogas de uso clínico e 25% do total são originárias de plantas superiores (Echeverrigary et. al., 2001).

Autores têm abordado em seus trabalhos as propostas de metodologia e definições a respeito da validação de procedimentos analíticos (Funck et al., 1992; Altersor et al., 1994).

A caracterização por cromatografia em camada delgada (CCD) constitui um procedimento referido nos códigos oficiais como um requisito indispensável para a identificação e caracterização da droga vegetal (Stahl, 1969; Word, 1992; Wagner & Blat, 1996;).

A utilização da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a separação e determinação de marcadores químicos em preparações vegetais tem encontrado grande aceitação nos últimos anos, devido à relativa simplificação e acessibilidade da técnica, o que reforça a sua difusão como um procedimento rápido e preciso, com inúmeras aplicações no controle de qualidade de fitoterápicos (Bronneer & Beecher, 1995; Rewhald, 1995; Gunther & Wagner, 1996).

Wagner et al., (1985) analisaram extratos de acetato de etila, extratos de etanol, assim como frações e macerados aquosos de raízes de *Uncaria tomentosa*, e identificaram a fração alcalóide como grupo de substâncias ativas

desta parte da planta; a obtenção do grupo de alcalóides se realizou baseada no método de Phillipson & Hemingway (1975). A fração de alcalóides foi submetida à cromatografia de sílica gel e à cromatografia de camada delgada as quais permitiram a identificação de seis alcalóides oxindólicos do tipo tetracíclico e pentacíclico: isopteropodina, pteropodina (e seus isômeros especiofilina e uncarina F), mitrafilina, isomitrafilina, rincofilina e isorincofilina.

A observação das diferenças qualitativas e quantitativas no conteúdo de alcalóides de três variedades de *Uncaria tomentosa* mostrou-se significativa (branco acinzentado, marrom e vermelho escuro). Assim, os alcalóides oxindólicos tetracíclicos isorincofilina e rincofilina se encontravam em amostras de *Uncaria tomentosa*, considerando-os como os alcalóides principais; na variedade “marrom”, a maior concentração foi o alcalóide isopteropodina (Obregon Vilches, 1997). A época da colheita ou a presença de modificações químicas, segundo Wagner et al., (1985) pode ser uma das causas para estas variações.

Entre 1974 e 1975, Phillipson e Hemingway na Inglaterra analisaram extratos de folhas e talos, tanto de *Uncaria tomentosa* como de *Uncaria guianensis*, dentro de um screening em cromatografia de camada delgada, observando que ambas as espécies apresentaram alcalóides semelhantes (Obregon Vilches, 1997).

Montenegro et al., (1976) obtiveram os alcalóides por extração metanólica das partes da planta de *Uncaria tomentosa*, micropulverizadas em seus resíduos de acordo com um procedimento standart; detectaram cinco alcalóides, identificando-se como: Pteropodina, Especiofilina, Isopteropodina, Uncaria F e Isomitrafilina. Para separar os cinco alcalóides, a massa foi diluída em benzeno e a extração com CH₃ COOH a 2,2 molar, utilizando-se a espectrometria (ultravioleta, infravermelho e de massa).

Vários métodos de extração e separação de alcalóides oxindólicos de “unha de gato” foram avaliados. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem-se mostrado a mais indicada (Horie et al., 1992; Kohda et al., 1996; Ganzera, et al., 2001; Mazzei et al., 2002 e Silva et al., 2002).

Em contrapartida ao grande número de informações quanto aos aspectos fitoquímicos e farmacológicos das espécies *U.tomentosa* e *U.guianensis*, há necessidade de maiores estudos quanto aos métodos de doseamento de alcalóides para os principais compostos presentes nestas espécies.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AWAD, M.; CASTRO, P. L. **Introdução à fisiologia vegetal**. São Paulo: Nobel, 1989. 177 p.

BAPAT, V. A.; MHATRE, M.; RAO, P. S. Propagation of *Morus indica* L. (mulberry) by encapsulated shoots buds. **Plant Cell Reports**, New York, v. 6, n. 5, p. 393-395, Oct. 1987.

BONILLA, M. G. O. **Propagação *in vitro*, indução, curva de crescimento de calos e abordagem fitoquímica em *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth.** 2002. 162 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

BERTOLUCCI, S. K. V. **Micropropagação, calogênese e abordagem fitoquímica *in vivo* e *in vitro* de *Tournefortia cf paniculata* Cham.** 2000. 79 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

CAROTENUDO, D. *Uncaria tomentosa* (Willd) DC. San Marino: Poliedro, 1997. 35 p. (ZETA. Quaderno, 1).

CARVALHO, G. PASQUAL, M.; ANTUNES, L. E. C.; R MACIEL, A. L. R. Influencia do Benomyl e Benzilaminapurina sobre a proliferação *in vitro* do café e cv. Catuaí. **Revista Ceres**, Viçosa v. 43, n. 248, p. 402-408, 1996.

CHEN, I. J.; HU, T. W.; HUANG, L. C.; Protocol toward multiplication of the medicinal tree. *Eucommia ulmoides* Oliver. ***In vitro Cellular and Developmental Biology Plant***, Columbia, v. 31, p.193-198, 1995.

COELHO, M. C. F. **Germinação de semente e propagação *in vitro* de sucupira branca [*Pterodon pubescens* (Benth)].** 1999. 119 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras.

CORREA , D.; ALVES , M. da C. S. Micropropagação do cajueiro anão precoce, Fortaleza, CE, 1997. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 2., 1997, Gramado. **Anais...** Gramado: [s. n.], 1997. p. 257.

DECCETTI, S. F. C. **Propagação *in vitro* de *Annona glabra* L.** 2000. 101 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

EINSET, J. W. **A practical guide to woody plant micropropagation.** Arnoldia: Jamaica Plain, v. 46, p. 36-44, 1986.

FERREIRA, D. F. **SISVAR – Sistemas de análises de variância para dados balaceados:** programa de análises estatísticas e planejamento de experimentos, versão 4.3. Lavras: UFLA. 1999.

FIGUEREDO, S. F. L.; ALBARELLO, N.; VIANA, V. R. C. Micropropagation of *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill. ***In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant***, Wallingford, v. 37, n. 4, p. 471-475, July/Aug. 2000.

FRAGUAS, C. B. **Micropropagação e aspectos da anatomia foliar da figueira ‘Roxo de Valinhos’ em diferentes ambientes.** 2003. 110 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras. Lavras.

GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture:** handbook and directory of commercial Laboratories. Eversley: Exegetics, 1984. 593 p.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture:** part 1-The Technology. 2. ed. Edington: Exegetics, 1996. 574 p.

GRATTAPAGLIA D.; MACHADO, A. M. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPQ, 1998. p. 83-260.

HOSSAIN, M.; RAHMAN, S. M.; ZAMAN, A.; JOARDER, O. I.; ISLAM, R. Micropropagation of *Morus laevigata* Wall from mature trees. **Plant Cell Reports**, New York, v. 11, n.10, p. 522-524, Sept. 1992.

LERCH, K. Cooper monooxygenase. In: SIEGEL, H. (Ed.). **Metal ions in biological systems**. [S. l.]: Marchel Deckker, 1981. p. 143-186

LLOYD, G.; MCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant propagators Society Proceedings**, v. 30, p. 421-427, 1980.

LORETI, F.; PISANI, P. L. Physiological and technical factors affecting rooting in woody species. In: INTERNATIONAL HORTICULTURAL CONGRESS, 21., 1982, Hamburg. **Proceedings...** Hamburg: ISHS, 1982. v. 2, p. 294-309.

MARINO, G. Moltiplicazione e radicazione in vitro del pero cv. "William". **Rivista dell' Ortoflorofruitt It.**, v. 68, p. 95-106, 1984.

MARTINS, C. F.; NICOLOSO, F. T.; RUSSOWSKI, D.; FORTUNATO, R. P. Micropropagação de ginseng brasileiro (*Pfaffia tuberosa* (Spreng) Hicken): II Efeito da posição o segmento nodal na brotação. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTANICA, 51., 2000, Brasília. **Resumos...** Brasília: SBB, 2000.

MELO-FARIAS, P. C.; PETERS, J. A .; NAKASU, B. H. Micropropagação de porta-enxerto de Pereira "Old Home" x Farmingdale" **Revista Brasileira de agrociência**, v. 2, n. 2, p. 71-78, 1996.

MHATRE, M.; BAPAT, V. A.; RAO, P. S. Regeneration of plants from the culture of leaves and axillary buds in mulberry (*Morus indica* L.) **Plant Cell Reports**, New York, v. 4, n. 2, p.78-80, 1985.

MISHRA, M.; SAXENA, R. P.; PATHAK, R. K.; SRIVASTAVA, A. K. Studies on micropropagation of aonla (*Emblica officinalis* Gaertn). **Progressive Horticulture**, Chambattia, v. 31, n. 3/4, p. 116-122, Dec. 1999.

MÔNACO, L. C.; SONDALHL, M. R.; CARVALHO, A. Applications of tissue culture in the improvement of coffee. In: REINERT, J.; BAJAJ, Y. P. S. **Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture**. Berlin: Springer-verlag. 1977. p.109-126.

MORALES, G. C. F. **Influência do AIB e da presença de folhas no enraizamento de estacas de laranjeira “Valência” e tangerineiras Montenegrinhas** “. 1990. 125 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 25, p. 1335-166, 1974.

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

OBREGON VILCHES, L. **Una de gato Gênero Uncaria, Estudos botânicos, químicos y farmacológicos de *Uncaria tomentosa* y *Uncaria guianensis***. 3. ed. Lima: Instituto de Fitoterapia Americano. Lima, 1997. 169 p.

OCHATT, S. J.; CASO, O. H. *In vitro* propagation of peach: II A medium for *in vitro* multiplication of 56 peach cultivars. **Fruit Varieties Journal**, v. 40, p. 2, p. 39-48, 1983.

OLIVEIRA, A. K. D. de; ROCHA, R. H. C.; OLIVEIRA, O. F. de.; CÂMARA, F. A. A.; Multiplicação *in vitro* do Bilimbi utilizando-se diferentes concentrações de reguladores de crescimento. **Caatinga**, v. 14, n. 1/2. p. 37-41, 2001.

OLIVEIRA, P. D. O.; PASQUAL, M.; PAIVA, R. Efeito de diferentes reguladores de crescimento sobre a proliferação “*in vitro*” de brotos de crisântemo (*Dendranthema grandiflora* TZVELEV). **Ciência e Prática**, v. 19, n. 4, p. 397-408, 1995.

PASQUAL, M.; LOPES, P. A.; PINTO, J. E. B. P.; CHALFUN, N. N. J. Influencia de diversos fatores sobre a multiplicação de porta-enxerto de pereira *Pyrus caleryana* Dec. *in vitro*. **Ciência e Prática**, v. 14, n. 1, p. 28-34, 1990.

PATTNAIK, S. K.; SAHOO, Y.; CHAND, P. K. Micropropagation of a fruit tree *Morus australis* Poir.syn. *M. acidosa* Griff. **Plant Cell Reports**, New York, v. 15, n. 11, p. 841-845, Aug. 1996.

PEREIRA A. M. S.; MORO, J. R.; CERDEIRA, R. M. M.; FRANÇA, S. C. Effects of phytohormones and physiological characteristics of the explants on micropropagation of *Maytenus ilicifolia*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 42, n. 3, p. 295-297, 1995.

PINHEIRO, C. S. R. et al. Germinação *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gómez) em diferentes meios de cultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 413-416, ago. 2001.

PIERIK, R. L. M. ***In vitro* culture of higher plants**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1987. 345 p.

SILVA, S. R.; ROSARIO, S. L.; MAZZEI, J. L.; D'AVILA, L. A.; SIANI, A. C.; VALENTE, L. M. M. Estudo comparativo da extração e caracterização do perfil em CLAE dos alcalóides de espécies do gênero *Uncaria*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 25., 2002. **Anais...** [S. l.]: SBQ, 2002.

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

SOUZA, A. V. de. **Propagação *in vitro* e aspectos anatômicos de arnica** (*Lychnophora pinaster*) Mart. 2003. 127 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. Redwood City: The Benjamin/Cummings Publishing Company, 1991. 559 p.

TORREJÓN, G. D. **Uña de gato y producción sostenible**. Lima, Peru: Universidad Nacional Agraria La Molina, 1997. 138 p.

YUI, E.; CORREA, D. M.; PASQUAL, M.; PINTO, J. E. B. P. Micropropagação *in vitro* da macieira (*Malus domestica* Borkh) cultivar "Golden Delicious". **Ciência e Prática**, v. 14, n. 1, p. 56-61, 1990.

CAPÍTULO II

MICROPROPAGAÇÃO DE *Uncaria guianensis* (AUBL) GMEL. E *Uncaria tomentosa* (WILLD.) DC.

RESUMO

PEREIRA, Rita de Cássia Alves. Micropropagação de *Uncaria guianensis* (Aubl.) Gmel. e *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. In: ____ **Micropropagação, indução de calos, características anatômicas e monitoramento por biomarcadores de *Uncaria tomentosa* Willdenow Ex Roemer & (Schultes) DC e *Uncaria guianensis* (Aublet) Gmelin (unha de gato)**. 2004. p.41-71. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG.¹

Na Amazônia existe uma diversidade vegetal, onde se encontram muitas plantas com propriedades medicinais, e durante milênios sendo utilizado pelas comunidades nativas. A *U.guianensis* e *U.tomentosa* conhecida popularmente por unha de gato se atribuem efeitos imuno-estimulantes, anti-inflamatórios e inibidores de crescimento de células cancerígenas. Atualmente, as espécies vêm sendo submetidas a uma extração indiscriminada e intensiva que pode levá-las à sua extinção. A micropropagação permite solucionar problemas dessa natureza. O objetivo deste trabalho foi identificar um protocolo de propagação *in vitro* destas espécies. O melhor meio para germinação dos embriões foi o MS/4 independentes da presença ou não de sacarose. Para indução de brotações melhores resultados foram obtidos quando o meio foi suplementado com 2,0 mg.L⁻¹ de BAP. A posição de inoculação do explante da espécie *Uncaria guianensis*, demonstrou exercer influência no número médio de brotações/explante original, assim como no número de gemas iniciais. Presença ou ausência de GA₃ não exerceu efeito nesta característica, exceto quando explantes com uma única gema foram inoculados na posição horizontal. Os resultados indicaram que embriões são excelentes fontes de explantes somente para a espécie *Uncaria guianensis*. Para a indução de brotações múltiplas de *Uncaria tomentosa*, segmentos nodais inoculados em meio WPM acrescido de 1,00 mg.L⁻¹ de BAP foram os que apresentaram as melhores respostas.

¹ Comitê Orientador: Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto (Orientador)- UFLA, Dra Ligia Maria Marino Valente-UFRJ, Dr. Evaristo Mauro de Castro-UFLA.

ABSTRACT

PEREIRA, Rita de Cássia Alves. Micropropagation of *Uncaria guianensis* (Aubl.) Gmel. and *Uncaria tomentosa* (Willd) DC. In: ____ **Micropropagation, callus induction, anatomical characteristics and monitoring by biomarkers of *Uncaria tomentosa* (Willdenow Ex Roemer & Schultes) DC and *Uncaria guianensis* (Aublet) Gmelin (cat's claw)**. 2004. p.41-71 Thesis (Doctorate in Agronomy) - Federal University of Lavras, Lavras- MG.¹

In the Amazon rain forest there is a great botanical diversity in which a lot of plants with medicinal proprieties can be found, and for ages they have been used by the native people. One of those plants is (*U. guianensis* and *U. tomentosa*) known as “Cat’s claw” which is believed to have an antiinflammatory and immuno-stimulating effect. Also a growth inhibitor effect on carcinogenic cells. Currently, those species have been submitted to intensive and uncontrolled extraction that could lead to extinction. Micropropagation can solve these problems. The purpose of this work was to identify an in vitro propagation protocol for these species. The best medium for embryo germination was MS/4 independent from the presence or not of saccarose. For shoot induction, the better results came from a medium with 2,0 mg.L⁻¹ BAP. The explant inoculation position of *Uncaria guianensis* specie influenced the average number of shoots /original explant as well as the initial bud number. The GA₃ presence or absence had no effect on this characteristic, except when explants with only one bud were inoculated in the horizontal position. The results indicated that embryos are an excellent explants source only for *Uncaria guianensis* specie. For the induction of multi-shoot *Uncaria tomentosa* nodal segments inoculated in a WPM medium with 1.0 mg.L⁻¹ BAP gave better results.

¹ Guidance Committee: Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto (Advisor), UFLA, Dra Ligia Maria Marino Valente-UFRJ, Dr. Evaristo Mauro de Castro- UFLA.

1 INTRODUÇÃO

As espécies *Uncaria tomentosa* e *U. guianensis* conhecidas popularmente como unha de gato são trepadeiras lenhosas de ocorrência na Amazônia peruana, partes da Amazônia brasileira e também no Mato Grosso. O nome popular está associado aos espinhos encontrados na base de cada par de folhas. Essas plantas têm sido usadas tradicionalmente pelos indígenas peruanos e brasileiros há centenas de anos e os rumores de suas curas milagrosas despertaram, nos últimos 30 anos, o interesse científico e comercial sobre elas (Silva et al., 2002).

O interesse medicinal é decorrente da indicação popular como imunestimulante e anti-inflamatório (Carotenudo, 1997). Atualmente, as espécies vêm sendo submetidas a uma extração indiscriminada e intensiva, o que poderá levá-las à diminuição da variabilidade genética ou até mesmo a sua extinção.

A micropropagação de espécies lenhosas requer estudos mais específicos e desenvolvimento de metodologias que atendam as exigências do explante (Coelho, 1999; Decchetti, 2000). A dificuldade em se propagar plantas lenhosas é que, geralmente essas espécies apresentam maior variabilidade genética, menor capacidade regenerativa dos tecidos, concentração elevada de fenóis que, liberados ao meio de cultivo, impedem o desenvolvimento dos explantes (Pierik, 1987).

A oxidação fenólica é um dos sérios problemas que podem dificultar o estabelecimento inicial do cultivo *in vitro*. A liberação de compostos fenólicos ocorre devido ao dano causado nas células durante a excisão dos explantes. Algumas enzimas oxidam os fenóis formando quinonas (Lerch, 1981). As quinonas são responsáveis pela coloração marrom das culturas, além de

causarem a inibição do crescimento e morte dos explantes em grande número de espécies (Mônaco et al., 1977).

A propagação da unha de gato pode ser feita por sementes que, em geral, apresentam boa germinação. No entanto, plantas advindas de sementes revelam grande variabilidade quanto à morfologia e ao teor de metabólitos (Torrejón, 1997).

O problema principal da unha de gato como produto é a heterogeneidade das características químicas que se podem encontrar no mercado, sobretudo porque o abastecimento de matéria prima provém de bosques naturais. Nestas condições, a diversidade genética dentro da espécie pode ser muito variada, devido a cruzamentos ou ecótipos ligados à distribuição geográfica (Obregon Vilches, 1997).

A tecnologia *in vitro*, apoiada por um trabalho sistemático de seleção de características desejáveis, pode contribuir enormemente para a obtenção de plantas de qualidade garantida e em menor tempo em relação aos métodos tradicionais de propagação (Torrejón, 1997).

Para a micropropagação de plantas duas estratégias têm sido utilizadas: a regeneração de calos e a multiplicação de brotos. A regeneração de calos resulta em alta porcentagem, de variação somaclonal, tornando esta estratégia questionável para a multiplicação clonal em larga escala. Por outro lado, a multiplicação de brotos é um método que pode ser utilizado na propagação clonal de diversas espécies (Einset, 1986).

A regeneração de plantas *in vitro* tem obtido sucesso a partir de gemas apicais e axilares e explantes nodais para várias espécies da família Morácea (Mhatre et al., 1985; Bapat et al., 1987; Hossain et al., 1992; Pattnaik et al., 1996).

As auxinas e citocininas são as classes de reguladores de crescimento mais utilizadas na cultura de tecidos. A formação de raiz, parte aérea e calo, em cultura de tecidos são regulados pela disponibilidade e interação dessas duas classes de reguladores de crescimento (Skoog & Miller, 1957).

A aplicação exógena de auxinas e seus derivados têm estimulado ou acelerado o processo de enraizamento de numerosas espécies vegetais (Awad & Castro, 1989). Estas substâncias parecem ser os principais controladores do enraizamento; mas não é sempre possível confirmar uma relação direta entre conteúdo de auxina e capacidade de enraizamento das estacas (Loreti & Pisani, 1982). O efeito desses reguladores pode estar relacionado com os fatores genéticos próprios de cada espécie (Morales, 1990).

As giberelinas têm como principal efeito estimular o crescimento de órgãos já formados, mas podem inibir a iniciação de outros processos de formação de órgãos (Murashige, 1974; George & Sherrington, 1984). As giberelinas incrementam tanto a divisão celular quanto o alongamento das células formadas (Taiz & Zeiger, 1991).

O objetivo deste trabalho foi estudar a propagação *in vitro* de *Uncaria guianensis* e *Uncaria tomentosa* por meio de segmentos nodais obtidos a partir de embriões de ambas as espécies.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Estabelecimento *in vitro*

2.1.1 Procedência das sementes

As espécies em estudo foram classificadas e as exsicatas estão depositadas no herbário do Parque Zoobotânico da Universidade Federal do Acre (UFAC) sob registro e n^os 15.640 e 15.645 para a espécie *Uncaria guianensis* e *Uncaria tomentosa*, respectivamente.

Utilizaram-se sementes provenientes da Embrapa Acre (AC), coletadas de plantas adultas de populações naturais dos municípios de Boca do Acre-AM (*Uncaria guianensis*) e Feijó-AC (*Uncaria tomentosa*).

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Para análise estatística de todos os experimentos utilizou-se o programa Sisvar (Ferreira, 2002).

2.1.2 Desinfestação das sementes

Inicialmente as sementes foram lavadas em água corrente por 10 minutos e posteriormente desinfestadas em câmara de fluxo laminar, com solução de hipoclorito de sódio (1,25%) durante 15 minutos. Após a desinfestação, as sementes foram lavadas quatro vezes com água destilada e autoclavada para remoção do excesso da solução desinfestante.

2.1.3 Efeito da sacarose e concentração do meio MS na germinação *in vitro* de embriões de *Uncaria guianensis*

Os embriões foram excisados e inoculados em tubos de ensaio de 25 x 150mm, contendo 10 mL de meio de cultura Murashige & Skoog (1962), em duas concentrações: MS completo e ¼ de MS, solidificado com 6,0 g.L⁻¹ de ágar em combinação com 0,0 e 15 g.L⁻¹ de sacarose. O pH do meio foi ajustado em 5,7 antes da autoclavagem. Após a inoculação, os embriões foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, nível de irradiância de 15 μmol.m⁻².s⁻¹, e temperatura de 25 °C, durante 34 dias, quando se avaliou a porcentagem de germinação e comprimento das plântulas.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC) com quatro tratamentos e cinco repetições de 4 tubos cada uma constituindo um fatorial 2x2 sendo duas as concentrações do meio de cultivo (MS completo e 1/4MS) suplementados (15 g.L⁻¹) ou não (0,0 g.L⁻¹) com sacarose. Utilizou-se o teste de Tukey ao nível de 5% para a comparação das médias dos tratamentos.

2.1.4 Efeito de diferentes concentrações de benzilaminopurina na indução de brotações em embriões de *Uncaria guianensis*

Os embriões foram excisados e inoculados em tubos de ensaio de 25 x 150mm contendo 10 mL de meio de cultura MS, suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose, 6g.L⁻¹ de ágar e pH ajustado em 5,7 antes da autoclavagem. Após inoculação, os tubos foram incubados em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, irradiância de 15 μmol.m⁻².s⁻¹ e temperatura de 25 °C.

O delineamento experimental foi o inteiramente ao acaso, com seis tratamentos 0,0; 0,25; 0,50; 1,0; 2,0 e 4,0 mg.L⁻¹ de BAP com cinco repetições de 8 tubos cada uma.

Para a comparação das médias dos tratamentos, utilizou-se o teste de Tukey ao nível de 5%. Aos 60 dias de cultivo foram avaliados a porcentagem de germinação de embriões, coloração das plântulas, (atribuição de notas: 1-branco; 2-verde claro; 3-verde escuro), número de brotações e de raízes, comprimento da parte aérea e das raízes, biomassa fresca e seca da parte aérea e raízes.

2.1.5 Efeito da posição do explante na regeneração de brotos axilares *in vitro* de *Uncaria guianensis*

Segmentos nodais com 1, 2 e 3 gemas oriundos de plântulas cultivadas *in vitro*, foram inoculadas na posição horizontal ou posição vertical em meio de cultura MS, adicionado de 30 g.L⁻¹ de sacarose, 6g.L⁻¹ de ágar suplementados com 0,0 ou 0,5 g. L⁻¹ de GA₃ e distribuído em tubos de ensaio de 25 x 150 mm.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial (2x2x3) com duas posições de estaca, presença ou ausência de GA₃ totalizando 12 tratamentos com três repetições de 8 tubos cada uma. Aos 45 dias foram avaliadas: número e comprimento das brotações, fitomassa seca das brotações axilares.

2.1.6 Indução de brotações em segmentos nodais de *Uncaria tomentosa*

Segmentos nodais com 1,0 cm de comprimento médio de plantas jovens (15 meses) de *Uncaria tomentosa* estabelecidas em casa-de-vegetação, foram utilizados como explantes.

Em câmara de fluxo laminar os explantes foram imersos em água destilada e posteriormente em solução de hipoclorito de sódio (1,25%) por 15 minutos, após o qual lavados por quatro vezes com água destilada e autoclavada.

A inoculação dos explantes foi realizada em tubos de ensaio de 25 x 150 mm contendo 10 mL de meio WPM (Lloyd & Mccown, 1980), suplementados com 15 g.L⁻¹ de sacarose, 6g.L⁻¹ de ágar, pH ajustado para 5,7 e suplementado com 0,0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg.L⁻¹ de BAP.

Após a inoculação, os explantes foram incubados em sala de crescimento de 25 °C±1 irradiância de 15 µmol.m⁻².s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas por um período de 60 dias, quando se avaliou o tamanho das brotações (cm) formadas. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro tratamentos e cinco repetições de 12 tubos cada uma.

Os dados obtidos foram submetidos à interpretação estatística por meio da análise de variância e as comparações de médias por regressão polinomial.

Os segmentos nodais obtidos foram repicados e inoculados para multiplicação *in vitro* com o objetivo de obter plântulas para as análises anatômicas e fitoquímica das folhas das duas espécies.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Estabelecimento *in vitro*

3.1.1 Efeito da sacarose e concentração do meio MS na germinação *in vitro* de embriões de *Uncaria guianensis*

As sementes de *Uncaria guianensis* apresentaram boa percentagem de germinação ocorrendo uma semana após a inoculação dos embriões em média de 90%. Não houve efeito significativo da adição de sacarose e concentração do meio de cultura na germinação dos embriões de unha de gato. Percentuais de germinação de 100% ocorreram na presença de 15 g.L⁻¹ de sacarose, independente da concentração do meio de cultivo MS (Tabela 2.1).

TABELA 2.1. Percentagem de germinação de embriões e comprimento de brotações de *Uncaria guianensis* inoculados em diferentes concentrações de meio MS na ausência e presença de sacarose. UFLA, Lavras-MG, 2004

Tratamentos	Germinação (%)	Comprimento de brotações (cm)
1/4MS + 0,0 sacarose	92,50 A	1,0 A
MS + 0,0 sacarose	92,50 A	0,6 B
1/4MS + 15g.L ⁻¹ sacarose	100,00 A	1,2 C
MS + 15g.L ⁻¹ sacarose	100,00 A	0,5 C

Médias seguidas pela mesma letra na posição vertical, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Estes resultados encontram suporte semelhante aos relatados por Pinheiro et al. (2001), que verificaram que as maiores taxas de germinação em sementes de mangaba (*Hancornia speciosa*) foram encontradas quando se utilizaram baixas concentrações de sacarose.

O meio ¼ de MS na presença de sacarose proporcionou maior comprimento da parte aérea das plântulas (Tabela 2.1).

Souza (2003), trabalhando com *Lychnophora pinaster* (Mart.) obteve melhor porcentagem de embriões germinados e maior comprimento da parte aérea em meio MS/4. Grattapaglia & Machado (1998), afirmam que em alguns casos para espécies lenhosas o meio MS em 100% de sua concentração não mostrou melhores resultados. George (1996) admite que as soluções de sais orgânicos e açúcares que compõem os meios de cultura de tecidos não possuem efeito puramente nutritivo, mas influenciam o crescimento celular e a morfogênese através de propriedades osmóticas.

A Figura 2.1 mostra o efeito das diferentes concentrações do meio MS na ausência e presença de sacarose na germinação de embriões de *Uncaria guianensis*.

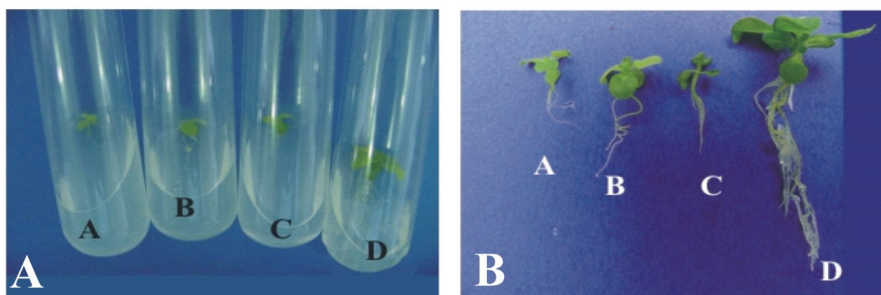


FIGURA 2.1. (A) Plântulas obtidas *in vitro* a partir de sementes de *Uncaria guianensis* e (B) após 34 dias de inoculação em meio MS com diferentes concentrações na ausência e presença de sacarose. (A= MS; B= $\frac{1}{4}$ MS; C= MS + sacarose; D= $\frac{1}{4}$ MS + sacarose) UFLA, Lavras-MG, 2004.

3.1.2 Efeito de diferentes concentrações de benzilaminopurina na indução de brotações em embriões de *Uncaria guianensis*

A porcentagem de germinação de embriões foi afetada pelas concentrações de BAP no meio de cultura (Tabela 2.2). A maximização da germinação ocorreu em meio MS sem a adição de BAP decrescendo à medida que se aumentou a concentração deste fitorregulador.

A intensidade de coloração das plântulas diminuiu com o aumento da concentração de BAP, ou seja, quanto maior a concentração deste fitorregulador, mais esbranquiçadas ficaram as plântulas; na ausência de BAP as plântulas obtiveram um verde mais intenso.

TABELA 2.2. Porcentagem de germinação (G), coloração (Cor), número de brotações (NB), comprimento (cm) da parte aérea (CPA), porcentagem de explantes que formaram raízes (FR), comprimento (CR) e número médio de raízes/explantes (NR), biomassa fresca (BFPA) e seca (BSPA) da parte aérea e biomassa fresca de raiz (BFR) a partir de embriões de *Uncaria guianensis*, aos 60 dias de cultivo em meio MS suplementado com diferentes concentrações de BAP. UFLA, Lavras-MG, 2004.

BAP (mg.L ⁻¹)	Características avaliadas									
	G (%)	Cor	NB	CPA	FR (%)	CR (cm)	NR	BFPA (mg)	BSPA (mg)	BFR (mg)
0	100,00 A	2,85 A	0,00 C	1,65 A	100,00 A	5,12 A	4,03 A	120 A	21,0 A	56,0 A
0,25	75,00 AB	1,95 B	0,10 C	0,64 B	52,50 AB	1,44 B	2,73 AB	20 B	4,9 B	27,0 B
0,50	70,00 ABC	1,73 BC	0,00 C	0,51 B	25,00 BC	0,89 BC	1,33 BC	10 B	3,58 B	13,0 BC
1,00	67,50 ABC	1,38 C	0,35 BC	0,52 B	25,00 BC	0,71 C	2,13 BC	30 B	2,96 B	5,4 C
2,00	50,00 BC	1,50 BC	1,83 A	0,61 B	12,50 BC	0,47 C	1,54 BC	30 B	4,38 B	3,9 C
4,00	35,00 C	1,35 C	1,25 AB	0,83 B	9,00 C	0,20 C	0,56 C	10 B	3,56 B	0,7 C

^Z Médias seguidas pela mesma letra na vertical, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Os maiores números de brotações por explante ocorreram nas concentrações mais elevadas de BAP (2,0 e 4,0 mg.L⁻¹) coincidindo com os resultados de Pereira et al. (1995) que, trabalhando com *Maytenus ilicifolia*, verificaram que o número de brotos formados foi influenciado pela concentração de BAP.

Correa & Alves (1997) demonstraram que na micropropagação do cajueiro anão precoce maior número de gemas em segmentos nodais também foram obtidos em meio acrescido de 2.0 mg.L⁻¹ de BAP. Esta observação confirma resultados obtidos por Pasqual et al. (1990), e Yui et al., (1990), que também verificaram que o BAP é de fundamental importância no meio de multiplicação em *Pyrus caleryana* e *Malus domestica*.

Observou-se também que com o aumento na concentração de BAP, de 1,0 para 2,0 mg.L⁻¹, o número de brotações foi de 5,23 maior (Tabela 2.2). Marino (1984), trabalhando com pereira cv. "William", obteve aumento de quase 400% na multiplicação correspondendo ao aumento na concentração de BAP no meio de 0,5 para 2,0 mg.L⁻¹.

Com exceção do número de brotos, todas as variáveis foram reduzidas com o aumento das concentrações de BAP. A citocinina tem uma função de divisão celular, fazendo que as brotações mostram uma aparência anormal, ou seja, os folíolos apresentaram-se pequenos (Figura 2.2).

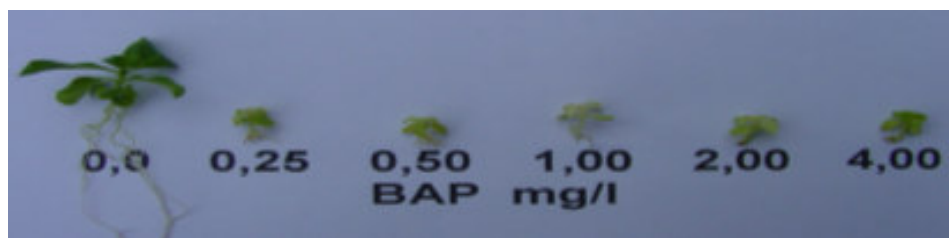


FIGURA 2.2. Efeito de diferentes concentrações de benzilaminopurina (BAP) na indução de brotações em embriões de *Uncaria guianensis*. UFLA, Lavras, MG, 2004.

Esse fato também ocorreu quando Bertolucci (2000) conseguiu maior crescimento das brotações (4,93 cm) em plântulas de marmelinho (*Tournefortia cf paniculata*) em meio de cultura também isento de regulador. Maior número de brotos dessa espécie foi obtido na concentração de 1,00 mg. L⁻¹ de BAP (6,86), diferindo da unha de gato, na concentração de 2,00 mg. L⁻¹ (1,83). Estes resultados mostram a importância do genótipo em relação à resposta regenerativa *in vitro*.

Os resultados mostraram que há maior necessidade de mais experimentos de micropropagação para maximizar uma maior indução de brotações adventícias ou axilares em que se possa verificar interações de citocininas com auxinas e concentrações de meios de cultura.

3.1.3 Efeito de giberelina e posição do explante no alongamento *in vitro* de *Uncaria guianensis*

A dominância apical afeta o surgimento de brotações axilares devido a influência das auxinas nas gemas axilares. Como as auxinas se movimentam polarmente dentro de células, a posição do explante vertical ou horizontal poderá

afetar na regeneração das gemas axilares quebrando assim a dominância do ápice sobre as gemas axilares. Neste caso, a posição de inoculação do explante demonstrou exercer influência no número médio de brotações axilares/explante original, mostrando que houve quebra da dormência apical sobre as gemas axilares. Presença ou ausência de GA₃ não exerceu efeito no número médio de brotações axilares regeneradas, exceto quando explantes com uma única gema foram inoculados na posição horizontal, proporcionando números reduzidos de brotações finais, comparado aos explantes inoculados na vertical, independente do número de gemas iniciais ou GA₃ (Tabela 2.3).

TABELA 2.3. Número médio de brotações em explantes foliares de unha de gato com diferentes números de gemas (G), inoculados em posições horizontal e vertical em meio MS suplementado ou não com de GA₃. UFLA, Lavras-MG, 2004.

	Posição de inoculação	Número de brotos		
		1G	2G	3G
Presença de GA ₃ (+)	Horizontal	1,25 Bb	1,83 Aa	2,25 Aa
	Vertical	1,08 Bb	1,08 Bb	1,20 Bb
Ausência de GA ₃ (-)	Horizontal	2,17 Aa	2,00 Aa	2,08 Aa
	Vertical	1,00 Bb	1,17 Bb	1,17 BA

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre tipo de explante, minúscula entre posição de explante não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Explantes inoculados na posição horizontal em meio com GA₃ respondem ao acréscimo de gemas iniciais, aumentando o número de brotações finais, fato não observado quando estes foram inoculados em ausência de GA₃. Yui et al., (1990) trabalhando com macieira cv. “Golden Delicious”, observaram

que não houve diferença significativa para o número de brotos quando utilizados os níveis de 0,0; 0,01; 0,1 e 1,0 mg.L⁻¹ de GA₃.

Os mesmos autores concluíram pelos resultados obtidos, que o GA₃ é dispensável nos trabalhos de multiplicação da macieira *in vitro* de acordo com as informações de Ochatt & Caso (1983) e Mello-Farias et al., (1996). O efeito do GA₃ na proliferação de brotações varia conforme a interação existente com outros reguladores de crescimento, dependendo também da espécie que está sendo micropropagada (George, 1996).

Como ocorreu com a característica número de brotações, maior comprimento de plântulas originais foi observado em explantes inoculados na posição horizontal, independente da suplementação com GA₃ e do número de gemas iniciais. Explantes inoculados na posição vertical com uma gema inicial e na presença de GA₃ apresentaram comprimento comparável aos explantes inoculados na posição horizontal (Tabela 2.4).

TABELA 2.4. Comprimento médio de brotações em explantes foliares de unha de gato com diferentes números de gemas (G), inoculados em posições horizontal e vertical em meio MS suplementado ou não com GA₃ UFLA, Lavras-MG, 2004.

	Posição de inoculação	Comprimento das brotações (cm)		
		1G	2G	3G
Presença de GA ₃ (+)	Horizontal	2,25 Aa	2,47 Aa	3,08 Aa
	Vertical	2,33 Aa	1,34 Bb	1,24 Bb
Ausência de GA ₃ (-)	Horizontal	2,81 Aa	2,64 Aa	2,67 Aa
	Vertical	1,38 Bb	1,58 Bb	1,28 Bb

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre tipo de explante, minúscula entre posição de explante não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

De modo semelhante, Oliveira et al., (2001) trabalhando com *Averrhoa bilimbi* L. em meio de cultura contendo $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de GA_3 , verificaram que a presença de giberelina pouco contribuiu para o crescimento dos explantes.

Mishra et al., (1999) descreveram o alongamento dos internódios de *Emblica officinalis* quando utilizaram 1 mg.L^{-1} de GA_3 , enquanto que 3 mg.L^{-1} causaram desfolhamento de alguns explantes. Deccetti (2000) relatou o efeito prejudicial do GA_3 no desenvolvimento de brotações de *Annona glabra*, além da ocorrência de necrose apical. No entanto, Figueredo et al.; (2001) relataram a necessidade do GA_3 para o alongamento das brotações de *Rollinia mucosa*.

O aspecto geral das plântulas, aos 45 dias de inoculação, pode ser visualizado nas Figuras 2.3 A e B.

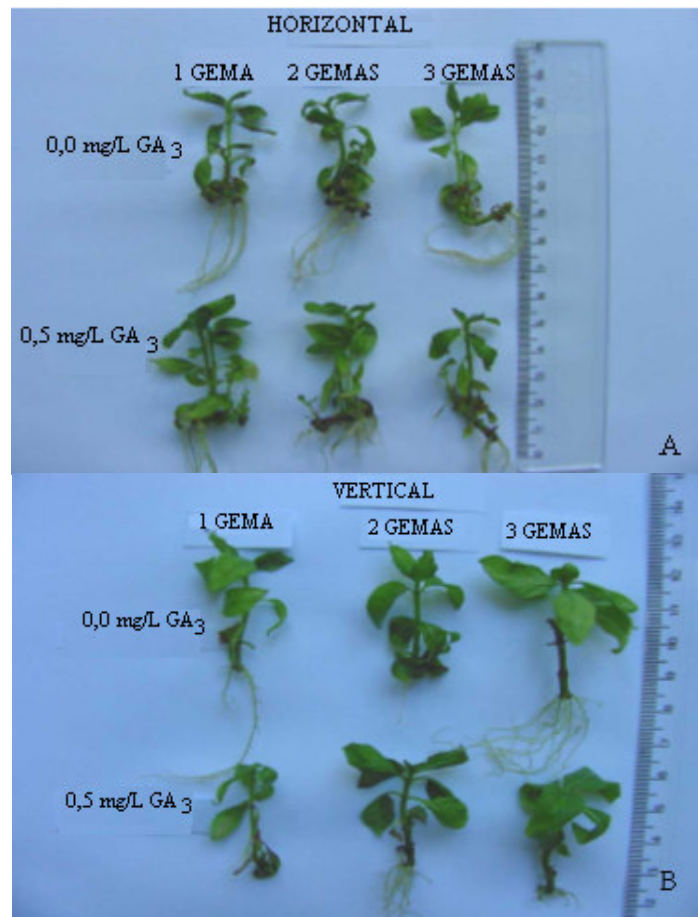


FIGURA 2.3. Aspecto geral da interação entre posição do explante (A) horizontal e (B) vertical, na presença e/ou ausência de GA₃ e número de gemas iniciais por ocasião da inoculação de segmentos nodais de *Uncaria guianensis*. UFLA, Lavras-MG, 2004.

Presença de GA₃ no meio de cultura não proporcionou acúmulo de fitomassa. Na maioria dos casos porém foi significativamente inferior o acúmulo de fitomassa em explantes com uma gema inoculada na posição horizontal. Em explantes inoculados na posição horizontal, o número de gemas iniciais

influenciou apenas em presença de GA₃, enquanto explantes com uma única gema revelaram fitomassa seca inferior.

Plântulas com maiores acúmulos de fitomassa seca foram observadas em explantes inoculados na posição horizontal sem GA₃ independente do número de gemas, obtendo-se pesos entre 30 a 40 mg (Tabela 2.5). Resultados semelhantes foram encontrados por Fráguas (2003), em plantas micropropagadas de figueira, em que o maior peso da matéria fresca dos explantes inoculados foi de 32 mg na ausência de giberelina.

TABELA 2.5. Média de fitomassa seca de brotações em explantes foliares de unha de gato com diferentes números de gemas (G), inoculados em posições horizontal e vertical em meio MS suplementado ou não com GA₃. UFLA, Lavras-MG, 2004.

	Posição de inoculação	Fitomassa seca de brotações (mg)		
		1G	2G	3G
Presença de GA ₃ (+)	Horizontal	22,3 Bb	34,1Aa	33,73 Aa
	Vertical	18,33 Cc	17,61Cc	25,18 Bb
Ausência de GA ₃ (-)	Horizontal	30,10 Aa	37,60Aa	34,18 Aa
	Vertical	16,58 Cc	23,46Bb	25,48 Bb

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre tipo de explante, minúscula entre posição de explante não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Desse modo, o comportamento observado no desenvolvimento de *Uncaria guianensis* cultivada *in vitro*, sugere que a metodologia apresentada pode ser considerada para estudos do desenvolvimento vegetal.

Os resultados demonstram que o uso de segmentos nodais com três gemas e inoculados na posição horizontal são de relevante importância na fase de multiplicação da espécie *Uncaria guianensis*. Esse comportamento corrobora as observações de Murashige (1974) com *Nicotiana tabacum* e com *Pfaffia tuberosa* (Martins et al., 2000).

3.1.4 Indução de brotações em segmentos nodais de *Uncaria tomentosa*

Os explantes de *Uncaria tomentosa* inoculados em meio WPM suplementado com $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP obtiveram maior número de brotações. Não houve formação de raízes ou calos na base dos segmentos nodais para todos os tratamentos (Figura 2.4).

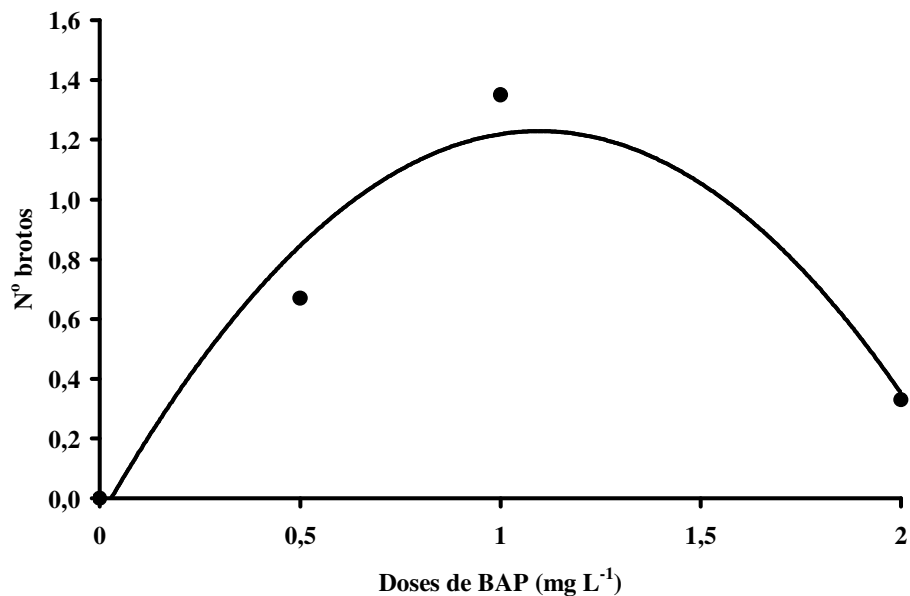


FIGURA 2.4. Efeito da concentração de BAP sobre o número de brotações induzidas a partir de segmentos nodais de *Uncaria tomentosa* em meio WPM. UFLA, Lavras-MG, 2004.

Oliveira et al., (2001) e Chen et al., (1995) quando trabalharam com as espécies *Averrhoa bilimbi* L. e *Eucommia ulmoides*, respectivamente, em meio WPM adicionado com 1,0 mg. L⁻¹ de BAP, observaram a superioridade na formação de brotos apicais. Na proliferação *in vitro* de brotos de crisântemos Oliveira & Pasqual (1995) verificaram a eficiência do BAP e o favorecimento da multiplicação em *Coffea arabica* L (Carvalho et al., 1996).

Verificou-se que o BAP é um componente fundamental do meio de multiplicação para *Uncaria tomentosa*, sendo a sua presença necessária para a sobrevivência e subsequente multiplicação de brotos, pois na ausência deste regulador de crescimento não houve desenvolvimento de novos brotos, concordando com Grattapaglia & Machado (1998) que afirmam que o BAP proporciona melhores resultados na micropropagação de plantas.

A espécie *Uncaria guianensis* mostrou necessidade de maior concentração de BAP (2,0 mg.L⁻¹) para multiplicação *in vitro* de brotações em relação a *Uncaria tomentosa* (1,0 mg.L⁻¹).

Para o comprimento das brotações, as melhores respostas foram obtidas com o uso de 1,0 mg.L⁻¹ de BAP, sendo 1,8 cm o maior comprimento das brotações.

Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Bonilla (2002) que trabalhando com plantas de chá de bugre, em meio WPM adicionado a diferentes concentrações de BAP, concluiu que esse meio suplementado com 4,0 mg.L⁻¹ de BAP originou maiores brotações.

A partir dessa concentração 1,0 mg.L⁻¹ de BAP, houve tendência de redução no comprimento das brotações (Figura 2.5). Grattapaglia & Machado (1998) relatam que a tendência de diminuição de brotações, a partir de determinada concentração, pode estar ligada ao fato de que as citocininas

estimulam a maior produção de parte aérea até uma determinada concentração, o que é específico para cada espécie, a partir da qual ocorre efeito tóxico.

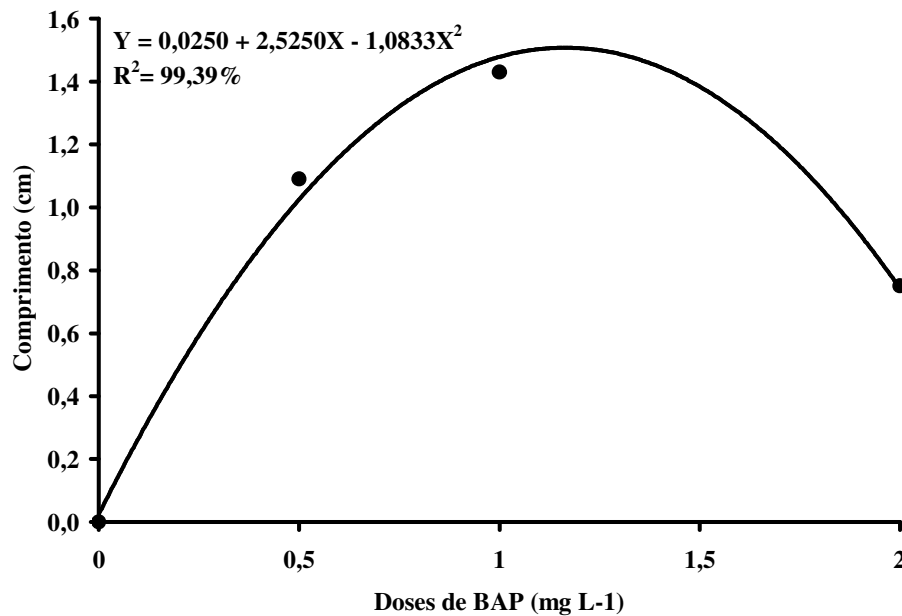


FIGURA 2.5. Efeito da concentração de BAP sobre o comprimento de brotações (cm) formadas a partir de segmentos nodais de *Uncaria tomentosa* em meio WPM. UFLA, Lavras, MG, 2004.

Com base nestes resultados pode-se inferir que a *Uncaria tomentosa* é uma espécie que necessita de concentrações relativamente baixas de BAP para obtenção de brotações com maiores comprimentos

Até o momento existem poucos trabalhos referentes à micropropagação das duas espécies de unha de gato, tornando difícil a comparação dos resultados obtidos. Assim, estudos subseqüentes com essa espécie são necessários para

aprimorar o atual estado de conhecimento para promover maior multiplicação e estabilidade da cultura.

4 CONCLUSÕES

- Embriões de *Uncaria guianensis* são excelentes fontes de explantes para o estabelecimento de cultura *in vitro*. Os melhores percentuais de germinação ocorrem na presença de 15 g.L de sacarose, independente da concentração do meio de cultivo MS.
- Maior número de brotações (1,83) em *Uncaria guianensis* foi obtido utilizando-se 2,0 mg.L⁻¹ de BAP.
- Explantes de *Uncaria guianensis* inoculados na posição horizontal em meios sem GA₃ respondem ao acréscimo de gemas iniciais, aumentando o número de brotações finais.
- A posição horizontal liberou a dominância apical.
- Os explantes de *Uncaria tomentosa* inoculados em meio WPM suplementado com 1,0 mg.L⁻¹ de BAP obtiveram os melhores resultados e apresentaram duas brotações por segmentos nodais.
- Na ausência de BAP não houve desenvolvimento de novos brotos em *Uncaria tomentosa*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AWAD, M.; CASTRO, P. L. **Introdução à fisiologia vegetal**. São Paulo: Nobel, 1989. 177 p.

BAPAT, V. A.; MHATRE, M.; RAO, P. S. Propagation of *Morus indica* L. (mulberry) by encapsulated shoots buds. **Plant Cell Reports**, New York, v. 6, n. 5, p. 393-395, Oct. 1987.

BONILLA, M. G. O. **Propagação *in vitro*, indução, curva de crescimento de calos e abordagem fitoquímica em *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth.** 2002. 162 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

BERTOLUCCI, S. K. V. **Micropropagação, calogênese e abordagem fitoquímica *in vivo* e *in vitro* de *Tournefortia cf paniculata* Cham.** 2000. 79 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

CAROTENUDO, D. *Uncaria tomentosa* (Willd) DC. San Marino: Poliedro, 1997. 35 p. (ZETA. Quaderno, 1).

CARVALHO, G. PASQUAL, M.; ANTUNES, L. E. C.; R MACIEL, A. L. R. Influencia do Benomyl e Benzilaminapurina sobre a proliferação *in vitro* do café e cv. Catuaí. **Revista Ceres**, Viçosa v. 43, n. 248, p. 402-408, 1996.

CHEN, I. J.; HU, T. W.; HUANG, L. C.; Protocol toward multiplication of the medicinal tree. *Eucommia ulmoides* Oliver. ***In vitro Cellular and Developmental Biology Plant***, Columbia, v. 31, p.193-198, 1995.

COELHO, M. C. F. **Germinação de semente e propagação *in vitro* de sucupira branca [*Pterodon pubescens* (Benth)].** 1999. 119 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras.

CORREA , D.; ALVES , M. da C. S. Micropropagação do cajueiro anão precoce, Fortaleza, CE, 1997. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 2., 1997, Gramado. **Anais...** Gramado: [s. n.], 1997. p. 257.

DECCETTI, S. F. C. **Propagação *in vitro* de *Annona glabra* L.** 2000. 101 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

EINSET, J. W. **A practical guide to woody plant micropropagation.** Arnoldia: Jamaica Plain, v. 46, p. 36-44, 1986.

FERREIRA, D. F. **SISVAR – Sistemas de análises de variância para dados balaceados:** programa de análises estatísticas e planejamento de experimentos, versão 4.3. Lavras: UFLA. 1999.

FIGUEREDO, S. F. L.; ALBARELLO, N.; VIANA, V. R. C. Micropropagation of *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill. ***In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant***, Wallingford, v. 37, n. 4, p. 471-475, July/Aug. 2000.

FRAGUAS, C. B. **Micropropagação e aspectos da anatomia foliar da figueira ‘Roxo de Valinhos’ em diferentes ambientes.** 2003. 110 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras. Lavras.

GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture:** handbook and directory of commercial Laboratories. Eversley: Exegetics, 1984. 593 p.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture:** part 1-The Technology. 2. ed. Edington: Exegetics, 1996. 574 p.

GRATTAPAGLIA D.; MACHADO, A. M. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPQ, 1998. p. 83-260.

HOSSAIN, M.; RAHMAN, S. M.; ZAMAN, A.; JOARDER, O. I.; ISLAM, R. Micropropagation of *Morus laevigata* Wall from mature trees. **Plant Cell Reports**, New York, v. 11, n.10, p. 522-524, Sept. 1992.

LERCH, K. Cooper monoxygenase. In: SIEGEL, H. (Ed.). **Metal ions in biological systems**. [S. l.]: Marchel Deckker, 1981. p. 143-186

LLOYD, G.; MCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant propagators Society Proceedings**, v. 30, p. 421-427, 1980.

LORETI, F.; PISANI, P. L. Physiological and technical factors affecting rooting in woody species. In: INTERNATIONAL HORTICULTURAL CONGRESS, 21., 1982, Hamburg. **Proceedings...** Hamburg: ISHS, 1982. v. 2, p. 294-309.

MARINO, G. Moltiplicazione e radicazione in vitro del pero cv. "William". **Rivista dell' Ortoflorofruitt It.**, v. 68, p. 95-106, 1984.

MARTINS, C. F.; NICOLOSO, F. T.; RUSSOWSKI, D.; FORTUNATO, R. P. Micropropagação de ginseng brasileiro (*Pfaffia tuberosa* (Spreng) Hicken): II Efeito da posição o segmento nodal na brotação. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTANICA, 51., 2000, Brasília. **Resumos...** Brasília: SBB, 2000.

MELO-FARIAS, P. C.; PETERS, J. A .; NAKASU, B. H. Micropropagação de porta-enxerto de Pereira "Old Home" x Farmingdale." **Revista Brasileira de agrociência**, v. 2, n. 2, p. 71-78, 1996.

MHATRE, M.; BAPAT, V. A.; RAO, P. S. Regeneration of plants from the culture of leaves and axillary buds in mulberry (*Morus indica* L.) **Plant Cell Reports**, New York, v. 4, n. 2, p.78-80, 1985.

MISHRA, M.; SAXENA, R. P.; PATHAK, R. K.; SRIVASTAVA, A. K. Studies on micropropagation of aonla (*Emblica officinalis* Gaertn). **Progressive Horticulture**, Chambattia, v. 31, n. 3/4, p. 116-122, Dec. 1999.

MÔNACO, L. C.; SONDALHL, M. R.; CARVALHO, A . Applications of tissue culture in the improvement of coffee. In: REINERT, J.; BAJAJ, Y. P. S. **Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture**. Berlin: Springer-verlag. 1977. p.109-126.

MORALES, G. C. F. **Influência do AIB e da presença de folhas no enraizamento de estacas de laranjeira “Valência” e tangerineiras Montenegrinhas** “. 1990. 125 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 25, p. 1335-166, 1974.

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

OBREGON VILCHES, L. **Una de gato Gênero Uncaria, Estudos botânicos, químicos y farmacológicos de *Uncaria tomentosa* y *Uncaria guianensis***. 3. ed. Lima: Instituto de Fitoterapia Americano. Lima, 1997. 169 p.

OCHATT, S. J.; CASO, O. H. *In vitro* propagation of peach: II A medium for *in vitro* multiplication of 56 peach cultivars. **Fruit Varieties Journal**, v. 40, p. 2, p. 39-48, 1983.

OLIVEIRA, A. K. D. de; ROCHA, R. H. C.; OLIVEIRA, O. F. de.; CÂMARA, F. A. A.; Multiplicação *in vitro* do Bilimbi utilizando-se diferentes concentrações de reguladores de crescimento. **Caatinga**, v. 14, n. 1/2, p. 37-41, 2001.

OLIVEIRA, P. D. O.; PASQUAL, M.; PAIVA, R. Efeito de diferentes reguladores de crescimento sobre a proliferação “*in vitro*” de brotos de crisântemo (*Dendranthema grandiflora* TZVELEV). **Ciência e Prática**, v. 19, n. 4, p. 397-408, 1995.

PASQUAL, M.; LOPES, P. A.; PINTO, J. E. B. P.; CHALFUN, N. N. J. Influencia de diversos fatores sobre a multiplicação de porta-enxerto de pereira *Pyrus caleryana* Dec. *in vitro*. **Ciência e Prática**, v. 14, n. 1, p. 28-34, 1990.

PATTNAIK, S. K.; SAHOO, Y.; CHAND, P. K. Micropropagation of a fruit tree *Morus australis* Poir.syn. *M. acidosa* Griff. **Plant Cell Reports**, New York, v. 15, n. 11, p. 841-845, Aug. 1996.

PEREIRA A. M. S.; MORO, J. R.; CERDEIRA, R. M. M.; FRANÇA, S. C. Effects of phytohormones and physiological characteristics of the explants on micropropagation of *Maytenus ilicifolia*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 42, n. 3, p. 295-297, 1995.

PINHEIRO, C. S. R. et al. Germinação *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gómez) em diferentes meios de cultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 413-416, ago. 2001.

PIERIK, R. L. M. ***In vitro* culture of higher plants**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1987. 345 p.

SILVA, S. R.; ROSARIO, S. L.; MAZZEI, J. L.; D'AVILA, L. A.; SIANI, A. C.; VALENTE, L. M. M. Estudo comparativo da extração e caracterização do perfil em CLAE dos alcalóides de espécies do gênero *Uncaria*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 25., 2002. **Anais...** [S. l.]: SBQ, 2002.

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

SOUZA, A. V. de. **Propagação *in vitro* e aspectos anatômicos de arnica** (*Lychnophora pinaster*) Mart. 2003. 127 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. Redwood City: The Benjamin/Cummings Publishing Company, 1991. 559 p.

TORREJÓN, G. D. **Uña de gato y producción sostenible**. Lima, Peru: Universidad Nacional Agraria La Molina, 1997. 138 p.

YUI, E.; CORREA, D. M.; PASQUAL, M.; PINTO, J. E. B. P. Micropropagação *in vitro* da macieira (*Malus domestica* Borkh) cultivar "Golden Delicious". **Ciência e Prática**, v. 14, n. 1, p. 56-61, 1990.

CAPÍTULO III

INDUÇÃO E ESTABELECIMENTO DA CURVA DE CRESCIMENTO DE CALOS DE *Uncaria guianensis* (AUBL.) GMEL. E *Uncaria tomentosa* (WILD.) DC.

RESUMO

PEREIRA, Rita de Cássia Alves. Indução e estabelecimento da curva de crescimento de calos de *Uncaria guianensis* (Aubl.) Gmel. e *Uncaria tomentosa* (Willd) DC. In: ____ **Micropropagação, indução de calos, características anatômicas e monitoramento por biomarcadores de *Uncaria tomentosa* Willdenow Ex Roemer & (Schultes) DC e *Uncaria guianensis* (Aublet) Gmelin (unha de gato)**. 2004. p.72-103. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG.¹

O objetivo do trabalho foi avaliar a influência de diferentes auxinas (Picloram, ANA, 2,4-D e AIB) na indução e manutenção de calos, em explantes originados de plantas *in vivo* e *in vitro* de *U. guianensis* e *U. tomentosa*, e estabelecer a curva de crescimento. Segmentos foliares de plantas cultivadas *in vivo* depois de desinfestadas foram cultivados em meio MS suplementado com 0,5; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹ das diferentes auxinas. O melhor resultado na indução de calos foi obtido com Picloram na concentração de 0,5 mg.L⁻¹. Ocorreu efeito diferenciado para o início da estabilização da curva de crescimento entre as diferentes auxinas: Picloram, 2,4-D e AIB proporcionaram estabilização aos 25 dias de crescimento; ANA proporcionou maior acúmulo de fitomassa, podendo ser repicado entre 30 a 40 dias. Para a espécie *Uncaria tomentosa* a maximização de calos independe da origem dos explantes havendo necessidade de suplementação com Picloram ao meio de cultivo para ocasionar maiores acúmulos de fitomassa na concentração de 0,5mg.L⁻¹. As diferentes auxinas influenciaram no acúmulo de fitomassa ao longo dos 40 dias avaliados; 2,4-D e AIB mantiveram padrão de crescimento similar durante o período de cultivo, exceto aos 5° e 35° dias de cultivo, quando não ocorreram diferenças entre elas. Na presença de 2,4-D e AIB ocorreu antecipação da estabilização do crescimento dos calos (20 dias de cultivo). Na presença de Picloram e ANA a estabilização ocorreu aos 25 dias.

¹ Comitê Orientador: Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto (Orientador)- UFLA, Dra Ligia Maria Marino Valente-UFRJ, Dr. Evaristo Mauro de Castro-UFLA.

ABSTRACT

PEREIRA, Rita de Cássia Alves. Induction and establishment of the growth curve of callus of *Uncaria guianensis* (Aubl.) Gmel. and *Uncaria tomentosa* (Wild) DC. In: ____ **Micropropagation, callus induction, anatomical characteristics and monitoring by biomarkers of *Uncaria tomentosa* (Willdenow Ex Roemer & Schultes) DC and *Uncaria guianensis* (Aublet) Gmelin (cat's claw)**. 2004. p.72-103. Thesis (Doctorate in Agronomy) - Federal University of Lavras, Lavras- MG.¹

The main purpose of this work was to evaluate the influence of different auxins (Picloram, NAA, 2,4-D, and IBA) in the induction and maintenance of callus in explants originating from *in vivo* and *in vitro* *Uncaria guianensis* and *Uncaria tomentosa* plants and to establish the growth curve. Leaf segments of *in-vivo* cultivated plants, after being disinfected, were cultivated in an MS medium supplemented with 0.5; 1.0 and 2.0 mg L⁻¹ of the different auxins. The better callus induction result was from Picloram in the concentration of 0,5 mg L⁻¹. There was a differentiated effect for the beginning of the stabilization of the growth curve among the different auxins: Picloram, 2,4-D and IBA established at 25 days of growth. NAA showed higher phytomass accumulation, being able to replicate between 30 and 40 days. For the *Uncaria tomentosa* species callus maximization did not depend on the explants of origin having the necessity of the culture medium being supplied with Picloram to increase phytomass accumulation during the 40 day evaluation. 2,4-D and IBA showed a growth pattern similar in superiority during the growth period, except in the 5th and 35th cultivation days, when no difference occurred between them. In the presence of 2,4-D and IBA the anticipation of callus growth stabilization (20 days of growth) occurred. In the presence of Picloram and NAA the stabilization occurred at 25 days.

¹ Guidance Committee: Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto (Advisor), UFLA, Dra Ligia Maria Marino Valente-UFRJ, Dr. Evaristo Mauro de Castro- UFLA.

1 INTRODUÇÃO

A coleta de plantas, no Brasil, realiza-se de forma intensa, desordenada e não sustentável. Essa realidade tem levado a reduções drásticas das populações naturais destas plantas. O Brasil, apesar de ser o País com maior diversidade vegetal do mundo, com mais de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000, pelo acelerado processo de devastação dos ecossistemas tropicais tem comprometido a preservação da sua flora (Pereira, 2000).

A unha-de-gato (*Uncaria tomentosa* e *Uncaria guianensis*) é um cipó trepador lenhoso que ocorre na Amazônia Ocidental Brasileira, encontrado em vários municípios acreanos com maior abundância no Vale do Juruá. Estas plantas vêm sendo utilizadas por populações tradicionais, especialmente por aquelas de origem peruana, para tratamento de câncer, reumatismos, gastrite, inflamações, diabetes entre outras doenças. As partes comerciais de ambas as espécies são a casca do caule e a raiz (Miranda et al., 2001).

A falta de informações sobre as espécies, características botânicas, ecologia, distribuição geográfica e questões ligadas ao mercado são os principais empecilhos para a exploração sustentada deste recurso. Desta forma torna-se indispensável sistematização das informações já existentes e a geração de novas informações sobre o manejo destas espécies, bem como sobre a viabilidade ecológica e econômica da exploração (Miranda & Sousa, 2002).

A cultura de tecidos vegetais, técnica de cultivo de células, tecidos e órgãos em um meio nutritivo na ausência de microorganismos, baseiam-se no princípio da totipotência, o qual considera que cada célula vegetal contém potencial para regenerar uma planta inteira. Assim, este princípio pode ser aplicado na regeneração de plantas, a partir de culturas celulares e de tecidos. O

cultivo de tecidos vegetais *in vitro* pode minimizar os efeitos de variação de fatores ambientais e proporcionar maior controle sobre as condições de temperatura, luz e nutrientes. Em função disso, a produção de compostos torna-se viável (Seabrook, 1980).

Como ferramenta única e de grande potencial, a biotecnologia despertou o interesse crescente de pesquisadores de diferentes áreas: química, bioquímica, botânica, genética e farmacologia.

A cultura de tecidos pode produzir compostos idênticos (Bajaj et al. 1988) ou similares (Raí, 1978) daqueles presentes na planta, ou ainda, não produzi-los (Wang & Stabba, 1963). A operação preliminar para o estudo de metabólitos consiste no estabelecimento do cultivo *in vitro*.

O desenvolvimento dos calos originados de um fragmento de tecido pode ser dividido em três estágios: indução, divisão e diferenciação. Na indução, durante a qual as células preparam-se para se dividir, o metabolismo é ativado e as células permanecem em tamanho constante; nesta fase ocorre síntese de proteína. Na divisão celular, ocorre a dediferenciação das células para características parenquimáticas, resultando formação de um crescimento padrão (Aitchison et al., 1977).

As auxinas são muito utilizadas em trabalhos de cultura de tecidos vegetais e são incorporadas ao meio de cultura para promover formação de calos, crescimento de células em suspensão, órgãos e regulação da morfogênese, especialmente quando associada a citocininas. A escolha dos compostos e a concentração necessária dependem do tipo de crescimento ou do desenvolvimento necessário, do nível da auxina endógena do explante, da capacidade do tecido cultivado de sintetizar auxina naturalmente e da interação entre a auxina sintética aplicada e da auxina endógena (George, 1993). As principais auxinas são AIA (ácido 3-indolacético), ANA (ácido

naftalenoacético), AIB (ácido indolbutírico), 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético), Picloram (ácido 4-amino-3, 5,6 tricloropicolínico), CPA (ácido 4-clorofenoxi) acético e NOA (ácido naftoxiacético). Em muitas culturas de tecidos, onde o crescimento de calos é normal, a adição de auxinas torna-se necessária para o crescimento contínuo de tais calos. A quantidade de tecido caloso formado está relacionada à concentração de AIA aplicada, entretanto, altas concentrações causam maior desenvolvimento do tecido caloso (Devlin & Witham, 1983).

O estabelecimento e a utilização da cultura de calos requerem alguns meses. Os calos são induzidos em meio semi-sólido após um a dois meses. Todavia, devido à pequena quantidade de metabólitos secundários, faz-se necessária a transferência da biomassa para outro meio semi-sólido visando o estabelecimento do cultivo de calos, com os esforços direcionados para a obtenção de maior biomassa, isto é a determinação de fases distintas: a lag, a exponencial, a linear, a desaceleração e a estacionária (Smith, 1992). Diversos subcultivos são realizados e produzem uma quantidade de biomassa celular suficiente para o estudo de produção de metabólitos (Botta et al., 1989).

Murashige (1974) afirma que vários fatores se relacionam com o explante interferindo na calogênese, como: tamanho do explante, composição do meio de cultura e reguladores de crescimento, órgãos fornecedores do explante, idade e época do ano em que é colhido o material vegetal.

Na literatura existem poucos relatos de trabalhos sobre a indução de calos e de estudos sobre a curva de crescimento celular de *Uncaria guianensis* e *Uncaria tomentosa*.

Este trabalho objetivou avaliar a influência de diferentes concentrações de auxinas na indução e manutenção de calos por meio de segmentos foliares de

plantas cultivadas na condição *in vitro* e *in vivo* e estabelecer a curva de crescimento de calos de unha de gato.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos, e Plantas Medicinais do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

Foram realizados cinco experimentos relativos à indução e estabelecimento da curva de crescimento de calos das espécies *Uncaria guianensis* e *Uncaria tomentosa*.

Os dados obtidos foram submetidos à interpretação estatística por meio da análise de variância; e as comparações múltiplas de médias realizadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

2.1 Efeito de diferentes concentrações de auxinas na indução de calos em *Uncaria guianensis* e *Uncaria tomentosa*

Foram utilizados segmentos foliares (1cm²) retirados de mudas obtidas da germinação *in vivo* de sementes de *Uncaria guianensis* coletadas em Boca do Acre-AM e *Uncaria tomentosa* provenientes de Feijó-AC, em agosto de 2001. Estas sementes foram colocadas para germinar em bandejas de polietileno expandido (isopor) de 128 células, contendo substrato Plantmax®, em casa de vegetação do Horto de Plantas Medicinais do Departamento de Agricultura da UFLA.

Quatro meses após a semeadura, as mudas foram transferidas para sacos plásticos com 20 cm de diâmetro e 30 cm de altura contendo substrato Plantmax®. Antes da retirada dos segmentos foliares, as plantas matrizes foram pulverizadas com solução de benomil a 2g.L⁻¹. Posteriormente, essas folhas

foram lavadas com 40% de água sanitária comercial, durante 15 minutos e em seguida lavadas com água destilada.

Os explantes foliares foram inoculados em frascos contendo 10 mL do meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), com 100% dos sais, inositol, vitaminas, 6 g.L⁻¹ de ágar e 30 g.L⁻¹ de sacarose. Os tratamentos consistiram na combinação de quatro auxinas (2,4-D, Picloram, AIB e ANA) em três concentrações (0,0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg. L⁻¹). Após a inoculação, os frascos transferidos para sala de crescimento com temperatura de 25°C ± 1, intensidade luminosa de 15 µmol.m².s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4x3 (quatro auxinas e três concentrações) com cinco repetições, de quatro frascos de vidro cada um contendo quatro segmentos foliares. Após 50 dias, avaliou-se a presença de calos, a coloração, a fitomassa fresca e seca dos calos.

2.2 Efeito de diferentes concentrações de Picloram na indução de calos em explantes foliares de *Uncaria guianensis*

Segmentos foliares de 1cm² retirados de plântulas de *Uncaria guianensis* mantidas *in vitro* foram excisados e inoculados em frascos contendo 10 mL de meio básico MS com 0,6% de ágar suplementado com 0,0; 0,5; 1,0; 2,0mg L⁻¹ de Picloram. Antes da autoclavagem, o pH dos meios foi ajustado em 5,7 ± 0,1. Após inoculados, os explantes foram transplantados para sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas sob 15 µmol.m².s⁻¹ de intensidade luminosa .

Após 50 dias de cultivo, foram avaliados: área dos explantes com calos (atribuição de notas 1, 2, 3, 4 correspondendo a 25, 50, 75 e 100% da área

coberta com calos), fitomassa fresca e seca e aspecto dos calos (coloração e consistência).

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com quatro tratamentos e cinco repetições de quatro frascos cada um contendo quatro explantes.

2.3 Estabelecimento da curva de crescimento de calos de *Uncaria guianensis* cultivados em meio suplementado com diferentes auxinas

Foram utilizados calos derivados de explantes de *Uncaria guianensis* oriundos de plântulas obtidas da germinação *in vitro* de sementes de unha de gato desenvolvidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas sob $15 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa .

Após quatro sub-cultivos a intervalos de quatro semanas, os calos foram seccionados em fragmentos de aproximadamente 1cm^2 e inoculados em frascos de vidros contendo meio MS completo com 0,6% de ágar e 3% de sacarose, , suplementado com auxinas Picloram ($1,5 \text{ mg.L}^{-1}$), ANA ($1,15 \text{ mg.L}^{-1}$), AIB ($1,26 \text{ mg.L}^{-1}$), e 2,4-D ($1,37 \text{ mg.L}^{-1}$), incubados nas mesmas condições da etapa de indução.

Para a determinação da curva de crescimento, nove frascos de vidro selecionados aleatoriamente foram pesados a intervalos de cinco dias, durante 40 dias, com as pesagens iniciadas a partir do primeiro dia da inoculação (tempo 0).

O experimento constituído de um fatorial 4x8, com quatro auxinas e oito avaliações. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso, com três repetições de três frascos.

As variáveis observadas foram: peso de matéria fresca e peso de matéria seca de calos, este último após a secagem em estufa de circulação forçada de ar a 45°C até peso constante.

O percentual de crescimento dos calos foi determinado segundo metodologia proposta por Lameira (1997):

- $\% \text{ CC} = [(PF - PI) / PF] \times 100$ onde
- $\% \text{ CC}$ = percentual de crescimento de calos
- PF = peso de fitomassa fresca final
- PI = peso de fitomassa fresca inicial

2.4 Influência da origem do explante e concentração de Picloram na indução de calos em *Uncaria tomentosa*

Sementes de *Uncaria tomentosa* provenientes de Feijó Acre foram colocadas para germinar em bandejas de polietileno expandido (isopor) contendo substrato Plantmax[®], em casa-de-vegetação. Outro grupo de sementes foi desinfestado com água sanitária comercial 40% durante 15 minutos, em seguida lavadas com água destilada autoclavadas por três vezes. Após a assepsia, foram inoculadas em tubos de ensaios com dimensões de 25 x 150 mm, contendo meio MS completo.

Após 45 dias, folhas das plantas mantidas em casa-de-vegetação e *in vitro*, foram excisadas (1cm²), inoculadas em meio MS contendo 30 g.L⁻¹ de sacarose, 6 g.L⁻¹ de ágar e suplementado com 0,0; 0,5; 1,0; 2,0 mg L⁻¹ de Picloram e mantidas em sala de crescimento à temperatura de 25 °C ± 1 na presença de 15 µmol.m⁻².s⁻¹. As plantas mantidas em casa-de-vegetação, foram desinfestadas, pulverizadas com benlate (2 g.L⁻¹) 48 horas antes da coleta.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com cinco repetições, em esquema fatorial 2 x 4, com duas fontes de explantes e quatro concentrações de Picloram. Na avaliação realizada aos 45 dias observaram-se as características: percentagem de área coberta por calos, fitomassa fresca, coloração dos calos e presença de raiz.

2.5 Estabelecimento da curva de crescimento de calos de *Uncaria tomentosa*

O experimento foi conduzido com calos obtidos a partir de explantes foliares, cultivados em meio MS solidificado com 0,6% de ágar e suplementado com 1,5 mg.L⁻¹ de Picloram. Os calos foram subcultivados três vezes a intervalos de 30 dias no mesmo meio de cultura e mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas luz de 15 µmol.m.s⁻¹ de irradiância e temperatura de 25° C±1.

Posteriormente, estes calos foram transferidos para o mesmo meio de cultura suplementado com as seguintes concentrações de auxinas: 1,5mg. L⁻¹ de Picloram; 1,15 mg L⁻¹ de ANA; 1,26 mg L⁻¹ de AIB e 1,37 mg L⁻¹ de 2,4-D e cultivados nas mesmas condições onde foram subcultivados. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso, em esquema fatorial 4x 8 (quatro auxinas e oito épocas de cultivo) e três repetições de 3 frascos cada uma. Os pesos médios foram comparados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para determinação da curva de crescimento, os calos foram pesados em intervalos de cinco dias durante um período de 40 dias. Inicialmente, realizou-se a determinação do fitomassa fresca, e em seguida os calos foram colocados em estufa a 45°C durante 24 horas e logo depois estimado o peso da fitomassa seca.

O percentual de crescimento dos calos foi determinado através da metodologia de Lameira (1997).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito de diferentes concentrações de auxinas na indução de calos em *Uncaria guianensis*.

A percentagem de calogênese dos explantes foliares foi influenciada pelas diferentes auxinas e suas concentrações, sendo o Picloram e 2,4-D os mais efetivos na indução de calos (Tabela 3.1).

TABELA 3.1. Efeito de diferentes concentrações de auxinas na percentagem de indução e crescimento de calos obtidos a partir de explantes foliares de plantas cultivadas *in vivo* de *Uncaria guianensis*. UFLA, Lavras-MG, 2004.

Tratamentos	Concentração (mg. L ⁻¹)	Explantes com calos (%)	Fitomassa fresca de calos (mg)	Indução e coloração dos calos
Controle (SF*)	0,0	0,0 C	0,065 C	Sem indução
2,4-D	0,5	9,5 B	0,122 B	Indução, M. E
	1,0	55,0 A	0,182 B	Indução, M.E
	2,0	100,0 A	0,223 A	Indução, M.E
ANA	0,5	0,0 C	0,069 B	Sem indução
	1,0	0,0 C	0,086 BC	Sem indução
	2,0	0,0 C	0,094 BC	Sem indução
Picloram	0,5	40,0 A	0,266 A	Indução, V.C
	1,0	50,0 A	0,289 A	Indução, V.C.
	2,0	15,0 B	0,162 AB	Indução, V.C
AIB	0,5	7,0 C	0,057 B	Pouca indução, M.E
	1,0	7,0 C	0,064 C	Pouca indução, M.E
	2,0	8,0 C	0,062 C	Pouca indução, M.E

SF =sem adição de fitorregulador.M.E=Marrom Escuro; V.C= Verde Claro.

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Picloram em baixas concentrações (0,5 e 1,0 mg.L⁻¹) induziu calos friáveis de coloração verde claro, e com maiores acúmulos de fitomassa fresca (0,266 mg e 0,289 mg). Hagen et al., (1990) ao conduzirem experimentos com batata, verificaram que o Picloram é uma potente auxina para a indução e crescimento de calos.

O crescimento dos calos, quando submetido à adição de 2,4 D, foi ascendente, ou seja, quando se utilizou a concentração 0,5 mg.L⁻¹ apenas 9,5% de explantes foram induzidos e conforme se elevou a concentração, melhores resultados foram alcançados, chegando a 100% de indução na concentração de 2,0 mg. L⁻¹. Esta auxina proporcionou calos com aspecto compacto, coloração marrom escuro. Os maiores pesos de fitomassa fresca foram obtidos quando se utilizou a concentração de 2,0 mg. L⁻¹.

Resultados semelhantes foram obtidos por Barbosa et al., (2001); Azevedo (2003) e Santos (2001) trabalhando com segmentos foliares de *Copaifera langsdorffii* Desf. e *Coffea arabica* L respectivamente, em que houve formação de calos em todas as concentrações testadas com 2,4-D.

Os menores percentuais de indução de calos foram obtidos quando se adicionou AIB com máximo de 8% na concentração de 2mg.L⁻¹. A adição de ANA não proporcionou a formação de calos em segmentos foliares de unha de gato. Becker (1997), trabalhando com *Phyllanthus niruri* L, obteve melhores resultados da indução de calos nas concentrações de crescimento de ANA (0,5 mg.L⁻¹); AIB (1,0 e 0,5 mg. L⁻¹) foram os mais efetivos na indução de calos.

Não foi observada indução de calos sem a adição de auxina ao meio de cultivo. Os menores incrementos de fitomassa fresca também foram obtidos na presença de AIB e sem adição de regulador de crescimento.

3.2 Efeito de diferentes concentrações de auxinas na indução de calos em *Uncaria tomentosa*

Os resultados da percentagem de indução e fitomassa fresca dos calos induzidos em explantes foliares de plantas *in vivo* de *Uncaria tomentosa*, após 50 dias, encontram-se na Tabela 3.2.

TABELA 3.2. Efeito de diferentes concentrações de auxinas na percentagem de indução e crescimento de calos obtidos a partir de explantes foliares de plantas cultivadas *in vivo* de *Uncaria tomentosa*. UFLA, Lavras-MG, 2004.

Tratamentos	Concentração (mg. L ⁻¹)	Explantes com calos (%)	Fitomassa fresca de calos (mg)	Indução e coloração dos calos
Controle (SF*)	0,0	0,0 C	0,0 D	Sem indução
2,4-D	0,5	0,0 B	0,1 D	Sem Indução
	1,0	0,0 B	0,2 D	Sem Indução
	2,0	0,0 B	0,5 C	Sem Indução
	0,5	0,0 B	0,3 D	Sem indução
ANA	1,0	0,0 B	0,4 D	Sem indução
	2,0	0,0 B	0,4 D	Sem indução
	0,5	100,0 A	2,0 A	Indução
Picloram	1,0	100,0 A	1,6 B	Indução
	2,0	100,0 A	1,4 B	Indução
	0,5	0,0 B	0,5 C	Sem indução
AIB	1,0	0,0 B	0,6 C	Sem indução
	2,0	0,0 B	0,8 C	Sem indução

SF =sem adição de fitorregulador .M.E=Marrom Escuro; V.C= Verde Claro.

Médias seguidas pela mesma letra maiuscula não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A indução dos calos ocorreu apenas no meio de cultura suplementado com Picloram nas diferentes concentrações testadas (100% de indução). A menor concentração (0,5 mg. L⁻¹) foi a mais eficiente proporcionando maior fitomassa fresca (2,0 mg).

Stella & Braga (2002), relatam alta frequência de formação de calos de segmentos foliares de *Rudgea jasminoides* na concentração de 0,5mg.L⁻¹, quando se aumentou a concentração de Picloram para 4,0 mg.L⁻¹, os calos formados mostraram coloração mais branca.

Os resultados encontrados na indução de calos das espécies *Uncaria guianensis* e *Uncaria tomentosa*, reforçam as conclusões de Fitch & Moore (1990). Eles afirmam ser o Picloram uma auxina que proporciona a manutenção da totipotência de linhas de calos em diferentes espécies de plantas.

3.3 Efeito de diferentes concentrações de Picloram na indução de calos em explantes foliares *in vitro* de *Uncaria guianensis*

As concentrações 0,5; 1,0 e 2,0 mg.L⁻¹ de Picloram foram eficientes na formação de calos friáveis e de coloração verde, após 50 dias de cultivo contínuo.

O melhor desempenho de fitomassa fresca ocorreu quando utilizadas concentrações de 0,5 e 2,0 mg.L⁻¹, com (1,78 e 1,74 mg). Não houve diferença significativa com relação às áreas cobertas nos calos de *Uncaria guianensis* quando diferentes concentrações de Picloram foram utilizadas, sendo a média de cobertura observada de 75%. Todos os calos mostraram aspecto friável e coloração verde claro (Tabela 3.3).

TABELA 3.3. Percentual de área coberta com calos, fitomassa fresca (BF) e seca (BS) de calos em segmentos foliares de *U. guianensis* em meio de cultivo MS suplementado com diferentes concentrações de Picloram. UFLA, Lavras-MG, 2004.

Picloram (mg. L ⁻¹)	% Área coberta com calos	BF (mg)	BS (mg)	Aspecto e coloração dos calos
0,0	0,00 B	0,14 C	0,07 C	-
0,5	75,00 A	1,78 A	0,45 A	Friável/verde
1,0	76,25 A	1,58 B	0,28 B	Friável/verde
2,0	86,25 A	1,74 AB	0,32 B	Friável/verde

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Na ausência de Picloram não houve indução de calos, possivelmente devido à inibição de crescimento e observou-se escurecimento e secamento dos explantes.

A elevada percentagem de indução de calos com coloração clara e aspecto friável foi observada por Stella & Braga (2002) em *Rudgea jasminoides* (Cham.) Mull. Arg. (Rubiaceae), em meio contendo 4,0 mg.L⁻¹ de Picloram. Os mesmos resultados observaram Fitch & Moore (1990) em calos de cana de açúcar.

Na Figura 3.1 é apresentado o aspecto geral dos calos formados em segmentos de unha de gato inoculados em meio MS, na presença de diferentes concentrações de Picloram.

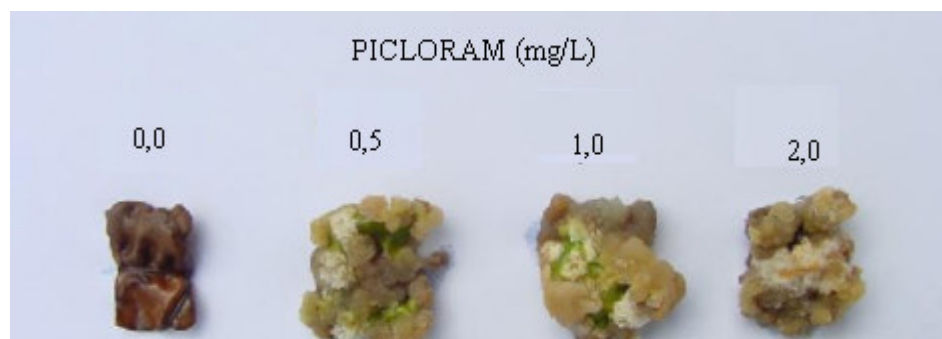


FIGURA 3.1. Aspecto de calos de *Uncaria guianensis* induzidos a partir de segmentos foliares *in vitro* em meio MS suplementado com diferentes concentrações de Picloram. UFLA, Lavras-MG, 2004.

Estes resultados comprovam que para indução de calogênese há necessidade de um fator físico (ferimento) e um químico (regulador de crescimento): raramente os fitohormônios (endógenos) no explante são suficientes para induzir a formação de calos.

3.4 Estabelecimento da curva de crescimento de calos de *Uncaria guianensis* cultivados em meios suplementados com diferentes auxinas

Na Figura 3.2 são apresentadas as curvas de crescimento de calos, determinadas a partir de segmentos foliares de plântulas germinadas *in vitro* cultivadas em meios suplementados com diferentes auxinas.

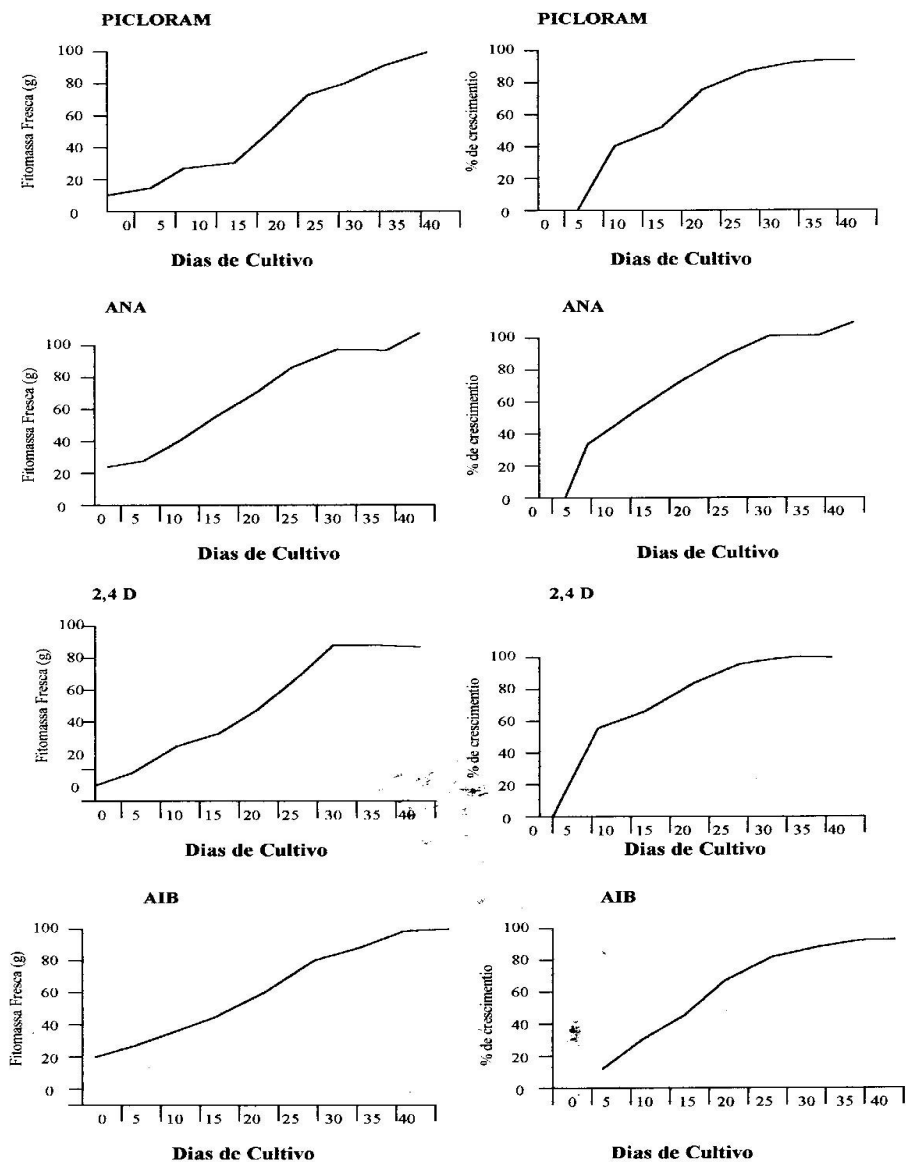


FIGURA 3.2. Curva de crescimento de calos de *U. guianensis* a partir da fitomassa fresca cultivados em meio de cultivo com diferentes auxinas. UFLA, Lavras - MG, 2004.

A curva de crescimento de calos de unha de gato utilizando-se as quatro auxinas apresentou uma sigmóide. Este tipo de curva de crescimento sigmóide já fora observado em espécies lenhosas como erva-baleeira (Lameira, 1997), castanha-do-brasil (Serra et al., 2000), cafeeiro (Santos, 2001) e chá de bugre (Bonilla, 2002).

O período de máxima divisão celular ocorreu entre o oitavo e vigésimo quinto dia com 80%, 74% e 71% de crescimento para Picloram, 2,4 D e AIB, quando se verificou o início de estabilização do acúmulo de fitomassa. O meio de cultura suplementado com ANA iniciou a estabilização após 35 dias de cultivo, com 77% de crescimento. Meio de cultura suplementado com Picloram apresentou apenas tendências de aumento do acúmulo de fitomassa após os 25 dias de cultivo. A presença de 2,4-D proporcionou maior acúmulo de fitomassa aos 30 dias de cultivo, com 78% de crescimento, a partir do qual houve redução; já com o meio suplementado com AIB, maiores acúmulos foram observados aos 30 e 35 dias de cultivo (77% de crescimento).

O número de dias necessários para a obtenção da curva de crescimento de calos varia conforme a espécie e o tipo de regulador de crescimento. Observou-se que a curva de crescimento de calos formados a partir de explantes foliares é rápida e tem o tipo de crescimento sigmóide semelhante ao de *Cordia verbenácea* L. (30 dias) Lameira (1997); *Bertholletia excelsa* (90 dias), Serra et al.,(2000); *Coffea arabica* e *Coffea canephora* (84 dias), (Santos, 2001) e chá de bugre (53 dias), (Bonilla, 2002).

Os calos apresentaram coloração distinta conforme a auxina utilizada: calos mais claros em meios suplementados com as auxinas 2,4-D e Picloram, e os mais escuros suplementados com AIB e ANA (Figura 3.3).

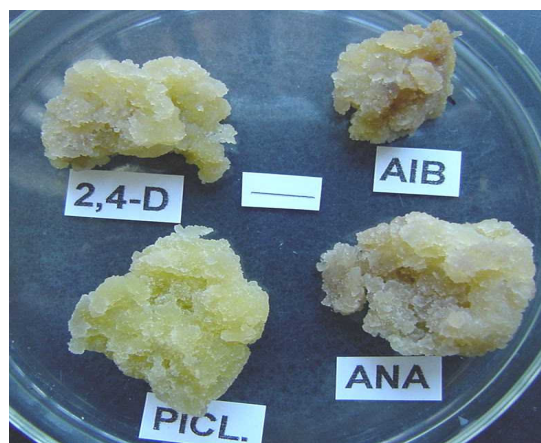


FIGURA 3.3. Calos de *Uncaria guianensis*, cultivados em meio MS, suplementados com diferentes concentrações de auxinas. UFLA, Lavras-MG, 2004. (—) = 1 cm.

3.5 Influência da origem do explante e concentração de Picloram na indução de calos em *Uncaria tomentosa*

A adição de Picloram ao meio de cultura é necessária para que ocorra a maximização da proliferação de calos em explantes originados de folhas crescidas em casa-de-vegetação ou cultura de tecidos. Maior indução de calos (90%) foi obtida quando se utilizou a concentração de $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ (Tabela 3.4).

O explante foliar proveniente de plantas cultivadas *in vivo* apresentou maiores acúmulos de fitomassa entre as concentrações de 0,5 a $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$. Quando se utilizou explante proveniente de cultura de tecido, houve uma maior resposta de 0,5 até $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$. Tao et al.,(2002) conseguiram indução de calos em explantes foliares de *Citrus grandis* (pummelo) em baixas concentrações de Picloram.

TABELA 3.4. Percentagem de área coberta de calos, fitomassa fresca e coloração, em explantes foliares de *Uncaria tomentosa*, cultivados em meio MS, suplementado com diferentes concentrações de Picloram.UFLA, Lavras-MG, 2004.

Origem do explante	Concentração mg.L ⁻¹	Área coberta de calos (%)	Fitomassa fresca (g)	Coloração
Explantes foliares <i>in vivo</i>	0,0	0,0	0,1697 Ca	Escuro
	0,5	80	1,4896 Ab	CC e/ou VC
	1,0	95	1,3646 Ab	CC ou C
	2,0	90	1,1487 Bb	CC ou C
Explantes foliares <i>in vitro</i>	0,0	0,0	0,1032 Ba	CC e/ou VC
	0,5	70	1,4584 Ab	CC e/ou VC
	1,0	60	1,3452 Ab	CC e/ou VC
	2,0	85	1,3243 Ab	CC e/ou VC

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre concentrações de Picloram e minúscula entre explantes, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. CC cinza claro; C: cinza; VC: verde claro.

As duas concentrações de Picloram mais eficientes (0,5 e 1,0 mg) em explantes originários de plantas germinadas *in vivo*, apresentaram superioridade em acúmulos de fitomassa quando comparadas com explantes excisados de plântulas germinadas *in vitro*. No entanto, Abreu (1998), trabalhando com indução de calos em diferentes fontes de explantes (*in vitro* e *in vivo*) de *Cissus sicyoides*, verificou maior acúmulo de fitomassa em calos induzidos a partir de explantes obtidos *in vitro*.

O fato de explantes retirados de plantas crescidas *in vivo* apresentar maior sensibilidade a elevadas concentrações de Picloram, provavelmente se deve a um maior conteúdo endógeno de auxinas, com melhores respostas ao se utilizar pequenas concentrações deste fitorregulador (Tabela 3.4).

Quanto à coloração, verificou-se, em ausência de Picloram, 100% de explantes escurecidos. Na concentração de 0,5 mg L⁻¹ os explantes se apresentaram entre cinza-claro e verde-claro, independentes do tipo de explante. A partir desta concentração, observaram-se diferenças entre os tipos de explantes à medida que se aumentou a concentração de Picloram no meio de cultura; explantes provenientes de plantas crescidas em casa-de-vegetação mantiveram sua coloração entre cinza-claro e verde-claro; já em explantes excisados de plantas crescidas *in vitro*, ocorreu o clareamento deles à medida que se aumentou a concentração de Picloram, variando de cinza-claro a cinza.

A formação de raízes ocorreu apenas em explantes retirados de plantas crescidas *in vivo*, quando cultivados em meio sem a suplementação com Picloram. Estes resultados reforçam a hipótese de maior teor endógeno de auxinas em explantes excisados de plantas mantidas em casa-de-vegetação (Figura 3.4).

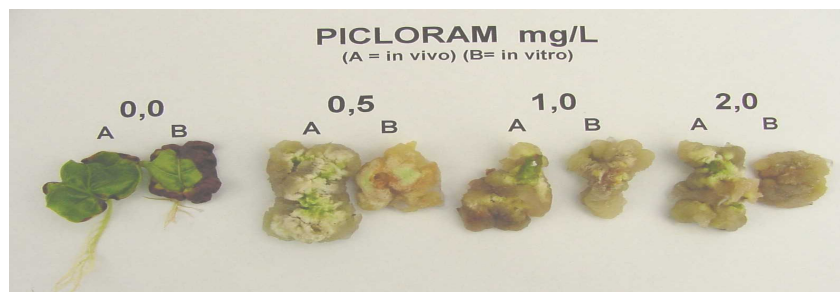


FIGURA 3.4. Calogênese em explantes foliares de *Uncaria tomentosa* excisados de plantas germinadas *in vivo* (A) e de plântulas germinadas *in vitro* (B), inoculados em meio MS suplementados com diferentes concentrações de Picloram. UFLA, Lavras - MG, 2004.

3.6 Estabelecimento da curva de crescimento de Calos de *Uncaria tomentosa*

O padrão de crescimento de calos formados a partir de segmentos foliares de unha de gato é apresentado na Figura 3.5.

Observou-se a presença de um crescimento sigmoidal com tendência de ganho de fitomassa fresca em função do aumento do tempo de cultivo.

A fase de crescimento exponencial, quando acontece à máxima divisão celular, para a espécie *Uncaria tomentosa* ocorreu entre o quinto e o vigésimo dia após a inoculação. Santos (2001), verificou que para calos obtidos a partir de segmentos foliares de *Coffea canephora* “Apoatã”, a fase Lag ocorre até o 28º dia. Landa (1999), ao avaliar o crescimento de calos de pequizeiro, a fase Lag ocorreu até o sétimo dia após a inoculação. Bonilla (2002) observou a ocorrência dessa fase entre o 9º e o 32º dia. Santos (1998), verificou ocorrências da mesma fase entre 16º e 35º dias de inoculação, em calos obtidos a partir de segmentos foliares de *Annona glabra*.

O período de crescimento linear em que os calos diminuem a divisão e aumentam a área celular, foi observado para a unha de gato entre o 20º e 25º dia de inoculação. Santos (1998), ao estudar a curva de crescimento de japecanga (*Smilax japecanga*), indicou que a fase dessa espécie ocorreu entre 18º e 26º dias após a inoculação.

O intervalo de desaceleração do crescimento se efetuou entre 25º a 35º dia de inoculação. Smith (1992), afirmou que as culturas neste período devem ser transferidas para um novo meio de cultura, devido a redução de nutrientes, secagem do ágar e acúmulo de substâncias tóxicas.

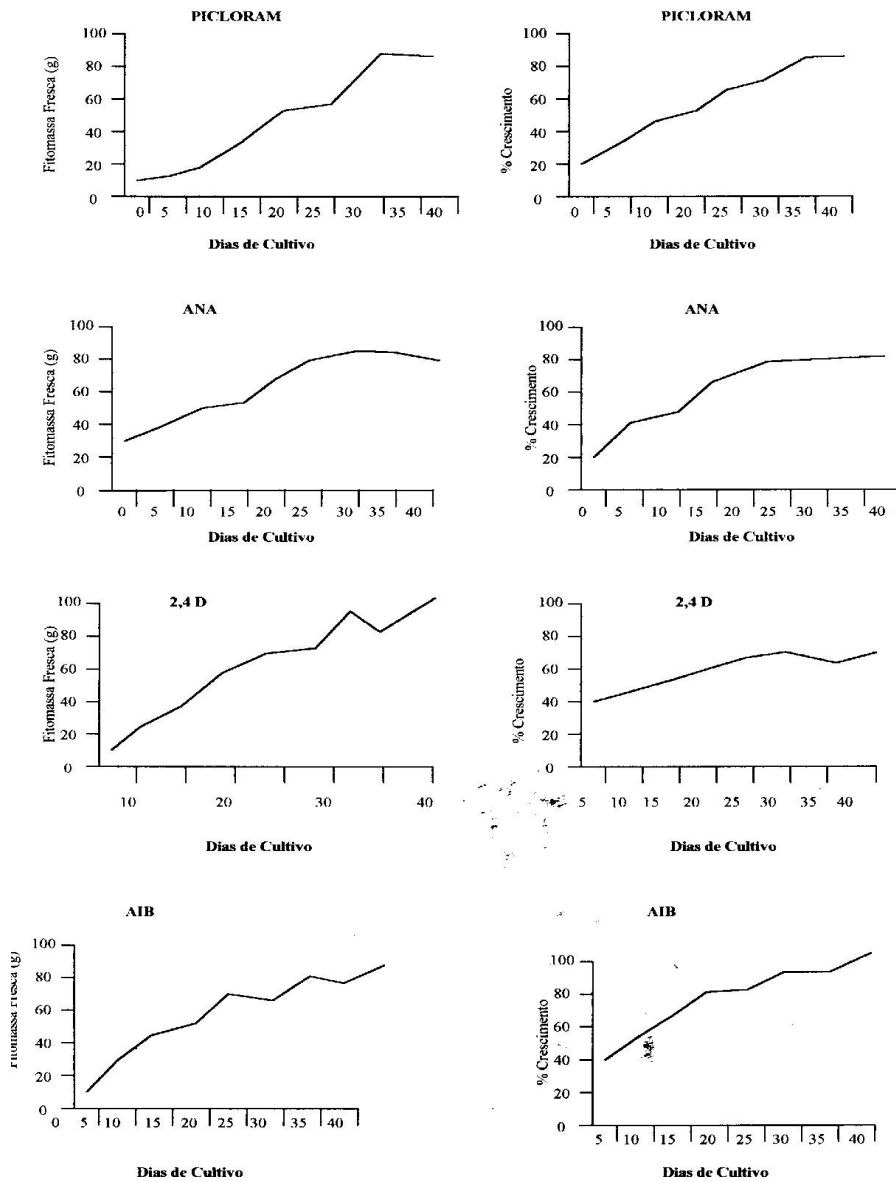


FIGURA 3.5. Curva de crescimento de calos de *Uncaria tomentosa* a partir de fitomassa fresca, cultivados em meios suplementados com diferentes de auxinas UFLA, Lavras-MG, 2004.

Dessa forma, a repicagem de calos provenientes de folhas de unha de gato para um novo meio de cultura deve ser feita no início da desaceleração, ou seja, aos 25 a 30 dias de cultivo. Lameira (1997), verificou a ocorrência da fase entre o 24° e 28° dia de cultivo de erva baleeira.

A fase estacionária ocorreu entre 35 a 40 dias de inoculação. Em segmentos foliares de lechieira, os calos se formam no período de desaceleração entre 63 e 77 dias (Mesquita, 1999).

As diferentes auxinas utilizadas influenciaram o acúmulo desigual de fitomassa ao longo dos 40 dias avaliados; 2,4-D e AIB apresentaram padrão de crescimento similar estatisticamente superior ao longo do período avaliado, exceto aos 5° e 35° dias de cultivo, quando não ocorreram diferenças entre as várias auxinas.

Constatou-se na presença de 2,4-D e AIB antecipação da estabilização do crescimento dos calos por volta de 20 dias de cultivo. Na presença de Picloram e ANA, esta estabilização ocorreu por volta dos 35 dias (Figura 3.6).

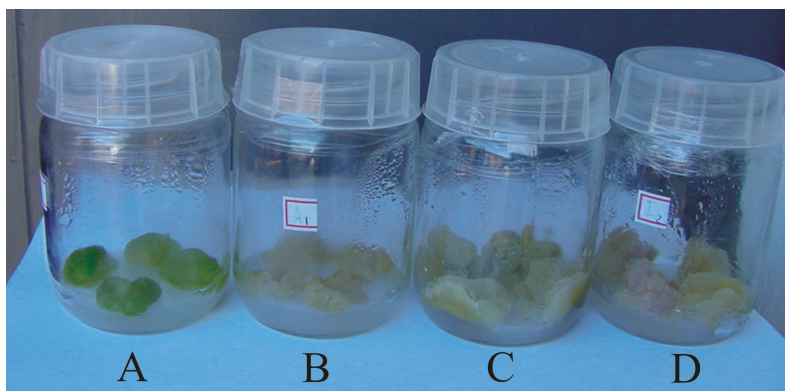


FIGURA 3.6. Aspecto dos calos de *Uncaria tomentosa* induzidos em diferentes auxinas A= Picloram; B= ANA; C= 2,4-D; D= AIB; UFLA, Lavras-MG, 2004.

O padrão de crescimento neste trabalho coincide com os observados por Lameira (1977) em *Cordia verbenacea* ; Bertolucci (2000) em *Tournefortia cf paniculata*. Eles verificaram uma precocidade da fase estacionária aos 27° e 37° dia após a inoculação respectivamente.

4 CONCLUSÕES

Calogênese de *Uncaria guianensis* e *Uncaria tomentosa* dependem do tipo e concentração de auxina.

Os explantes foliares necessitam de aplicação exógena de Picloram, sendo que a calogênese foi maximizada nas concentrações entre 0,5 mg L⁻¹ e 1,0 mg. L⁻¹. independente da origem do explante. Os calos suplementados com Picloram apresentam-se friáveis e de coloração verde.

Para *Uncaria guianensis* a auxina 2,4-D proporcionou elevados percentuais de formação de calos na concentração de 2,0 mg L⁻¹.

Nas duas espécies a curva de crescimento dos calos seguiu um padrão do tipo sigmóide no período de 40 dias.

O melhor tempo de repicagem dos calos para manutenção do estoque ocorre entre 25 e 30 dias de cultivo para as duas espécies

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, I. N. **Propagação in vitro e in vitro calogênese, nutrição mineral e quantificação de mucilagem em *Cissus sicyoides***. 1998. 101 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

AITCHISON, P. A.; MACLEOD, A. ; YEOMAN, M. N. Growth patterns in tissue (callus) culture, In: STREET, H. E.(Ed.). Plant tissue and cell culture. 2. ed. California: Blackwell Scientific, 1977. p. 267-306.

AZEVEDO, K. de S. **Indução e análises bioquímicas de calos e aspecto da anatomia foliar de *Copaifera langsdorffii* Desf.**. 2003. 83 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

BAJAJ, Y. P. S.; URMANOWA, M.; OLSZOWSKA, E. O. Biotechnology of the micropropagation of medicinal and aromatic plants. In: In: BAJAJ, Y. P. S. **Biotechnology in agriculture and forestry**. Berlin: SpringerVeriag, 1988. v. 4, p. 60-103.

BARBOSA, W. C. Calogênese em epicótilos de plântulas produzidas *in vitro* de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 8., 2001, Ilhéus. **Resumos expandidos...** Ilhéus: [s. n.], 2001. 1Cd-Room.

BECKER, L. **Propagação vegetativa in vivo de *Phylanthus corcovadensis* Muell. Arg. e in vitro, indução de calos, nutrição, extração e quantificação de alcaloides na espécie *Phylanthus niruri* L.(quebra-pedras)**. 1997. 96 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

BERTOLUCCI, S. K. V. **Micropropagação, calogênese e abordagem fitoquímica in vivo e in vitro de *Tournefortia cf paniculata* Cham**. 2000. 79 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

BONILLA, M. G. O. **Propagação *in vitro*, indução, curva de crescimento de calos e abordagem fitoquímica em *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth.** 2002. 162 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

BOTTA, B.; DALL' OLIO, G.; FERRARI, F.; MONACELLI, B.; PASQUA, G.; SCURRIA, R.; DELLE MONACHE, G. J. Cell – suspension cultures of *Cassia* – *Didymobotrya* optimization of growth and secondary metabolite production by application of orthogonal design method. **Journal of Plant Physiology**, v. 135, n. 3, p. 290-294, Oct. 1989.

DEVLIN, R. M.; WITHAM, F. H. Cytokinins, ethylene and abscisic acid. In: _____. **Plant Physiology**. Belmont: Wadsworth Publishing Company, 1983. 577 p.

FITCH, M. M. M.; MOORE, P. H. Comparasion of 2,4-D and picloram for selection of long-term totipotent green callus cultures or sugarcane. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 1990. v. 20, p. 157-163.

GEORGE, E. F. The components of culture media. In: _____. **Plant propagation by tissue culture**. 2. ed. Great Britain: Exegetics, 1993. Cap. 9, p. 273-343.

HAGEN, S. R.; TOURNEAU, D. L.; MUNETA, P.; BROWN, J. Initiation and culture of potato tuber callus tissue with Picloram. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 9, n. 4, p.341-345, Nov. 1990.

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.).** 1997. 88 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

LANDA, F. S. L. **Indução *in vitro* de calos em explantes foliares de pequiheiro (*Caryocar brasiliense* Camb.).** 1999. 73 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

MESQUITA, A C. **Estabelecimento *in vitro* de lechieira (*Litchi chinensis* Sonn.) através de cultivo de segmentos foliares e nodais e análise bioquímica de calos.** 1999. 67 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) Universidade Federal de Lavras, Lavras.

MIRANDA, E. M.; SOUSA, J. A. de. **Unha de gato: um recurso com potencial de exploração no Acre.** 2002. Disponível em: <<http://www.cpaaf.embrapa.br>>. Acesso em: 19 jul. 2004.

MIRANDA, E. M.; SOUSA, J. A.; PEREIRA, R. de C. A. **Subsídios técnicos para o manejo sustentável da unha de gato (*Uncaria spp.*) no vale do Rio Juruá, AC.** Rio Branco: EMBRAPA-CPAF/AC, 2001. 21 p. (EMBRAPA-CPAF/AC. Documentos, 68).

MURASHIGE, T. Plant regeneration through tissue cultures. **Annual Review Plant Physiology**, Palo Alto, v. 25, p. 135-166, 1974.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-493, 1962.

PEREIRA, A. M. S. Biotecnologia de plantas medicinais. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 18, p. 46, jul. 2000. Suplemento.

RAI, P. P. *Lloydia*. [S. l.: s. n.], 1978. v. 4 1, p.170

SANTOS, M. R. A. **Germinação, calogênese e caracterização de saponinas em *Smilax japecanga* Grisebach.** 1998. 110 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SANTOS, C. G. **Micropropagação e caracterização bioquímico-anatômica em *Coffea arabica* e *Coffea canephora*.** 2001. 110 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SEABROOK, J. E. A In: **Plant Tissue as a Source of Biochemical Staba.** Boca Raton: CRC Press, 1980. p. 2.

SERRA, A. G. P.; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O. Análises bioquímicas de calos formados de explantes foliares de Castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 4, p. 833-840, out./dez. 2000.

SMITH, R. H. **Plant tissue culture: techniques and experiments**. San Diego: Academic Press, 1992. 171 p.

STELLA, A.; BRAGA, M. R. Callus and cell suspension culture of *Rudgea jasminoides*, a tropical woody Rubiaceae. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 68, n. 3, p. 271-276, 2002.

TAO, H.; SHAOLIN, P.; GAOFENG, D.; LANYING, Z.; GENGGUANG, L. Plant regeneration from leaf-derived callus in *Citrus grandis* (pummelo): Effects of auxins in callus induction medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 69, n.2, p.141-146, 2002.

WANG, C.; STABBA, E. J. J. **Pharm. Sciencie**, v. 52, p. 1058, 1963.

CAPÍTULO IV

**ANATOMIA FOLIAR COMPARADA DE *Uncaria guianensis* (AUBL.)
GMEL. E *Uncaria tomentosa* (WILLDENOW EX ROEMER &
SCHULTES) COMO SUBSÍDIO AO ESTUDO DE
MICROPROPAGAÇÃO *IN VITRO***

RESUMO

PEREIRA, Rita de Cássia Alves. Anatomia foliar comparada de *Uncaria guianensis* (Aubl.) Gmel. e *Uncaria tomentosa* (Willdenow Ex Roemerr & Schultes) como subsídio ao estudo de micropropagação *in vitro* In: ____ **Micropropagação, indução de calos, características anatômicas e monitoramento por biomarcadores de *Uncaria tomentosa* Willdenow Ex Roemer & (Schultes) DC e *Uncaria guianensis* (Aublet) Gmelin (unha de gato)**. 2004. p.104-133. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG.¹

A aclimatização de plântulas oriundas do ambiente *in vitro* é um processo fundamental à sobrevivência no ambiente *ex vitro*. A avaliação da mudança estrutural durante a aclimatização torna-se necessária à compreensão desse processo de adaptação e tem se mostrado essencial para a estruturação de protocolos eficazes à sobrevivência de plantas oriundas de ambientes controlados. Este trabalho tem como objetivo identificar as diferenças anatômicas foliares entre as plântulas cultivadas *in vitro* aclimatizadas e plantas adultas cultivadas em casa de vegetação de *Uncaria guianensis* e *Uncaria tomentosa*. Para o estudo anatômico foram utilizadas plântulas mantidas por 45 dias em condição *in vitro*, com 15, 30, 45, 60 e 90 dias de aclimatização para *Uncaria guianensis* e 30 e 60 dias para *Uncaria tomentosa* e plantas adultas cultivadas em casa-de-vegetação para ambas as espécies. As plântulas foram obtidas através de cultura de embriões em meio MS e transplantadas para vaso plástico. As folhas foram coletadas e conservadas em álcool 70% para a realização dos cortes transversais e paradérmicos. As lâminas semi-permanentes foram confeccionadas segundo microtécnicas usuais de anatomia vegetal. Os resultados indicaram que as plântulas *in vitro* possuem os tecidos foliares pouco desenvolvidos e menos diferenciados que nas condições *ex vitro* e grande número de estômatos, e o número de estômatos se reduz no decorrer da aclimatização, auxiliando o processo de adaptação das plantas às novas condições ambientais, assim como há um aumento na diferenciação e no tamanho dos tecidos do mesofilo para ambas as espécies.

¹ Comitê Orientador: Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto (Orientador)- UFLA, Dra Ligia Maria Marino Valente-UFRJ, Dr. Evaristo Mauro de Castro-UFLA.

ABSTRACT

PEREIRA, Rita de Cássia Alves. Comparative Leaf Anatomy of *Uncaria guianensis* (Aubl.) Gmel. and *Uncaria tomentosa* (Willdenow Ex Roemerr & Schultes) as subsidy to the study of micropropagation *in vitro*. In: _____ **Micropropagation, callus induction, anatomical characteristics and monitoring by biomarkers of *Uncaria tomentosa* (Willdenow Ex Roemer & Schultes) DC and *Uncaria guianensis* (Aublet) Gmelin (cat's claw)**. 2004. p.104-133. Thesis (Doctorate in Agronomy) - Federal University of Lavras, Lavras- MG.¹

The acclimatization of plantlets coming from an in-vitro environment is a fundamental process for their survival in an ex-vitro environment. The evaluation of structural change during the acclimatization becomes necessary for the understanding of this adaptation process and has been shown essential for the structuring of efficient protocols for the survival of plants coming from a controlled environment. This work has as an objective to identify the anatomic foliar differences between acclimated in vitro plantlets, and adult plants cultivated in greenhouse of *Uncaria guianensis* and *Uncaria tomentosa*. For the anatomic study *Uncaria guianensis* plantlets were maintained for 45 days *in vitro*, with 15, 30, 45, 60 and 90 days of acclimatization and for *Uncaria tomentosa* 30 and 60 days for adult plants cultivated in greenhouse for both species. The plantlets were obtained from an embryo culture in Murashige and Skoog medium (MS) (*Uncaria guianensis*) and a WPM medium suplementado de 1,0 mg.L⁻¹ of BAP, transplanted to plastic vases. The leaves were collected and conserved in 70% alcohol for the transversal and paradermic cuts. The semi-permanent slides were mounted according to usual vegetable anatomy microtechniques. The results showed that *in-vitro* plantlets have poorly developed and less differentiated foliar tissue than in *ex-vitro* conditions and large number of stomata, and the stomata number decreases during acclimatization time, supporting the adaptation process of the plants to a new environmental condition, likewise there is an increase in the differentiation and size of mesophyll tissue for both species.

¹ Guidance Committee: Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto (Advisor), UFLA, Dra Ligia Maria Marino Valente-UFRJ, Dr. Evaristo Mauro de Castro- UFLA.

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Uncaria* (Rubiaceae) é composto por cerca de 50 espécies e possui distribuição pantropical (Obregon Vilches,1997). A maioria (39 espécies) encontra-se em regiões asiáticas e africanas. *U. guianensis* Aubl. Gmel é endêmica da região neotropical e no Brasil foi reportada em alguns Estados da Amazônia ocidental (Amazonas, Acre e Rondônia) (Lorenzo & Matos, 2002).

U. guianensis e *Uncaria tomentosa*, conhecidas como unha de gato, tem sido objeto de estudo de vários autores: Aquino (1991), Cerri (1998);, Recio (1995) devido às propriedades imuno-estimulantes de alguns compostos produzidos, principalmente, em suas folhas e casca. Dentre eles, os alcalóides oxindólicos têm merecido destaque devido a seu potencial como fonte de drogas para o tratamento de doenças como AIDS e câncer, entre outras (Gontuzzo, 1993). Por outro lado, também tem sido demonstrado que os compostos glicosídicos do ácido quinóico encontrado nessas espécies possuem alto poder antiinflamatório Cerri (1988), Recio (1995). Entretanto, apesar das diversas propriedades medicinais da unha de gato, estudos farmacológicos e de propagação *in vitro* ainda são escassos (Lombardi & Zevallos ,1998).

Atualmente, o principal problema dos produtos *in vivo* oriundos de *U. tomentosa* e *U.guianensis* é a heterogeneidade de características químicas encontradas. O fato dos produtos desta espécie serem provenientes de atividade extrativista contribui significativamente para esta heterogeneidade química devido a diversidade genética intraespecífica, uma vez que a reprodução desta espécie acontece de forma sexuada. Uma solução para isso é a tecnologia de clonagem *in vitro*, a qual, apoiada por um trabalho sistemático de seleção de características desejáveis, poderá contribuir para a obtenção de plantas de boa

qualidade, de forma homogênea, em qualquer época do ano e em período de tempo menor que o dos métodos tradicionais de propagação.

A aclimatização *ex vitro* é um fator limitante para a sobrevivência de plântulas oriundas de micropropagação *in vitro*, uma vez que elas passam de um ambiente de baixa transpiração para outro que exige maior transpiração, podendo ocorrer estresse hídrico. Representa também uma passagem de um estado potencialmente heterotrófico para um autotrófico que difere na disponibilidade de sais e carbono, além da passagem de um meio asséptico para um outro sujeito ao ataque de microorganismos saprofíticos e eventualmente patogênicos (Grattapaglia & Machado, 1998).

A aclimatização também faz-se necessária devido à formação estrutural e os processos fisiológicos induzidos no ambiente *in vitro*, os quais acontecem como resposta ao alto suprimento de energia e um balanço hídrico favorável. Essa formação estrutural e funcional nas plantas *in vitro* é resultado de fatores complexos e múltiplos no meio de cultura e a principal consequência é a baixa taxa de sobrevivência das plantas quando transferidas diretamente para a condição *ex vitro* (Ziv, 1987).

Diversos estudos histológicos demonstraram que os órgãos vegetativos de plantas desenvolvidas *in vitro* apresentam tecidos e estruturas pouco diferenciados se comparados com plantas cultivadas em casa-de-vegetação (Fidelis, 1998; Santos, 2001). Além disso, o número e formato dos estômatos também são afetados, o que pode acarretar maior ou menor eficiência fotossintética da planta (Sun et al., 1995). Portanto, o entendimento e a avaliação dessas alterações estruturais constituem pré-requisitos para o desenvolvimento de protocolos eficazes quanto à sobrevivência das plântulas oriundas de micropropagação (Soares, 2003).

Neste trabalho foram realizadas análises de comparação das alterações morfoanatômicas entre folhas de plantas de *U. guianensis* e *U.tomentosa* obtidas no cultivo *in vitro*, com 15, 30, 45, 60 e 90 dias de aclimatização; de *Uncaria tomentosa* com 30 e 60 dias de aclimatização e folhas de plantas cultivadas em casa-de-vegetação de ambas as espécies.

2 MATERIAL E METODOS

O experimento de cultura de tecido foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais do Departamento de Agricultura e os cortes anatômicos foram realizados no Laboratório de Anatomia vegetal do departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, MG. Foram utilizados como explantes embriões retirados de sementes de *U. guianensis* e segmentos foliares de *Uncaria tomentosa*.

A assepsia das sementes e segmentos foliares se fez com água sanitária comercial a 40%, durante 15 minutos e, em seguida, com água destilada autoclavada para remoção do excesso da solução desinfetante. Para *U. guianensis*, o meio de cultura utilizado foi o MS completo (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose, 6 g.L⁻¹ de ágar e o pH do meio ajustado em 5,7. Para a *Uncaria tomentosa* utilizou-se o meio WPM (Lloyd & Mccown, 1980), em seguida, autoclavado por 15 minutos. Em câmara de fluxo laminar, os embriões de *U. guianensis* foram retirados e juntamente com explantes de *U. tomentosa* foram inoculados em tubos de ensaios contendo 10 mL do meio, e incubados em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, intensidade luminosa de 15 µmol.m⁻².s⁻¹, e temperatura de 25 ± 1°C.

Após 45 dias em sala de crescimento, as plântulas foram transferidas para bandejas de isopor de 72 células, contendo 50 mL de substrato plantmax[®] por célula. Decorridos 15 dias, as mudas foram transplantadas para vasos plásticos com capacidade de 1 kg de substrato. Durante 90 dias as plântulas foram aclimatadas em casa-de-vegetação com sistema de nebulização intermitente. A bancada ficou protegida na parte superior, acima da tubulação de nebulização, e nas laterais com tela de sombreamento 50% (sombrite).

As plantas adultas foram obtidas através da propagação por sementes, semeadas em bandejas de polietileno (isopor) de 128 células, contendo plantmax[®] como substrato. Após 60 dias de germinação, as mudas foram transplantadas para sacos de plástico com capacidade de 4 kg. As mudas foram mantidas em casa de vegetação do Horto de Plantas Medicinais, com 50% de sombreamento, irrigadas por microaspersão intermitente.

Para o estudo anatômico das folhas foram utilizadas plântulas de *U. guianensis* mantidas por 45 dias em sala de crescimento com 15, 30, 45, 60 e 90 dias de aclimatização; *Uncaria tomentosa* com 30 e 60 dias de aclimatização e plantas adultas (24 meses) mantidas em casa-de-vegetação.

Depois de retiradas, as folhas foram fixadas em F.A.A. 70% (formaldeído, ácido acético e álcool etílico) por 72 horas e posteriormente conservados em álcool 70% (Johansen, 1940). Os cortes transversais foram realizados com auxílio do micrótomo manual, clarificados com água sanitária 5% (Kraus & Arduim, 1997) e corados com uma mistura de azul de astra e safranina (Kraus & Arduim, 1997). Os cortes paradérmicos foram realizados manualmente, obtidos da epiderme abaxial e corados com safranina 1%. Foi utilizada glicerina 50% para a montagem das lâminas semi-permanentes. O número de estômatos por mm² foi determinado na região mediana da folha de acordo com Laboriau et al., (1961). Em cada tratamento, foram utilizados quatro campos de cinco indivíduos, para a contagem do número de estômatos e para a mensuração de células e tecidos. As determinações de espessura de células e tecidos, assim como as medições do diâmetro polar e equatorial dos estômatos, foram realizadas utilizando-se uma ocular micrometrada. Foram realizadas 20 medições de 4 plantas para cada tratamento. As fotomicrografias foram feitas com auxílio do fotomicroscópio Olympus BX-60.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado e a análise estatística realizada com auxílio do programa Sisvar (Ferreira, 1999 usando-se o teste de Skott-Knott (Scoott & Knott, 1974).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Anatomia comparada de *Uncaria guianensis* propagada *in vitro* e durante a aclimatização

As folhas de *U. guianensis*, provenientes de plantas adultas (24 meses) cultivadas em casa-de-vegetação, apresentaram organização dorsiventral e hipostomática (Figura 4.1A), tal como observado por Gattuso et al.; (2004) ao descreverem a anatomia da lamina foliar de *U. guianensis* e *U. tomentosa*.

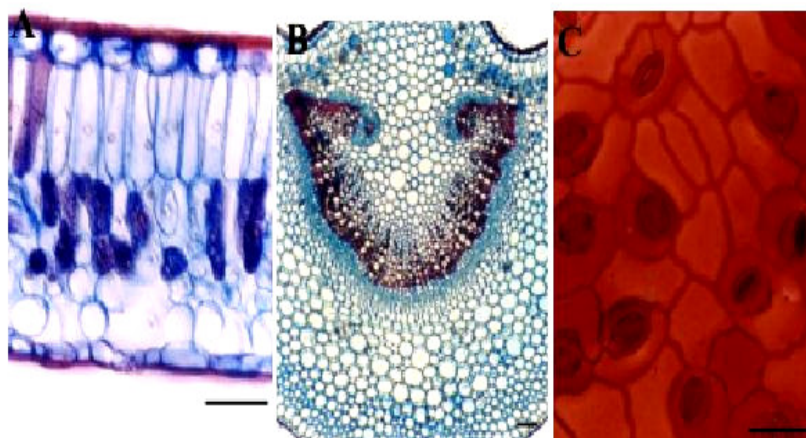


FIGURA 4.1. Folha de *Uncaria guianensis*, de plantas estabelecidas em casa-de-vegetação. A - Seção transversal evidenciando o mesofilo. B- Seção transversal evidenciando a nervura central e C- Seção paradérmica da epiderme abaxial. A barra corresponde a 100 μm nas Figuras A e C e a 50 μm na Figura B. UFLA, Lavras- MG, 2004.

Foram observados tricomas tectores, distribuídos por toda a epiderme apenas na face abaxial em plantas adultas e em ambas as faces em todos os períodos de aclimatização, podendo verificar-se um detalhe na Figura 4.2A. Discordando de Gattuso et al.; (2004) que descrevem as folhas de *U. guianensis* como glabras. Esta diferença pode ser explicada devido as condições de cultivo *in vitro* e *in vivo*.

A epiderme é uni-estratificada (Figura 4.1A), com células de forma e dimensões variáveis, e maiores dimensões na face adaxial (Figura 4.1A e Tabela 4.1).

TABELA 4.1. Espessura média (μm) de tecidos e espessura total do limbo foliar de *U. guianensis* obtidas pela propagação *in vitro*, submetidas aos diferentes períodos de aclimatização e plantas adultas cultivadas em casa-de-vegetação. UFLA, Lavras-MG, 2004

Tratamento	Epiderme Abaxial	Parênquima esponjoso	Parênquima Paliçádico	Epiderme Adaxial	Espessura limbo
In vitro	18,49 a	28,54 e	23,06 c	19,43 c	89,53 e
15 dias	29,29 a	38,00 d	27,20 c	22,57 b	108,49 d
30 dias	20,87 a	41,20 c	38,88 b	27,24 a	128,16 c
45 dias	20,97 a	44,61 c	43,23 b	27,15 a	141,28 b
60 dias	20,96 a	49,57 b	43,35 b	27,82 a	141,65 b
90 dias	21,41 a	49,97 b	43,51 b	28,60 a	143,49 b
adulta	21,83 a	97,64 a	74,20 a	28,67 a	222,33 a

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

O mesofilo é representado por uma camada de parênquima paliçádico, de células alongadas justapostas e células do parênquima esponjoso,

frouxamente arrançadas, com 4 a 5 camadas e poucos espaços intercelulares (Figura 4.1A). Gattuso et al. (2004) observaram de 1 a 2 camadas de parênquima paliçádico em *U. guianensis* e apenas uma camada em *U.tomentosa*, bem como a presença de parênquima esponjoso em ambas as espécies.

Estão presentes no mesofilo idioblastos cristalíferos e cristais poliédricos, os quais segundo Gattuso et al., (2004) são cristais de oxalato de cálcio e encontram-se mais abundantes em *U.tomentosa*.

Na nervura central da região mediana do limbo, o sistema vascular é constituído por um feixe colateral na forma de “U”, com as extremidades arqueadas para dentro. Abaixo da epiderme, no córtex, o tecido de sustentação está representado por colênquima do tipo angular nas faces adaxial e abaxial (Figura 4.1b).

Na face abaxial, as paredes anticlinais das células epidérmicas são levemente sinuosas (Figura 4.1B).

Os estômatos são do tipo paracítico e estão situados no mesmo nível das demais células epidérmicas. Observa-se uma densidade de 170 estômatos/mm² em plantas adultas (Figura 4.1C e Tabela 4.2), resultados semelhantes aos observados por Gattuso et al., (2004).

Organização dorsiventral, folhas hipostomáticas e estômatos do tipo paracítico têm sido observados em várias espécies de Rubiaceae. Dentre as espécies desta família com estas mesmas características podem destacar a *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes (Assis & Giulietti, 1999) e a *Policourea longepedunculata* Gardiner (Pereira et al., 2003). No entanto, apenas na espécie em estudo foi encontrado o feixe com as extremidades arqueadas para dentro.

TABELA 4.2. Médias do número de estômatos/mm², diâmetro polar e diâmetro equatorial dos estômatos na face abaxial em indivíduos de *U. guianensis* obtidos pela propagação *in vitro*, submetidas a períodos de aclimatização e plantas adultas cultivadas em casa-de-vegetação. UFLA, Lavras-MG, 2004.

Tratamento	Número estômatos (mm ²)	Diâmetro polar (µm)	Diâmetro equatorial (µm)
In vitro	257,52 a	27,60 a	23,52 a
15 dias	220,52 b	27,36 a	19,20 b
30 dias	216,82 b	26,64 a	18,96 b
45 dias	219,68 b	23,76 b	16,32 c
60 dias	187,22 c	23,76 b	16,56 c
90 dias	173,16 c	24,24 b	15,84 c
Adulta	170,20 c	24,72 b	15,60 c

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

Os resultados mostraram alterações significativas nas plantas propagadas *in vitro* e durante os períodos de aclimatização sobre todas as características estruturais do limbo, exceto sobre a espessura da epiderme abaxial (Tabela 4.1).

As plantas *in vitro* apresentaram o mesofilo pouco diferenciado, sendo o parênquima esponjoso e o parênquima paliçádico significativamente menos espessos que nas plantas de casa-de-vegetação e aclimatadas (Figura 4.2, Tabela 4.1). Por outro lado, em plantas com 15 dias de aclimatização, a espessura do parênquima paliçádico também não diferiu em relação às plantas *in vitro*.

Aos 30 e 45 e aos 60 e 90 dias de aclimatização as plantas diferiram estatisticamente entre si quanto à espessura dos tecidos, sendo que as maiores espessuras foram sempre observadas em plantas estabelecidas em casa-de-

vegetação, de acordo com estudos realizados por Nogueira, (2003), e Azevedo, (2003) quando utilizaram técnicas de micropropagação em *Byrsonima intermedia* e *Copaifera lang.*

A espessura total do limbo foi significativamente afetada pelas condições *in vitro* e pelos períodos de aclimatização (Tabela 4.1; Figura 4.2). A menor espessura ocorreu em plantas propagadas *in vitro*, seguido das plantas aclimatizadas (Figura 4.2A; Tabela 4.1).

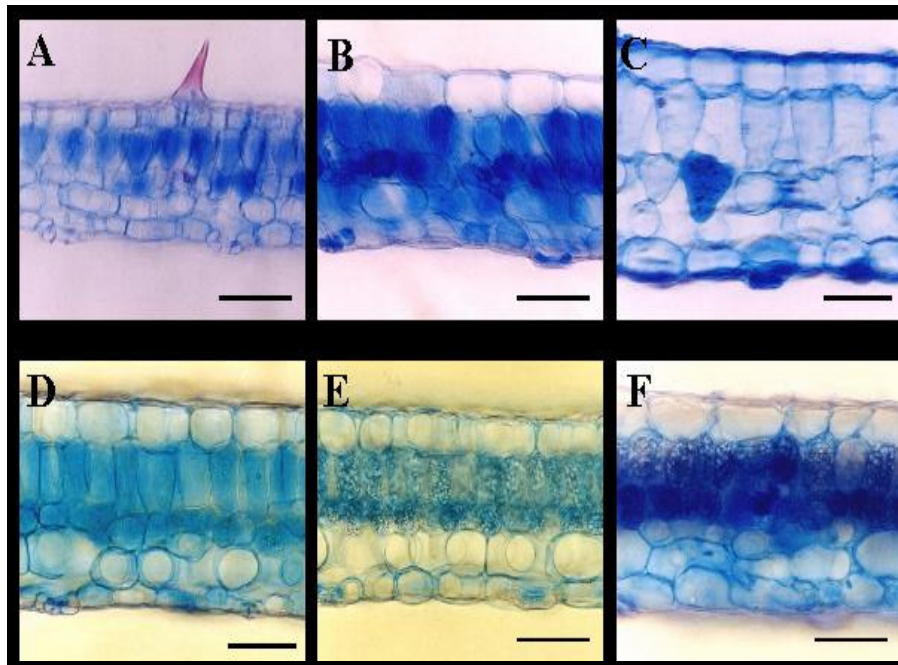


FIGURA 4.2. Seção transversal de folhas *U. guianensis*, evidenciando o mesofilo. A- plântulas *in vitro*. B- plantas com 15 dias de aclimatização. C- plantas com 30 dias de aclimatização. D- plantas com 45 dias de aclimatização. E- plantas com 60 dias de aclimatização e F- plantas com 90 dias de aclimatização. A barra corresponde a 50µm. UFLA, Lavras-MG, 2004

A anatomia foliar é um fator importante no processo de absorção de luz , especialmente na estrutura do mesofilo. É esperado, portanto, que quanto mais espesso o parênquima paliçádico maiores sejam também as taxas fotossintéticas (Bolhar-Vordenkampf & Draxler, 1993), processo fundamental ao crescimento e desenvolvimento vegetal. A maior necessidade autotrófica do ambiente *ex vitro*, induz mudanças significativas e progressivas de toda a estrutura foliar no decorrer do tempo, como forma de adaptação a este novo meio (Tabela 4.1 e Figura 4.2)

Também foram observados variação na forma, tamanho e diâmetro dos vasos Nas plantas *in vitro* e em estágios intermediários de aclimatização, o sistema vascular é constituído por um feixe colateral na forma de arco aberto até chegar próximo ao formato de U com as bordas arqueadas, mais evidente em plantas adultas em casa-de-vegetação. Adicionalmente, houve um aumento no tamanho dos vasos à medida que as plantas foram aclimatadas (Figura 4.3).

De acordo com Baas & Schweingruber (1987), Carlquist (1988) e Alves & Angyalossy-Alfonso (2000), os fatores ambientais afetam as dimensões e até mesmo o arranjo dos elementos vasculares, na tentativa de garantir aumento no transporte dos solutos quando a planta está sujeita a algum tipo de estresse (Baas, 1982).

Santos (2001) observou que em folhas de plântulas de *Coffea arabica* L. obtidas por propagação *in vitro* não ocorreu presença de esclerênquima e a nervura central apresentou células do xilema em menor número, tamanho e espessura em relação às obtidas por cultivo *in vivo*. Nogueira (2003), relatou que plantas de “murici pequeno” *B.intermedia* obtidas através de técnicas de micropropagação apresentaram o sistema vascular menos desenvolvido que as cultivadas *in vivo*.

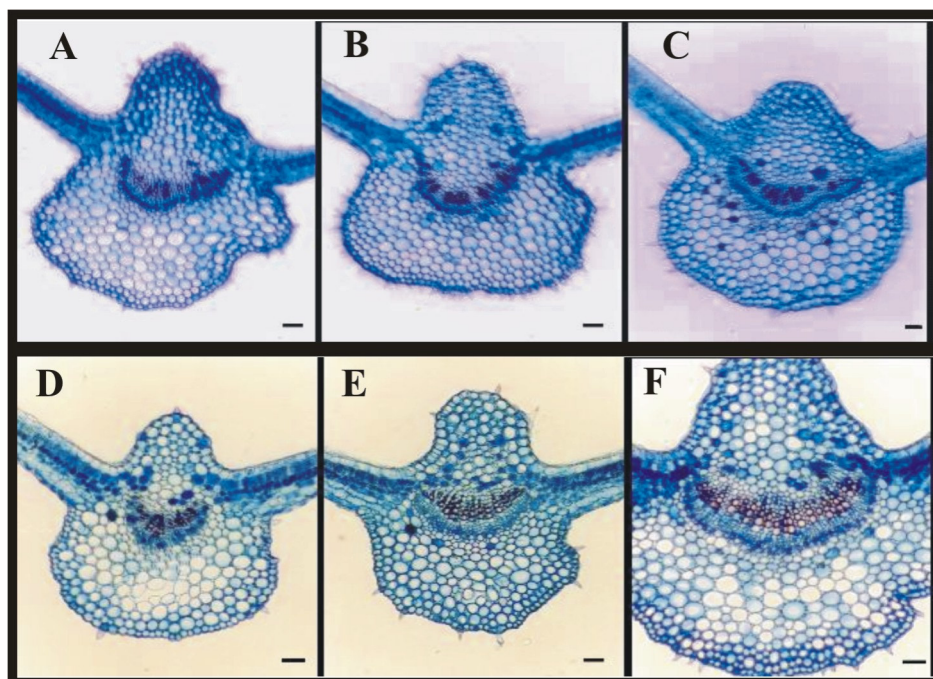


FIGURA 4.3. Seção paradérmica de folhas de *Uncaria guianensis*, evidenciando a nervura central. A- plantas *in vitro*. B- plantas com 15 dias de aclimatização. C- plantas com 30 dias de aclimatização. D- plantas com 45 dias de aclimatização. E- plantas com 60 dias de aclimatização e F- plantas com 90 dias de aclimatização. A barra corresponde a 100 μ m. UFLA, Lavras-MG, 2004.

Tanto a densidade estomática quanto as dimensões de polaridade dos estômatos variaram com a mudança do ambiente *in vitro* para o *ex vitro*. Estas características foram maiores nas condições *in vitro* (Tabela 4.2).

As plantas com 15, 30 e 45 dias de aclimatização não diferiram entre si quanto à densidade estomática. As plantas cultivadas em casa-de-vegetação apresentaram menor número de estômatos e não diferiram estatisticamente de plantas com 60 e 90 dias de aclimatização (Tabela 4.2).

Nas plantas em casa-de-vegetação (Figura 4.1A), assim como *in vitro* (Figura 4.2A), os estômatos situam-se ao mesmo nível das demais células da epiderme, o que está de acordo com Capellades *et al.* (1990), segundo os quais o período de aclimatização *ex vitro* também permite a redução na frequência de estômatos, altera o formato e a topografia destes e, de maneira geral, favorece os diversos parâmetros foliares.

O grande número de estômatos observados em plantas *in vitro* pode ter sido provocado pela menor intensidade luminosa e trocas gasosas reduzidas. Desta forma, os numerosos estômatos abertos provavelmente facilitaram as trocas e aumentaram a eficiência fotossintética durante a aclimatização dessas plantas, porém, o número de estômatos se reduz, provavelmente para evitar perda excessiva de água com a transpiração. Em estudos anteriores com plantas de “roseira” (*Rosa* sp.), Capellades *et al.*; (1990) e de “figueira” (*Ficus* sp.) Fráguas (2003), foram observados resultados similares aos encontrados neste trabalho.

O diâmetro polar dos estômatos foi menor nas plantas à medida que aumentou o período de aclimatização, fato que talvez esteja também associado à economia de água nesse ambiente, pois, provavelmente, folhas com estômatos menores apresentam maior eficiência de uso da água e a diferença no tamanho da abertura estomática revela maior efeito sobre a difusão de água do que sobre a difusão de CO₂ (Bidwell, 1974).

Observa-se na da Figura 4.4 que as células das plantas *in vitro* exibem parede sinuosas mais acentuadas que as de casa-de-vegetação. Medri & Lleras (1980) sugeriram que a menor sinuosidade da parede pode estar relacionada às características adaptativas contra a perda excessiva de água, justificando-se assim a maior sinuosidade observada na epiderme adaxial das plantas *in vitro*.

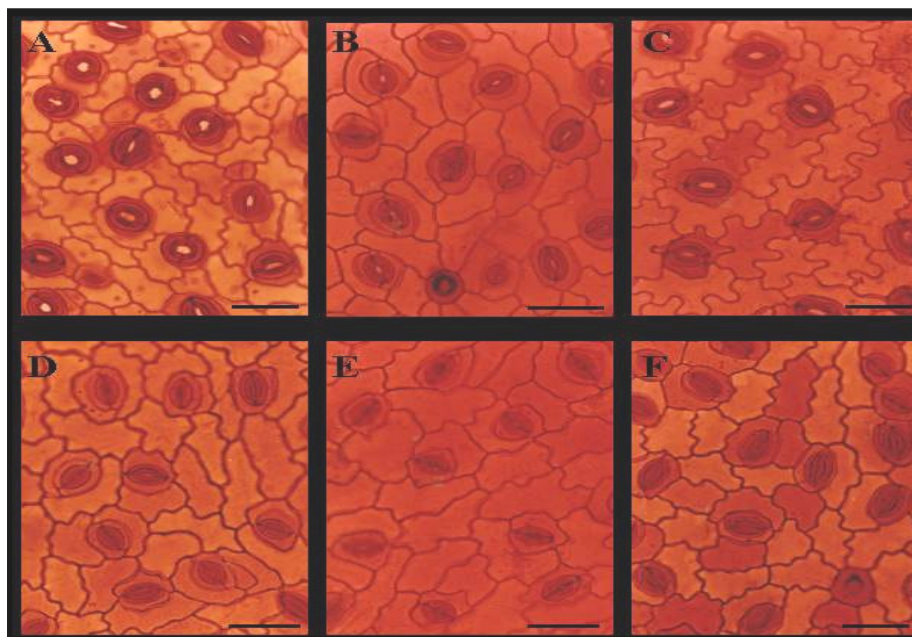


FIGURA 4.4. Seção paradérmica de folhas de *U. guianensis*. A- plantas *in vitro*. B-plantas com 15 dias de aclimatização.C-plantas com 30 dias de aclimatização. D-plantas com 45 dias de aclimatização. E-plantas com 60 dias de aclimatização e F-plantas com 90 dias de aclimatização. A barra corresponde a 50 μ m. UFLA, Lavras-MG, 2004.

3.2 Anatomia comparada de *Uncaria tomentosa* propagada *in vitro* e durante a aclimatização

As folhas de *U. tomentosa* provenientes de plantas adultas cultivadas em casa-de-vegetação, apresentaram organização dorsiventral e hipo-estomática (Figura 4.5D), tal como observaram Gattuso et al., (2004) ao descreverem a anatomia da lamina foliar de *U. guianensis* e *U. tomentosa*.

A epiderme é uni-estratificada (Figura 4.5D), com células de dimensões variáveis, maiores dimensões observadas na superfície adaxial (Figura 4.5D; Tabela 4.3).

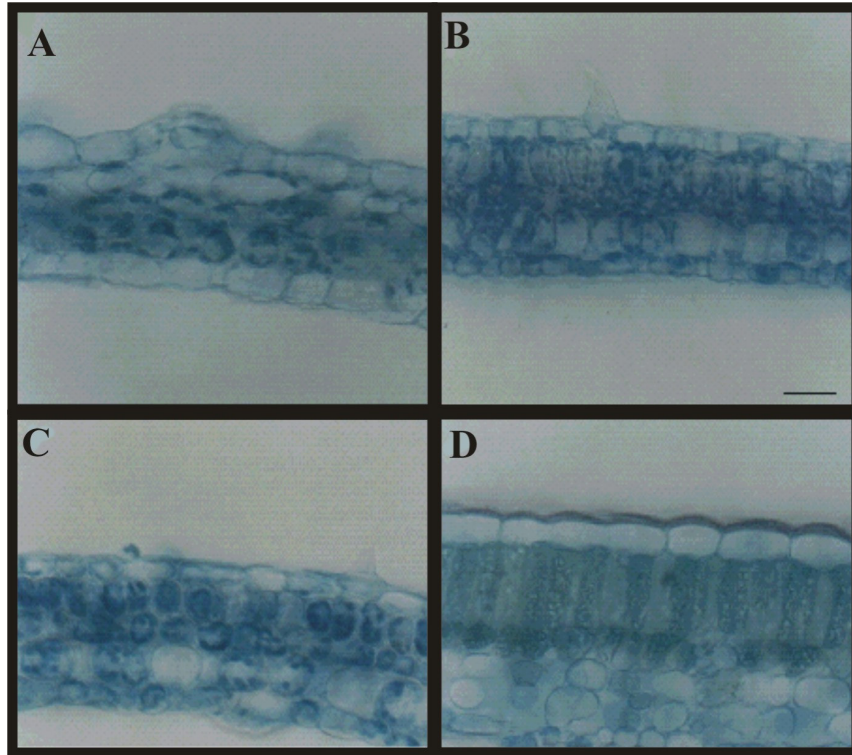


FIGURA 4.5. Seção transversal de folhas *U. tomentosa*, evidenciando o mesofilo. A- *in vitro* B- 30 dias de aclimatização C- 60 dias de aclimatização D- adultas estabelecidas em casa-de-vegetação. A barra corresponde a 50 μ m. UFLA, Lavras-MG, 2004.

TABELA 4.3. Espessura média (μm) de tecidos e espessura total do limbo foliar de *U. tomentosa* obtidas pela propagação *in vitro*, submetidas aos diferentes períodos de aclimatização e plantas adultas cultivadas em casa-de-vegetação. UFLA, Lavras-MG, 2004

Tratamento	Epiderme Adaxial	Parênquima Paliçádico	Parênquima Esponjoso	Epiderme Abaxial	Espessura Total
In vitro	0,90 b	0,00 c	1,86 b	0,55 b	3,31 b
30 dias	0,65 c	0,93 b	1,22 c	0,47 c	3,27 b
60 dias	0,66 c	0,92 b	1,26 c	0,50 c	3,34 b
Casa de vegetação	1,07 a	2,51 a	2,15 a	0,78 a	6,52 a

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

O mesofilo é representado por uma camada de parênquima paliçádico, de células alongadas justapostas e células do parênquima esponjoso, frouxamente arranjadas, com 2 a 3 camadas e poucos espaços intercelulares (Figura 4.5D). Gattuso et al., (2004) obtiveram resultados semelhantes para a *U. tomentosa* e observaram de 1 a 2 camadas de parênquima paliçádico em *U. guianensis*, bem como a presença de parênquima esponjoso em ambas as espécies.

Organização dorsiventral, folhas hipostomáticas e estômatos do tipo paracítico têm sido observados em várias espécies de Rubiaceae. Dentre as espécies desta família com estas mesmas características podem destacar a *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes (Assis & Giulietti 1999) e a *Policourea longepedunculata* Gardiner (Pereira et al., 2003).

As plântulas *in vitro* apresentaram o mesofilo completamente indiferenciado, sendo que a diferenciação aumenta com a aclimatização (Figura 4.5).

Os resultados mostraram alterações significativas nas plantas propagadas *in vitro* e durante os períodos de aclimatização sobre todas as características estruturais do limbo foliar. A espessura das epidermes adaxial e abaxial e do parênquima esponjoso mostrou-se significativamente maior nas plantas adultas mantidas em casa de vegetação, seguida das plântulas *in vitro* e aclimatizadas. As plantas com 30 e 60 dias de aclimatização não apresentaram diferenças significativas entre as espessuras dos tecidos foliares (Tabela 4.3).

Observa-se que as plântulas *in vitro* e aos 30 e 60 dias de aclimatização as plantas não diferiram estatisticamente entre si quanto à espessura total dos tecidos. As maiores espessuras foram sempre encontradas em plantas estabelecidas em casa-de-vegetação, o que concorda com outros estudos utilizando técnicas de micropropagação em *Byrsonima intermedia* A. Juss (Nogueira, 2003) e *Copaifera lang* (Azevedo, 2003).

A anatomia foliar é um fator importante no processo de absorção de luz, especialmente na estrutura do mesofilo. É esperado, portanto, que quanto mais espesso o parênquima paliçádico maiores sejam também as taxas fotossintéticas (Bolhar-Vordenkampf & Draxler, 1993), processo fundamental ao crescimento e desenvolvimento vegetal. Como pode ser observado na Tabela 4.3 e Figura 4.5, a maior necessidade autotrófica do ambiente *ex vitro*, induz mudanças significativas e progressivas de toda a estrutura foliar no decorrer do tempo como forma de adaptação a este novo meio.

Foram observados tricomas tectores, uni e multicelulares, com o ápice fortemente curvado, distribuído por toda a epiderme em ambas as superfícies em todas as condições avaliadas. Esses tricomas encontram-se em maior densidade ao longo da nervura principal, podendo ser observado em detalhe na Figura 4.6A.

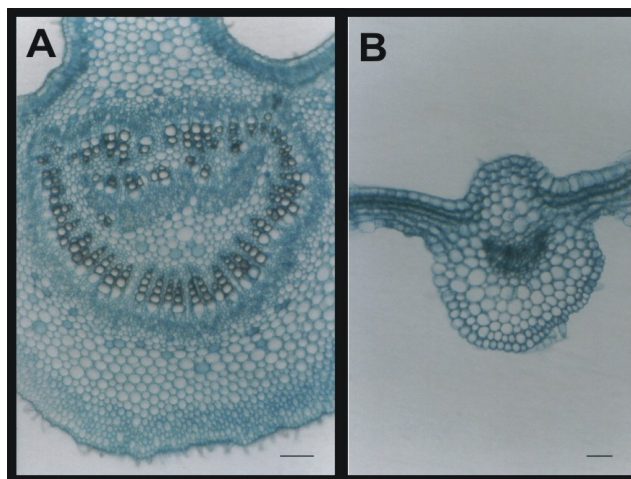


FIGURA 4.6. Seção transversal de folhas de *Uncaria tomentosa*, evidenciando a nervura central. A- *in vitro*. B- 30 dias de aclimatização. A barra corresponde a 100 μm . UFLA, Lavras-MG, 2004.

Estão presentes no mesofilo idioblastos cristalíferos e cristais poliédricos de acordo com Gattuso et al. (2004), são de cristais de oxalato de cálcio e encontram-se mais abundantes em *U.tomentosa*.

Na nervura central da região mediana do limbo, o sistema vascular é constituído por um feixe colateral. Abaixo da epiderme, no córtex, o tecido de sustentação está representado por colênquima do tipo angular nas superfícies adaxial e abaxial (Figura 4.6A).

Observa-se que as células das plantas *in vitro* exibem paredes sinuosas mais acentuadas que as de casa-de-vegetação (Figura 4.6 A e 4.6B). Medri & Lleras (1980) sugeriram que a menor sinuosidade da parede pode estar relacionada às características adaptativas contra a perda excessiva de água,

justifica-se assim a maior sinuosidade observada na epiderme adaxial, das plantas *in vitro*.

Os estômatos são do tipo paracítico e estão situados em nível superior as demais células epidérmicas. Observa-se uma densidade de 248 estômatos/mm² em plantas adultas (Figura 4.7A e Tabela 4.4). Resultados semelhantes foram observados por Gattuso et al. (2004).

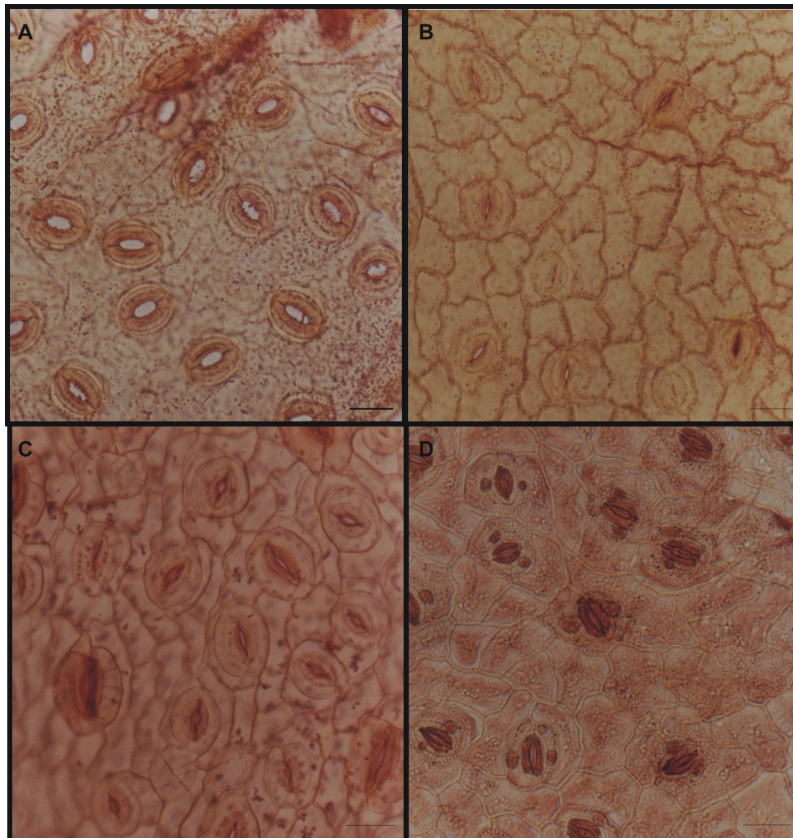


FIGURA 4.7. Seção transversal de folhas de *Uncaria tomentosa*, evidenciando a nervura central. A-*in vitro*. B-30 dias de aclimatização. C-60 dias de aclimatização. D-adultas estabelecidas em casa-de-vegetação. A barra corresponde a 100 μ m. UFLA, Lavras-MG, 2004.

TABELA 4.4. Médias do número de estômatos/mm², diâmetro polar e diâmetro equatorial dos estômatos na superfície abaxial em indivíduos de *U. tomentosa* obtidos pela propagação *in vitro*, submetidas a períodos de aclimatização e plantas adultas cultivadas em casa-de-vegetação.UFLA, Lavras-MG, 2004.

Tratamento	Número estômatos (mm ²)	Diâmetro polar (µm)	Diâmetro equatorial (µm)
In vitro	397,25 a	1,11 b	0,85 a
30 dias	304,88 b	1,00 b	0,76 b
60 dias	214,60 c	1,19 a	0,67 c
Horto	248,64 c	1,18 a	0,71 c

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

Tanto a densidade estomática quanto as dimensões de polaridade dos estômatos variaram com a mudança do ambiente *in vitro* para o *ex vitro*. Estas características foram maiores nas condições *in vitro* (Tabela 4.4).

As plântulas *in vitro* apresentaram maior número de estômatos e diâmetro equatorial, seguido das plantas com 30 dias de aclimatização. O diâmetro polar foi menor nas plântulas *in vitro* e aos 60 dias de aclimatização. As plantas com 60 dias de aclimatização e as adultas não diferiram significativamente entre si quanto ao número de estômatos, diâmetros equatorial e polar dos estômatos (Tabela 4.4).

Nas plantas em casa-de-vegetação (Figura 4.7D), assim como *in vitro* (Figura 4.7A), os estômatos situam-se em nível superior às demais células da epiderme, o que está de acordo com Capellades et al. (1990), segundo os quais o período de aclimatização *ex vitro* também permite a redução na frequência de

estômatos, altera o formato e a topografia deles e, de maneira geral, favorece os diversos parâmetros foliares.

O grande número de estômatos observados em plantas *in vitro* pode ter sido provocado por menor intensidade luminosa e trocas gasosas reduzidas. Desta forma, os numerosos estômatos provavelmente facilitaram as trocas e aumentaram a eficiência fotossintética. Durante a aclimatização dessas plantas, porém, número de estômatos se reduz, provavelmente para evitar perda excessiva de água com a transpiração. Em estudos anteriores com plantas de “roseira” (*Rosa* sp.) Capellades et al.(1990) e de “figueira” (*Ficus* sp.) Fráguas (2003), foram observados resultados similares aos encontrados neste trabalho.

Observa-se que as plântulas *in vitro* apresentam estômatos mais arredondados e abertos e à medida que ocorre a aclimatização eles adquirem forma elíptica e alguns estão fechados (Figura 4.7A). De acordo com Kchan et al. (2003), a forma elíptica é característica de estômatos funcionais, enquanto a forma arredondada frequentemente é associada a estômatos que não apresentam um funcionamento normal. Por outro lado, estômatos abertos podem ser capazes de fechar rapidamente, impedindo a perda de água, quando a planta é retirada do recipiente de cultivo. Estes resultados discordam dos encontrados por Gattuso et al. (2004) que detectaram estômatos apenas na superfície abaxial em folhas de *U.tomentosa*. Esta diferença pode ser explicada devido às condições de cultivo *in vitro* e *in vivo*.

4 CONCLUSÕES

A variação na anatomia das folhas de *Uncaria guianensis* e *Uncaria tomentosa* nas plantas propagadas *in vitro* e durante os períodos de aclimatização e casa de vegetação, mostraram diferenças significativas sobre todas as características estruturais do limbo.

Na nervura central na região mediana do limbo o sistema vascular é constituído por um feixe colateral na forma de “U” arqueado.

Houve alteração na frequência dos estômatos, no formato e topografia durante o período de aclimatização.

Estruturas dos estômatos de plantas micropropagadas apresentaram grande diferença das plantas de casa de vegetação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, E. S.; ANGYALOSSY-ALFONSO, V.. Ecological trends in the wood of some Brazilian species 1: growth rings and vessels. **IAWA Journal**, v. 21, p. 3-30, 2000.

AQUINO, R. Plant Metabolites .New compounds and anti-inflammatory active of *Uncaria tomentosa*. **Journal of Natural Products**, v. 54, n. 2, p. 453-459, 1991.

ASSIS, M. C.; GIULIETTI, A. M. Diferenciação morfológica e anatômica em populações de *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes (Rubiaceae). **Revista brasileira de Botânica**, v. 22, n. 2, p. 1-12, 1999.

AZEVEDO, K. S. **Indução e análise bioquímicas de calos e aspectos da anatomia foliar de copaiba** (*Copaifera langsdorffii* Desf.). 2003. 86 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

BAAS, P. Systematic, phylogenetic and ecological wood anatomy - History and perspectives. In: BAAS, P. **New perspectives in wood anatomy**. Leiden: The Hague Martinus Nijhoff Publishers, 1982. p. 23-58.

BAAS, P.; SCHWEINGRUBER, F. H. Ecological trends in the wood anatomy of trees, shrubs and climbers from Europe. **IAWA Bulletin**, v. 8, p. 245-274, 1987.

BIDWELL, R. G. S. Protein Synthesis and turn over in cultured plant tissue: sources of carbon for synthesis and the fate of the protein breakdown products. **Nature**, v. 203, n. 44943, p. 367 – 373. 1974.

BOLHAR-VORDENKAMPF, H. R.; DRAXLER, G. **Funcional leaf anatomy Photosynthesis and Production in a Changing Environment: a field and laboratory manual**. London: Chapman & Hall, 1993. p. 91-112.

CAPERLLADES, M.; VANDERS CHAEGHE, A.; LEMUER, R.; DEBERGH, P. How important is photosynthesis in micropropagation. In: SANGWAN, R. S.; SANGWAN – NORREEL, B. S. (Eds.). **The impact of Biotechnology in Agriculture**. Kluwer Dordrecht: Academic, 1990.

CARLQUIST, S. **Comparative wood anatomy**: systematic, ecological and evolutionary aspects of dicotyledons wood. Berlin: Springer Verlag, 1988.

CERRI, R. New quinóvico acid glycosides from *Uncaria tomentosa*. **Journal of Natural Products**, 51 (2): 257-261. 1998.

FERREIRA, D. F. SISVAR – **Sistemas de análises de variância para dados balaceados**: programa de análises estatísticas e planejamento de experimentos. Versão 4.3. Lavras: UFLA. 1999.

FIDELIS, I. **Micropropagação de Brosimum gradichaudii trec. (Mama-cadela) uma espécie considerada medicinal**. 1998. 109 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

FRÁGUAS, C. B. **Micropropagação e aspectos da anatomia foliar da figueira Roxo de Valinhos em diferentes ambientes**. 2003. 110 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

GATTUSO, M.; SAPIO, O. D.; GATTUSO, S.; PEREYRA, E. L. Morphoanatomical studies of *Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis* bark and leaves. **Phytomedicine**, v. 11, p. 213 – 223, 2004.

GONTUZZO, E. En marcha seria investigacion: una de gato y pacientes com el VIH. **De Ciencias y Tecnología**, 1993. 34 p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformações genéticas de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPQ, 1998. v. 1, p. 183-260.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. 2. ed. New York: Mc Graw-Hill, 1940. 523 p.

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

LABOURIAL, L. G.; OLIVEIRA, J. G.; SALGADO-LABOURIAL, M. L.. Transpiração de *Schizolobium parahyba* (Vell) Toledo I. Comportamento na estação chuvosa, nas condições de Caeté, Minas Gerais. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, v. 23, p. 237-257, 1961.

LLOYD, G.; MCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant propagators Society Proceedings**, v. 30, p. 421-427, 1980.

LOMBARDI, I.; ZEVALLOS, P. P. A. **Guia para el cultivo, aprovechamiento y conservación de la uña de gato (*Uncaria tomentosa* (Willd ex Roemer & Schultes) De Candole)**. [S.l.: s.n.], 1998. 47 p.

LORENZO, H.; MATOS, F. J. A . **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 512 p.

MEDRI, M.; LERAS, E. Aspectos da anatomia ecológica de folhas de *Hevea brasiliensis* (Muell.) Arg. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 10, n. 3, p. 51-56, 1980.

MENEZES, N. L.; SILVA, D. C.; PINNA, G. F. M. Folha. In: APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. (Ed.). **Anatomia Vegetal**. Viçosa, MG: UFV, 2003. 438 p.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised médium for rapid growth and boassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473 – 497, 1962.

NASCIMENTO, C. F. **Aspectos anatomicos, fisiologicos e fitoquimicos de plantas jovens de *Mikania glomerata* Sprengel (Guaco) submetidas a diferentes regimes hibridos**. 2003. 68 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

NOGUEIRA, R. C. **Propagação *in vitro*, análises anatômicas e bioquímicas de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.)**. 2003. 89 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

OBREGON VILCHES, L.E. **Una de gato Gênero *Uncaria*, Estudos botânicos, químicos y farmacológicos de *Uncaria tomentosa* y *Uncaria guianensis***. 3. ed. Lima: Instituto de Fitoterapia Americano, 1997. 169 p.

PEREIRA, Z. V.; MEIRA, R. M. S. A.; AZEVEDO, A. A. Morfoanatomia foliar de *Policourea longepunculata* Gardiner (Rubiaceae). **Revista Árvore**, v. 27, n. 6, p. 1-12, 2003.

RECIO, M. C.. Structural requirements for the anti-inflammatory activity of natural triterpenoids. **Planta Medica**, v. 61, n. 2, p. 182-185, 1995.

SANTOS, C. G. **Micropropagação e caracterização bioquímica anatômica em *Coffea arabica* e *Coffea canephora***. 2001. 110 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A. Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Washington, v. 30, n. 3, p. 507-512, 1974.

SOARES, G. A. **Aspectos do cultivo in vitro do ingazeiro [*Inga vera* Willd. subsp. affinis (DC.) T.D. Penn.]**. 2003. 90 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SUN, O. J.; SWEET, G. B.; WHITEHEAD, D.; BUCHAM, G. D. Physiological responses to water stresses and waterlogging in *Nothofagus* species. **Tree Physiology**, v. 15, n.10, p. 629-638, 1995.

ZIV, M. "In vivo" hardening and acclimatization of tissue culture plants. In: _____. **Agricultural applications**. London: Butterworths, 1987. p. 187-196.

CAPÍTULO V

**MONITORAMENTO DOS ALCALÓIDES OXINDÓLICOS
BIOMARCADORES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA
EFICIÊNCIA (CLAE) E CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA
(CCD) EM MATERIAIS VEGETATIVOS *IN VIVO* E *IN VITRO* E
CALOS DE *Uncaria guianensis* E *Uncaria tomentosa***

RESUMO

PEREIRA, Rita de Cássia Alves. Monitoramento dos alcalóides oxindólicos biomarcadores por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia em camada delgada (CCD) em materiais vegetativos *in vivo* e *in vitro* e calos de *Uncaria guianensis* e *Uncaria tomentosa*. In: ____ **Micropropagação, indução de calos, características anatômicas e monitoramento por biomarcadores de *Uncaria tomentosa* Willdenow Ex Roemer & (Schultes) DC e *Uncaria guianensis* (Aublet) Gmelin (unha de gato)**. 2004. p.134-166. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG.¹

Seis alcalóides oxindólicos pentacíclicos são considerados os biomarcadores das espécies *Uncaria tomentosa* e *U. guianensis*: pteropodina, isopteropodina, mitrafilina, isomitrafilina, especiofilina e uncarina F. Esses são os principais responsáveis por suas atividades imunoestimulante, citotóxica e antiinflamatória sendo utilizados no controle químico do material vegetal e fitoterápicos derivados. O presente estudo objetivou monitorar a presença desses alcalóides em amostras de cascas de sementes, folhas *in vivo* e *in vitro* e calos de *Uncaria tomentosa* e *Uncaria guianensis* visando à multiplicação dessas espécies. Uma análise preliminar por CCD em amostras de calos e plântulas, revelou que somente as plântulas de *Uncaria guianensis* e *Uncaria tomentosa* continham alcalóides. A análise posterior por CLAE de novas amostras obtidas de folhas de plantas *in vivo* e *in vitro* e cascas de sementes de *Uncaria guianensis* e de *Uncaria tomentosa* possibilitou uma análise qualitativa detalhada e determinou a quantidade de alcalóides totais (em relação ao padrão isopteropodina) mostrando que, com exceção das amostras de calos, todas as outras apresentaram alcalóides, sendo os maiores teores encontrados nas folhas das plantas cultivadas *in vitro* e aclimatadas aos 45 dias para ambas as espécies. O monitoramento mostrou a viabilidade de cultivo *in vitro* das espécies o que representa uma excelente ferramenta para a produção em maior escala destes alcalóides.

¹ Comitê Orientador: Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto (Orientador)- UFLA, Dra Ligia Maria Marino Valente-UFRJ, Dr. Evaristo Mauro de Castro-UFLA.

ABSTRACT

PEREIRA, Rita de Cássia Alves. Monitoring of oxindol alkaloid biomarkers by high pressure liquid chromatography (HPLC) and thick layer chromatography (TLC) in vegetative materials *in vivo* and *in vitro* and callus de *Uncaria guianensis* e *Uncaria tomentosa*. . In: ____ **Micropropagation, callus induction, anatomical characteristics and monitoring by biomarkers of *Uncaria tomentosa* (Willdenow Ex Roemer & Schultes) DC and *Uncaria guianensis* (Aublet) Gmelin (cat's claw)**. 2004. p.134-166. Thesis (Doctorate in Agronomy) - Federal University of Lavras, Lavras- MG.¹

Six pentacyclic oxindole alkaloids are considered the biomarkers for the *Uncaria guianensis* and *Uncaria tomentosa* species: pteropodine, isopteropodine, mitraphylline, isomitraphylline, uncarine F and speciophylline. These are the the agents principally responsible for their immuno-stimulant, cytotoxic and anti-inflammatory activities being used in the chemical control of vegetal material and phytopharmaceutical derivatives. The present study aimed to monitor the presence of those alkaloids in seed shell samples, *in vivo* and *in vitro* leaves and callus of the *Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis* aiming at the multiplication of those species. A preliminary analysis via TLC in callus and plantlet samples revealed that only *Uncaria guianensis* and *Uncaria tomentosa* plantlets had alkaloids. A further analysis through HPLC of new samples from plant leaves *in vivo* and *in vitro* and seed shells of *Uncaria guianensis* and *Uncaria tomentosa* made possible a detailed quantitative analysis and determined the total alkaloid quantities (related to isopteropodine standard) showing that, with the exception of callus samples, all the others showed alkaloids. The highest levels found in the leaves from *in vitro* growing plants and acclimated at 45 days for both species. The monitoring showed the viability of *in vitro* cultivation of the species which represents an excellent tool for production of those alkaloids on a larger scale.

¹ Guidance Committee: Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto (Advisor), UFLA, Dra Ligia Maria Marino Valente-UFRJ, Dr. Evaristo Mauro de Castro- UFLA.

1 INTRODUÇÃO

O grande incremento de uso de plantas para fins medicinais neste começo de século tem provocado um interesse crescente pelo conhecimento da composição química das plantas, estimulando profissionais dedicados ao estudo nas áreas de química de produtos naturais, biologia, botânica, farmácia e medicina.

As plantas apresentam grande flexibilidade na produção de compostos químicos, graças à variabilidade genética e fatores fisiológicos, e podem aumentar a canalização de energia obtida no metabolismo primário, para o metabolismo secundário. A biossíntese das substâncias desejadas pode aumentar através de estudos dessa variação e de seleção tanto de genes como de regimes ambientais ótimos (Brown Júnior, 1988).

Os constituintes químicos encontrados no reino vegetal são sintetizados e degradados por inúmeras reações anabólicas e catabólicas que compõem o metabolismo das plantas. A síntese de compostos essenciais para a sobrevivência das espécies vegetais, tais como açúcares, aminoácidos, ácidos graxos, nucleotídeos e seus polímeros derivados, faz parte do metabolismo primário das plantas. Por outro lado, os compostos sintetizados por outras vias e que fazem parte do metabolismo secundário chamam-se compostos secundários (Di Stasi, 1996).

A separação destas duas vias metabólicas é muita obscura e a classificação dos compostos em primários e secundários depende muito da importância de determinada espécie, assim como do estágio de desenvolvimento em que ela se encontra.

Existem três pontos de origem e de produção de compostos secundários, diferenciados por seus precursores: ácido chiquímico, como precursor de

inúmeros compostos aromáticos; aminoácidos, fonte de alcalóides e peptídeos; acetato, que através de duas rotas biossintéticas, origina compostos como poliacetilenos, terpenos, esteróides e outros (Mann, 1987).

Essas reações compõem o metabolismo das espécies vegetais que é coordenado por uma série de enzimas e co-enzimas responsáveis pelos processos de síntese e degradação desses compostos, os quais são diferentemente distribuídos nas espécies vegetais (Raven et al., 2001).

A grande diversidade de metabólitos secundários e, conseqüentemente, grande número de compostos existentes na natureza é praticamente desconhecida. Apenas os metabólitos secundários obtidos de espécies lenhosas mostraram alguma atividade biológica determinada, tendo sido encontrado um número de 940 compostos naturais ativos, distribuídos em dezenas de classes distintas de substâncias químicas. Entretanto, esses dados não incluem os componentes naturais obtidos de espécies não lenhosas, o que provavelmente indicaria a presença de um número bem maior de substâncias (Di Stasi, 1996).

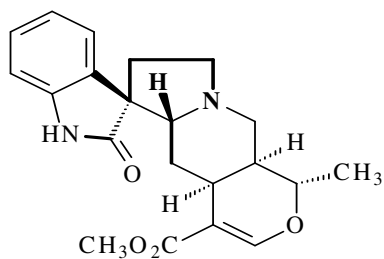
As atividades relacionadas com o estudo farmacognóstico das plantas exercem um papel relevante no suporte da qualidade dos produtos para o mercado. A análise e caracterização de marcadores químicos nos extratos estabelecem a identidade do vegetal. Esta fase é indispensável para o planejamento e monitoramento das etapas da transformação tecnológica, bem como a garantia da qualidade dos produtos intermediários e finais (Matos et al., 2004).

A cromatografia em camada delgada (CCD) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) são consideradas, atualmente, umas das melhores ferramentas analíticas para o controle da qualidade de materiais vegetais e de seus derivados fitoterápicos, em função principalmente da sensibilidade e seletividade apresentadas (Gonzalez Ortega, 1993; Rehwarld et al., 1994).

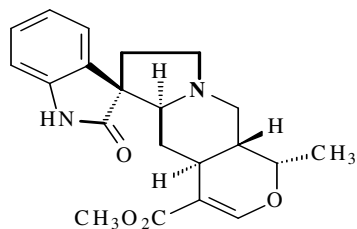
Em *Uncaria tomentosa* e *Uncaria guianensis* são encontrados como metabólitos secundários alcalóides oxindólicos, N-oxi-oxindólicos e indólicos, triterpenos glicosilados, taninos e flavonóides. Dentre esses metabólitos, seis alcalóides oxindólicos pentacíclicos são considerados seus biomarcadores: pteropodina, isopteropodina, mitrafilina, isomitrafilina, especiofilina e uncarina F (Figura 5.1), por serem os principais responsáveis pelas atividades imunestimulante, citotóxica e anti-inflamatória das espécies e utilizados no controle químico do material vegetal e fitoterápicos derivados (Jones, 1995).

Apesar de muitos estudos fitoquímicos das espécies *Uncaria tomentosa* e *Uncaria guianensis* (Jones, 1995; Vilches, 1997), não há descrição sobre a constituição química de plantas micropropagadas destas espécies e nem do monitoramento da produção de seus alcalóides nas mesmas.

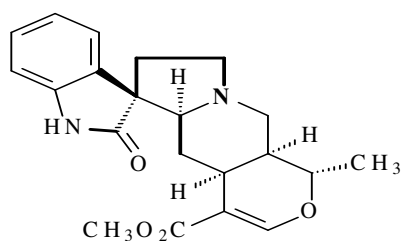
O presente estudo objetivou monitorar por cromatografia de camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) a presença dos alcalóides oxindólicos biomarcadores em cascas de sementes, folhas *in vivo* e *in vitro* e calos de *Uncaria tomentosa* e *Uncaria guianensis*, visando estabelecer uma metodologia de cultivo para as duas espécies.



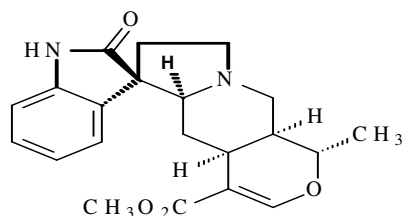
Espiciofilina



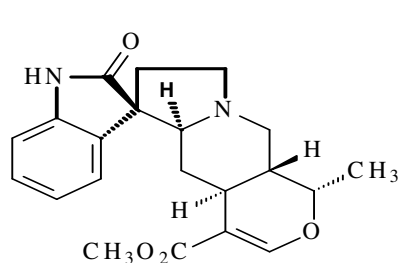
Isomitrafalina



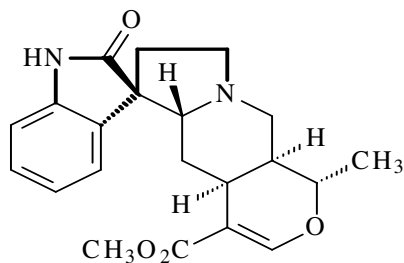
Isopteropodina



Pteropodina



Mitrafalina



Uncarina F

FIGURA 5.1. Estruturas químicas de alcalóides oxindólicos biomarcadores de *Uncaria tomentosa* e *Uncaria guianensis*.UFLA/UFRJ/DQI, Lavras-MG, 2004.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A obtenção dos calos e do material vegetal foi realizada no Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, UFLA, Lavras-MG.

O monitoramento dos marcadores químicos das amostras de *U. tomentosa* e *U. guianensis* por CCD e CLAE, foi realizado no Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.

2.1 Obtenção do material vegetal *Uncaria tomentosa* e *Uncaria guianensis*

2.1.1. A partir de calos originados de plântulas *in vitro*

Os calos foram induzidos a partir de explantes foliares de plântulas germinadas *in vitro* de *Uncaria guianensis* e *Uncaria tomentosa* e inoculados em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) com 100% dos sais, inositol, vitaminas, 0,6% de ágar e 3% de sacarose e suplementado com 1,5 mg.L⁻¹ de Picloram. Após a indução esses foram subcultivados no mesmo meio de cultura de indução, por três vezes, a cada 30 dias. Com o estabelecimento dos calos de ambas as espécies, esses foram subcultivados em meio MS suplementado com 0,5 mg.L⁻¹ das auxinas ácido 4-amino 3,5,6 tricloropicolínico (Picloram), ácido naftaleno acético (ANA), ácido indol butírico (AIB) e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D).

O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso, com três repetições em esquema fatorial 4x8, (quatro fitorreguladores e oito épocas de

crescimento) totalizando 288 unidades experimentais, sendo cada unidade formada por quatro explantes.

Para realização das análises fitoquímicas, os calos foram coletados em intervalos de cinco dias durante 40 dias de cultivo, avaliando-se em cada período de coleta, a fitomassa fresca. Em seguida, os calos foram colocados para secar em estufa de ventilação forçada a 45°C determinando-se a fitomassa seca.

Devido a grande quantidade de amostras, fez-se escolha do material a ser monitorado de acordo com a curva de crescimento dos calos em três épocas de coleta (5, 20 e 35 dias). Uma amostra de calos cultivados sem suplementação com auxinas, de ambas as espécies, foi incluída para análise fitoquímica.

2.1.2 A partir de calos originados de plântulas *in vivo*

Foram utilizados calos formados a partir de explantes foliares de plantas de *Uncaria tomentosa* cultivadas em casa de vegetação. O meio de cultivo foi o MS suplementado com 1,5 mg.L⁻¹ de Picloram. Aos 60 dias de cultivo contínuo, os calos foram subcultivados por quatro vezes, utilizando-se o mesmo meio de cultura. Para a análise fitoquímica utilizaram-se calos secos com 30, 60 e 90 dias de cultivo.

2.1.3 A partir das plântulas cultivadas *in vitro*

Plântulas obtidas de *Uncaria guianensis* a partir de segmentos nodais inoculados em meio MS, e plântulas de *Uncaria tomentosa* originadas de segmentos nodais *in vivo* foram inoculados em meio WPM suplementado de 1,00 mg.L⁻¹ de BAP. Aos 45 dias, as plântulas das duas espécies foram retiradas do tubo de ensaio, e tiveram suas folhas excisadas e secas em estufa com

circulação de ar a 30°C. Para cada espécie de unha de gato foram utilizadas folhas de três plântulas.

2.1.4 A partir das plantas aclimatadas

A aclimatização das mudas provenientes de cultura *in vitro* foi realizada em casa de vegetação com sistema de nebulização intermitente. As plântulas foram transplantadas para bandejas de isopor com 72 células. Para análise fitoquímica, foram coletadas folhas de três plantas de cada espécie de unha de gato aos 30 e 45 dias de aclimatização, e colocadas para secar em estufa com circulação de ar a 30°C.

2.1.5 A partir das plantas cultivadas *in vivo*

Para a extração e quantificação dos alcalóides utilizaram-se amostras de folhas retiradas ao acaso de plantas de unha de gato com 24 meses de idade e 0,80 m de comprimento, mantidas em casa de vegetação do Horto de Plantas Medicinais do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (DAG/UFLA).

A produção das mudas foi conduzida da seguinte maneira: inicialmente efetuou-se a sementeira em bandejas de isopor de 128 células contendo Plantmax® como substrato. Decorridos 60 dias, as plântulas foram repicadas para sacos plásticos de polietileno de ½ Kg com o mesmo substrato, e ali permaneceram por 30 dias; depois transplantadas para sacos plásticos perfurados de 35 x 20 cm, com capacidade de 4kg. Da sementeira até a coleta das folhas para análise foliar, as mudas permaneceram em casa de vegetação (50% de sombreamento), irrigadas por micro-aspersão intermitente.

2.1.6 A partir de cascas das sementes

As sementes utilizadas provieram da Embrapa Acre (AC), coletadas de plantas adultas de populações naturais dos municípios de Boca do Acre-AM (*Uncaria guianensis*) e Feijó-AC (*Uncaria tomentosa*) em 23.08.2003.

As cascas das sementes foram separadas do embrião, e em seguida foram maceradas para as análises fitoquímicas.

2.2 Análise cromatográfica do material vegetal

2.2.1 Amostra de referência (UTFA)

Nas análises por CCD e CLAE foi utilizada uma amostra de referência certificada (UTFA), não comercial, fornecida pela professora Dra. Ligia Maria Marino Valente, do Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química da UFRJ. A amostra de referência é uma fração enriquecida de alcalóides oxindólicos biomarcadores, obtida por partição ácido-base clássica a partir do extrato etanólico de cascas do caule de *U.tomentosa*, onde os alcalóides foram isolados e identificados estruturalmente por espectrometria na região do infravermelho (IV), do ultravioleta (UV), técnicas de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono-13 (RMN ^1H e ^{13}C) em uma e duas dimensões, rotação óptica e cromatografia líquida de alta eficiência com detector de massas (CLAE-EM). Os alcalóides oxindólicos isolados e identificados foram injetados individualmente em CLAE e seus tempos de retenção e conseqüente caracterização da ordem de eluição determinados nas condições de análise (Mazzei et al., 2002).

2.2.2 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)*

Essa metodologia foi utilizada como etapa preliminar para o monitoramento da presença de alcalóides oxindólicos nos extratos metanólicos de calos induzidos em explantes foliares e plântulas de *Uncaria tomentosa* e *Uncaria guianensis* (Tabela 1A em anexo).

2.2.2.1 Preparação dos extratos brutos utilizados nas análises por CCD ⁽¹⁾

Para obtenção dos extratos brutos utilizados nas análises por CCD utilizou-se na metodologia otimizada por Ganzera et al., 2001 (Figura 5.2). Cada amostra do material vegetal foi macerada em gral de porcelana, e após a homogeneização, 750mg do material vegetal foi colocada em um tubo de ensaio com 2,5 mL de metanol. A extração se realizou em banho de ultrassom por 10 minutos a temperatura ambiente e em seguida o sobrenadante foi retirado com o auxílio de uma pipeta Pasteur, o procedimento este repetido por quatro vezes. Os extratos reunidos foram filtrados (utilizando uma pipeta Pasteur e algodão) e em seguida secos por evaporação do solvente à pressão reduzida. Para cada amostra o processo foi realizado em triplicata.

¹ As metodologias de análise por CCD e CLAE não foram integralmente descritas neste trabalho, por fazerem parte do acordo prévio de sigilo firmado entre o Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto da UFLA e a Dra. Ligia Maria Marino Valente da UFRJ, em virtude das mesmas terem sido recentemente estabelecidas pelo grupo da UFRJ, não estando ainda publicadas.

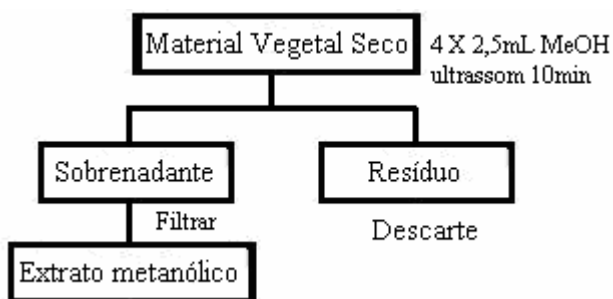


FIGURA 5.2. Esquema geral de obtenção de extratos metanólicos de *Uncaria tomentosa* e *Uncaria guianensis*. UFLA/IQ/UFRJ, Lavras–MG, 2004.

2.2.2.2 Preparação dos extratos semi-purificados utilizados nas análises por CCD

Os extratos metanólicos brutos das amostras vegetais foram submetidos à resina Poliamida 6, para retenção de taninos, por 15 min sob agitação magnética à temperatura ambiente (Ganzera et al., 2001). Em seguida, o sobrenadante foi separado com o auxílio de pipeta Pasteur e o solvente evaporado à pressão reduzida.

Os extratos semi-purificados obtidos foram redissolvidos em metanol com auxílio de banho de ultrassom, para serem aplicados em placa cromatográfica.

2.2.2.3 Análise cromatografia por CCD

Alíquotas dos extratos brutos e/ou dos semi-purificados por resina Poliamida 6 foram aplicadas em placas cromatográficas pré-elaboradas de sílica gel 60F (Merck) e eluídas segundo metodologia desenvolvida por Alves et al., (2004). As placas obtidas foram reveladas sob lâmpada de UV a 254 nm.

2.2.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

2.2.3.1 Preparação das frações enriquecidas em alcalóides para análise por CLAE

O material vegetal foi extraído com metanol e a massa da amostra/planta variou conforme a disponibilidade de material vegetal e o volume do solvente variou também procurando manter a relação planta solvente (Volume em metanol = massa do extrato x 5/ 25) (Tabela 3A no anexo). Os extratos obtidos foram secos por evaporação do solvente à pressão reduzida e submetidos a uma resina ácida macroporosa para retenção dos alcalóides. O sobrenadante foi separado e a resina tratada com MeOH/NH₄OH. A fração contendo alcalóides foi filtrada e concentrada a pressão reduzida (Bezerra et al., 2004).

2.2.3.2 Preparação das soluções para análise por CLAE

Conforme a massa obtida para cada fração alcaloídica (mg) calculou-se a concentração das soluções (µg/mL) a serem submetidas a CLAE variando de 300 a 700 µg/mL. As frações foram transferidas quantitativamente para balões volumétricos de 5, 10 ou 25 mL, conforme a concentração final desejada com metanol grau HPLC.

2.2.3.3 Sistema cromatográfico utilizado nas análises por CLAE

As análises foram realizadas em equipamento com bomba quaternária e controlador 500E Waters, injetor automático e detector photodiode array (DAD) HP series 1100, ligados a Chemstation HP Asterix Coluna Lichrocart Lichrospher RP-18, 5µm, 125 X 4,6 mm, fase móvel acetonitrila/água

(ACN/H₂O) com tampão AcONH₄, método isocrático, volume de injeção da amostra = 10µL e detecção em UV, 245nm e temperatura de 60°C (Mazzei et al., 2002).

2.2.3.4 Curva de calibração de isopteropodina

A partir de uma solução estoque de 100 µg/mL de isopteropodina (obtida por isolamento de cascas de *U. tomentosa* - Mazzei et al., 2002) foram feitas soluções de 50 µg/mL: 5 mL da solução estoque diluídos em balão volumétrico de 10 mL; 25 µg/mL: 5 mL da solução 50 µg/mL diluídos em balão volumétrico de 10 mL; 12,5 µg/mL: 5 mL da solução 25 µg/mL diluídos em balão volumétrico de 10 mL; 6,25 µg/mL: 5 mL da solução 12,5 µg/mL diluídos em balão volumétrico de 10 mL; 3,125 µg/mL: 1 mL da solução 6,25 µg/mL diluídos em balão volumétrico de 2 mL; 1,5625 µg/mL: 0,5 mL da solução 3,125 µg/mL diluídos em balão volumétrico de 1 mL.

A curva foi construída plotando-se a massa injetada (µg) de isopteropodina versus a área do pico obtido no cromatograma em u.a (unidades aleatórias).

Cada ponto da reta corresponde à média de três determinações sucessivas.

2.2.3.5 Identificação dos alcalóides oxindólicos biomarcadores nos cromatogramas em CLAE

A identificação dos alcalóides biomarcadores nos cromatogramas em CLAE foi realizada através da comparação dos tempos de retenção dos sinais

nos cromatogramas das amostras com os tempos de retenção dos alcalóides oxindólicos biomarcadores da amostra de referência.

Devido às mudanças no tempo de retenção absoluto dos alcalóides durante o longo processo de injeção, adotou-se o tempo de retenção relativo utilizando-se como referência a isopteropodina (presente na maioria das amostras). O cálculo foi baseado na seguinte fórmula:

$$t_{RR} = \frac{t_R \text{ absoluto de cada amostra}}{t_R \text{ da isopteropodina}}$$

sendo t_{RR} = tempo de retenção relativo e t_R = tempo de retenção.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise por Cromatografia de Camada Delgada (CCD)

3.1.1 Rendimento dos extratos metanólicos brutos e semi-purificados do material vegetal analisado

Os rendimentos dos extratos metanólicos brutos e semi-purificados por resina Poliamida 6, a partir de 750 mg de material vegetal estão discriminados no anexo (Tabela 2A)

3.1.2 Análise por CCD dos calos originados de plântulas *in vitro*

As análises por CCD de calos tanto do extrato bruto quanto do extrato submetido à resina Poliamida, não mostraram produção de alcalóides, ressaltando que o meio MS suplementado com reguladores de crescimento (Picloram, ANA, 2,4-D, AIB) na concentração de 0,5 mg.L⁻¹ foi inadequada para produção de alcalóides. Esses resultados evidenciam que os efeitos dos reguladores de crescimento de plantas sobre a produção de metabólitos secundários são complexos, um pouco contraditórios e difíceis de se explicar, porém, os níveis hormonais nas células devem ser considerados (Lameira, 1997).

Vários exemplos sobre a influência de reguladores de crescimento na produção de compostos secundários podem ser citados: na cultura de *Psychotia ipecacuanha*, uma Rubiaceae da Amazônia, calos induzidos de hipocótilo sobre o meio MS contendo 2,4-D e ANA acumularam 0,35 e 0,93% de emetina e cefalina, respectivamente (Lameira, 1997); síntese de nicotina na cultura de

Nicotiana tabacum (Tabata et al., 1971) e alcalóides tropanos através de calos e plântulas da espécie *Duboisia myoporoides* (Khanam et al., 2000).

3.1.3 Análise por CCD dos calos originados de folhas de plantas *in vivo* e plântulas de *Uncaria tomentosa* e *Uncaria guianensis*

As análises por CCD dos extratos metanólicos de calos induzidos a partir de folhas *in vivo* de *Uncaria tomentosa* aos 30, 60 e 90 dias e de extratos metanólicos obtidos a partir de plântulas cultivadas *in vitro* das duas espécies de unha de gato, indicaram presença de alcaloides.



FIGURA 5.3. Placa cromatográfica para análise em CCD das amostras de plântulas de *Uncaria guianensis* e *Uncaria tomentosa*. UFLA/IQ/UFRJ, Lavras-MG, 2004.

3.2 Análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Em função dos resultados obtidos no item 3.1.3. novas amostras foram construídas a partir de calos originados a partir de plantas *in vivo* com 30, 60 e 90 dias de *Uncaria tomentosa*; folhas de plântulas cultivadas *in vitro*; plantas aclimatadas aos 30 e 45 dias; plantas cultivadas em casa de vegetação aos 24 meses e cascas de sementes das duas espécies (*Uncaria tomentosa* e *Uncaria guianensis*) e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

3.2.1 Rendimento das frações enriquecidas em alcalóides utilizadas nas análises por CLAE

Os rendimentos das frações enriquecidas em alcalóides obtidas estão discriminados (anexo Tabela 3A).

3.2.2 Identificação dos alcalóides oxindólicos biomarcadores nos cromatogramas em CLAE

Os tempos de retenção relativos dos alcalóides oxindólicos presentes nas amostras analisadas de *Uncaria tomentosa* e *Uncaria guianensis* estão apresentados na Tabela 5.1.

TABELA 5.1. Tempos de retenção relativos a isopteropodina dos alcalóides oxindólicos biomarcadores presentes nas amostras de *U. tomentosa* e *U. guianensis*, analisados por CLAE. UFLA/IQ/UFRJ, Lavras-MG, 2004.

Amostras	Alcalóides					
	ESP	MIT	UNCF	PT	IMIT	IPT
UTFA	0,39	0,45	0,48	0,59	0,62	1,00
Plântula UT	0,32	0,45	-	0,59	0,62	1,00
Plântula UG	0,38	0,45	0,48	0,59	0,65	1,00
Folha planta matriz UT	0,34	0,43	-	0,57	0,60	1,00
Cascas sementes UT	0,31	0,43	-	0,57	-	1,00
Folhas planta matriz UG	0,36	0,43	-	0,57	0,60	1,00
Cascas sementes UG	-	-	-	-	-	-
Folhas aclimatadas aos 30 dias UG	0,36	0,45		0,58		1,00
Folhas aclimatadas aos 45 dias UG	0,36	0,43	-	0,58	0,60	1,00
Folhas aclimatadas aos 30 dias UT	0,36	0,43	-	0,57	0,60	1,00
Folhas aclimatadas aos 45 dias UT	0,36	0,45	-	0,57		1,00

UG = *Uncaria guianensis*; UT = *Uncaria tomentosa*

ESP = especiofilina; UNCF - Uncarina F; MIT = mitrafilina; PT = pteropodina;

IMIT = isomitrafilina; IPT = isopteropodina.

A identificação dos seis alcalóides biomarcadores: especiofilina, mitrafilina, uncarina F, pteropodina, imitrafilina, isopteropodina da amostra de referencia estão localizados na Figura 5.4

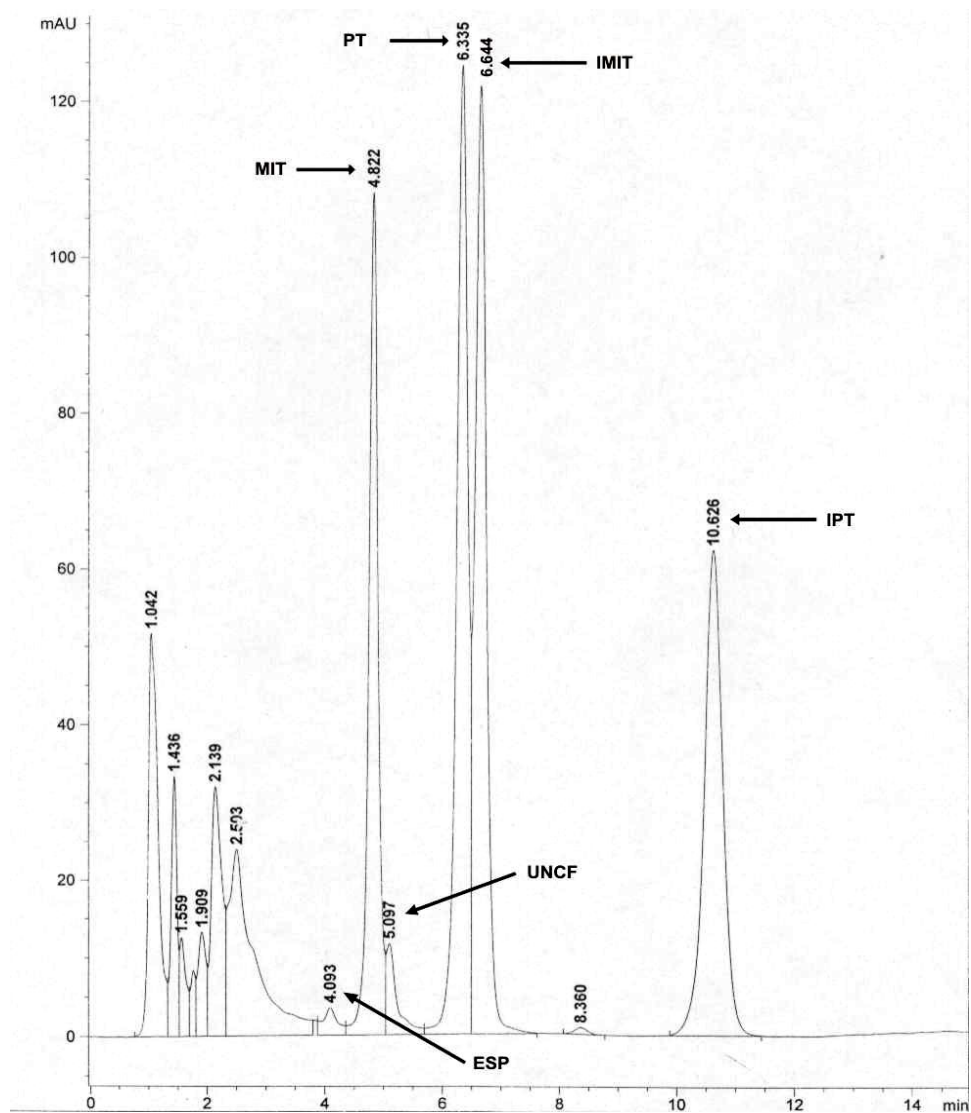


FIGURA 5.4. Cromatograma em CLAE da amostra certificada de referência (UTFA) com a identificação dos seis alcalóides biomarcadores das espécies estudadas. UFLA/IQ/UFRJ, Lavras-MG, 2004. ESP = especiofilina; UNCF = Uncarina F; MIT = mitrafilina; PT = pteropodina; IMIT = isomitrafilina; IPT = isopteropodina.

3.2.3 Curva de calibração de isopteropodina

Os dados relativos à curva de calibração de isopteropodina encontram-se na Tabela 5.2.

TABELA 5.2. Áreas dos picos das diversas concentrações de isopteropodina padrão para construção da curva de calibração para doseamento do teor de alcalóides por CLAE. UFLA/ IQ/UFRJ, Lavras-MG, 2004.

Concentrações (µg/mL)	Área 1	Área 2	Área 3	Área média	Desvio Padrão (%)
50,00	1907	1864	1889	1886	1,1
25,00	1433	1445	1427	1435	0,6
12,50	547,7	540,7	615,6	544,2	0,9
6,250	464,3	486,8	475,2	475,4	2,4
3,125	84,51	83,96	76,78	84,20	0,5

Área 1= 1ª injeção; Área 2= 2ª injeção; Área 3= 3ª injeção.

Na Figura 5.5 observa-se a curva de calibração para doseamento do teor de alcalóides biomarcadores das espécies de unha de gato, construída a partir de soluções padrão de isopteropodina. O comportamento da curva apresentou linearidade.

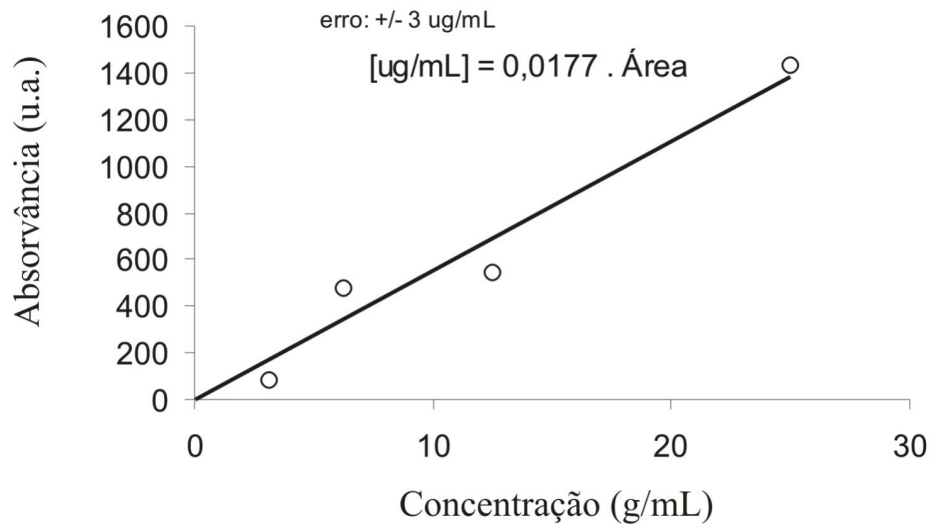


FIGURA 5.5. Curva de calibração para doseamento do teor de alcalóides em CLAE relativo a isopteropodina.UFLA/IQ/UFRJ.Lavras, MG, 2004.

3.2.4 Teor de alcalóides totais em relação a isopteropodina nas amostras analisadas

O teor em porcentagem dos alcalóides totais nos extratos metanólicos do material vegetal *in vivo* e *in vitro* e calos analisado encontra-se na Tabela 5.3.

TABELA 5.3. Teor de alcalóides totais determinados nos extratos metanólicos relativos às análises em cromatografia líquida de alta eficiência. UFLA/IQ/URFJ Lavras- MG, 2004.

Amostra	Teor de alcalóides no extrato (%)	Desvio Padrão
Plântula de <i>U. tomentosa</i>	0,20	-
Plântula de <i>U. guianensis</i>	0,20	-
Calos de <i>U. tomentosa</i> aos 30 dias	0,00	-
Calos de <i>U. tomentosa</i> aos 60 dias	0,00	-
Calos de <i>U. tomentosa</i> aos 90 dias	0,00	-
Folha de planta matriz (24 meses) <i>U. tomentosa</i>	1,98	0,33
Folha de planta matriz (24 meses) <i>U. guianensis</i>	0,44	0,04
Cascas de sementes de <i>U. tomentosa</i>	0,33	0,05
Cascas de sementes de <i>U. guianensis</i>	0,01	0,03
Folhas de <i>U. guianensis</i> aclimatadas aos 30 dias	0,83	0,09
Folhas de <i>U. guianensis</i> aclimatadas aos 45 dias	1,22	0,22
Folhas de <i>U. tomentosa</i> aclimatadas aos 30 dias	1,63	0,21
Folhas de <i>U. tomentosa</i> aclimatadas aos 45 dias	2,58	0,34

3.2.5 Análise por CLAE dos alcalóides oxindólicos biomarcadores nas folhas das plantas-matrizes e cascas de sementes de *U. tomentosa* e *U. guianensis*

A análise cromatográfica dos extratos obtidos de folhas de plantas cultivadas no período de 24 meses em casa de vegetação de *Uncaria tomentosa* e *Uncaria guianensis* mostrou a presença de cinco alcalóides oxindólicos: especiofilina, mitrafilina, pteropodina, isomitrafilina e isopteropodina (Figuras 1B e 2B no anexo). O teor de alcalóides totais nas folhas de *Uncaria tomentosa*

nas plantas cultivadas em casa de vegetação por 24 meses foi calculado como a média aritmética dos teores de D₁ e D₃ (Tabela 4A no anexo) (o valor de D₂ foi desconsiderado por estar muito discrepante), sendo encontrado 1,98% (DP= 0,33) e, nas folhas de *Uncaria guianensis* obtidas nas mesmas condições, como a média aritmética dos teores das amostras encontrando-se 0,44% (DP= 0,05) (Tabela 5.3).

Nos extratos das cascas de sementes de *Uncaria tomentosa* foram encontrados cinco alcalóides: especiofilina, mitrafilina, pteropodina, isomitrafalina e isopteropodina (Figura 3B no anexo), sendo no entanto o teor de alcalóides totais calculados (a partir da média aritmética dos valores encontrados nas amostras) somente de 0,13% (DP= 0,03).

Os extratos das cascas de sementes de *Uncaria guianensis* não apresentaram os alcalóides biomarcadores (Figura 4B no anexo).

Embora os teores de alcalóides totais sejam baixos ou inexistentes nas cascas de sementes das duas espécies, pode-se observar nos cromatogramas obtidos, a presença de outras substâncias básicas não identificadas, com tempo de retenção menor que os dos alcalóides biomarcadores.

3.2.6 Análise por CLAE dos alcalóides oxindólicos biomarcadores nos calos originados de plântulas *in vivo*

Nos calos obtidos de segmentos foliares de plantas de casa de vegetação, cultivados em meio MS com 3% da sacarose e suplementado com 1,5 mg.L⁻¹ de Picloram em diferentes épocas de cultivo (30, 60 e 90 dias), não foi observado a presença dos alcalóides biomarcadores (anexo Figuras 5B, 6B, 7B), entretanto outras substâncias desconhecidas foram detectadas.

Kohda et al., (1996) trabalhando com cultura de calos de *Uncaria rhynchophylla* para produção de alcalóides indólicos, verificaram que o meio MS suplementado com de 1,0 mg. L⁻¹ de 2,4-D e 0,3 mg.L⁻¹ de BAP, originou elevada produção de biomassa seca de calos com produção insignificante de alcalóides, porém quando se utilizou o meio de cultivo Gamborg B5 (Gamborg, 1968) suplementado com 3,0 mg.L⁻¹ AIB e 0,1 mg.L⁻¹ BAP houve indução de calos e produção de alcalóides indólicos. Em contraste, Bonfill et al., (2002) induziram calogênese de *Panax ginseng* em meio MS suplementado com suplementado com 2,0 mg.L⁻¹ de ANA e obtiveram alta concentração de ginseng.

Diante da constatação da produção de metabólitos secundários em cultura de calos, sugerem-se novas pesquisas com adequação de metodologias para a otimização da produção de calos nas duas espécies de unha de gato.

3.2.7 Análise por CLAE dos alcalóides oxindólicos biomarcadores em plântulas *in vitro*

Nos extratos obtidos de plântulas de *Uncaria tomentosa* (Figura 8B no anexo) foram detectados cinco alcalóides (especiofilina, mitrafilina, pteropodina isomitrafalina e isopteropodina) enquanto que nos extratos das plântulas de *Uncaria guianensis* todos os alcalóides biomarcadores (especiofilina mitrafilina, uncarina F, pteropodina, isomitrafalina e isopteropodina) estavam presentes (Figura 9B). As duas amostras apresentaram o mesmo teor de percentual de alcalóides totais no extrato: 0,20% (Tabela 5.3).

Embora os teores encontrados sejam mais baixos que os geralmente detectados em folhas de plantas nativas (>1%) (Laus, G.; et al., 1997) as plântulas produzidas possuem um excelente potencial para produção desses

alcalóides, levando-se em conta que os teores mais elevados são encontrados em plantas adultas com mais de 10 anos de idade.

3.2.8 Análise por CLAE dos alcalóides oxindólicos a partir de folhas de plantas aclimatadas aos 30 e 45 dias

A análise por CLAE demonstrou que os extratos metanólicos obtidos de plantas aclimatadas aos 30 dias de *Uncaria guianensis* apresentaram quatro alcalóides: especiofilina, mitrafilina, pteropodina e isopteropodina, com predominância acentuada dos dois últimos e, aos 45 dias percebeu-se a presença de cinco alcalóides (especiofilina, mitrafilina, pteropodina, isomitrafalina e isopteropodina) (anexo Figuras 10B e 11B). Os teores de alcalóides totais foram 0,83% (DP= 0,09) e 1,22% (DP=0,22) aos 30 e 45 dias de aclimação respectivamente. Na espécie *Uncaria tomentosa* aos 30 mostrou a presença de cinco alcalóides (especiofilina, mitrafilina, pteropodina, isomitrafalina e isopteropodina) e aos 45 dias de aclimatização, observou-se a presença de quatro alcalóides: especiofilina, mitrafilina, pteropodina e isopteropodina, com predominância acentuada dos dois últimos (anexo Figuras 12B e 13B) com teores de alcalóides totais de 1,63% (DP =0,21) e 2,58% (DP =0,34) respectivamente.

A composição qualitativa e quantitativa das amostras estudadas de *Uncaria tomentosa* e *Uncaria guianensis* mostrou mudanças acentuadas durante as fases de crescimento das plantas de unha de gato

Na Figura 5.6 são identificados os materiais vegetais utilizados neste trabalho.

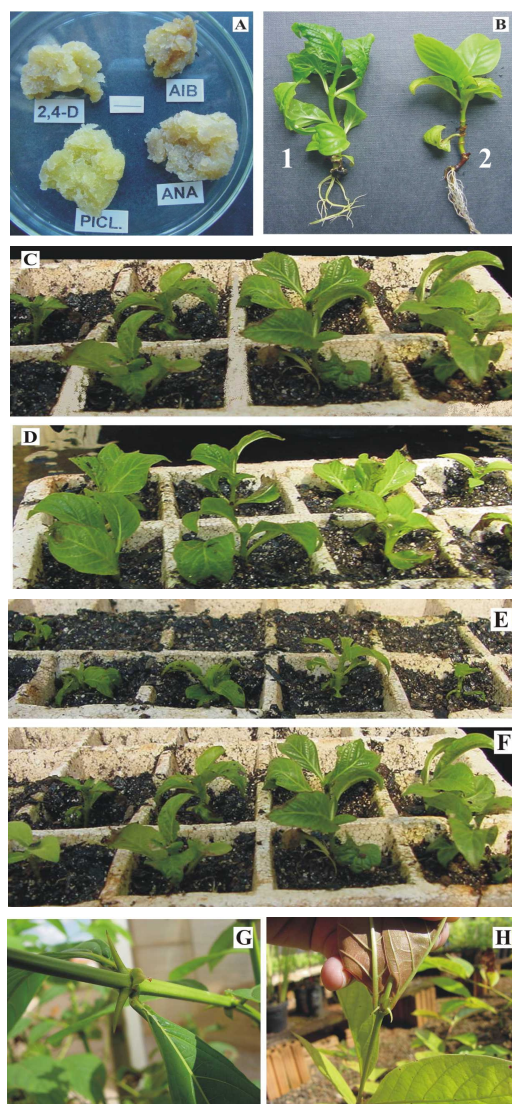


FIGURA 5.6. Material vegetal utilizado para extração de alcalóides em CCD e CLAE. (A) = Calos; (B) 1 = plântula de *Uncaria guianensis*, 2 = plântula de *Uncaria tomentosa*; (C) = plantas de *Uncaria guianensis* aclimatadas aos 30 dias; (D) = plantas de *Uncaria guianensis* aclimatadas aos 45 dias; (E) = plantas de *Uncaria tomentosa* aclimatadas aos 30 dias; (F) = plantas de *Uncaria tomentosa* aclimatadas aos 45 dias; (G) = planta matriz de *Uncaria tomentosa* com 24 meses; (H) planta matriz de *Uncaria guianensis* com 24 meses.

4 CONCLUSÕES

A análise qualitativa do material vegetal de *Uncaria tomentosa* e *Uncaria guianensis* por Cromatografia Líquida Alta Eficiência (CLAE) mostrou que as plantas micropropagadas produzem os mesmos alcalóides oxindólicos biomarcadores da planta matriz.

A análise quantitativa por CLAE permitiu observar que o teor de alcalóides nas amostras analisadas é, de um modo geral, menor para as amostras de UG que para amostras de UT, o que está coerente com resultados relatados na literatura (Sandoval, 2002; Vilches, 1997).

Essa análise indicou também que os melhores teores percentuais de alcalóides ocorreram em plântulas cultivadas *in vitro* e aclimatadas aos 45 dias para ambas as espécies estudadas, com 2,58% para *Uncaria tomentosa* e 1,22 % para *Uncaria guianensis*

Em plântulas de *Uncaria guianensis* foram identificados todos os seis alcalóides oxindólicos biomarcadores: Especiofilina, Mitrafilina, Uncarina F, Pteropodina, Isomitrafilina e Isopteropodina, enquanto que em *Uncaria tomentosa* o alcalóide Uncarina F (geralmente minoritário ou inexistente no conjunto de amostras) não foi encontrado. As duas amostras apresentaram o mesmo teor de percentual de alcalóides totais no extrato: 0,20% .

Embora os teores encontrados sejam mais baixos que os geralmente detectados em folhas de plantas nativas (>1%) as plântulas produzidas *in vitro* possuem um excelente potencial para produção desses alcalóides, levando-se em conta que os teores mais elevados são encontrados em plantas adultas com mais de 10 anos de idade. Assim, pelo uso de bioreatores, e em 30 a 40 dias, poder-se-ia produzir uma quantidade suficiente de material vegetal para processamento

Não houve produção de alcalóides a partir de calos induzidos de explantes obtidos *in vivo* e *in vitro* no meio de cultivo MS suplementado com diferentes auxinas tanto para *Uncaria guianensis* como para *Uncaria tomentosa*, indicando que novos experimentos devem ser realizados.

A produção de plantas de unha de gato através de cultura de tecido poderá ser uma alternativa viável para a preservação das espécies bem como o cultivo comercial das folhas poderá ser uma alternativa para a indústria farmacêutica de forma eficiente e rápida sem comprometer a extinção das espécies.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, F. F.; BEZERRA, G. M.; ALMEIDA, M. B. S.; SIANI, A.C.; BENEVIDES, P. J. C., MAZZEI, J. L. ; D'ÁVILLA, L. A.; VALENTE, L. M. M.; Desenvolvimento e aplicação de metodologia por CCD na determinação do perfil de alcalóides oxindólicos em espécie do gênero *Uncaria*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 27.; CONGRESSO LATINO AMERICANO DE QUÍMICA, 26., 2004, Salvador. **Anais...** Salvador: [s. n.], 2004 .

BEZERRA, G. M.; SIANI, A. C.; BENEVIDES, P. J. C.; MAZZEI, J. L.; ROSARIO, S. L.; EMMERICK, I. C. M.; CARVALHAES, S. F.; D'ÁVILLA, L. A.; VALENTE, L. M. M.; Desenvolvimento de metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência para doseamento de alcalóides oxindólicos em espécies brasileiras do gênero *Uncaria*. In: CONGRESSO IBERO-AMERICANO DE PLANTAS MEDICINAIS, Angra dos Reis, 2004. **Anais...** Angra dos Reis: [s. n.], 2004.

BONFILL, M.; CUSIÓ, R. M.; PALAZON, J.; PIÑOL, MORALES, C.; Influence of auxins on organogenesis and ginsenoside production in *Panax ginseng* calluses. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 68, p.73-78, 2002.

BROWN JÚNIOR, K, S. Engenharia ecológica: perspectivas de seleção e manejo de plantas medicinais. **Acta Amazônica**, v. 18, n.1-2, p. 291-303, 1988.

DI STASI, L. C. **Plantas Mediciniais: arte e ciência**. um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: Universidade Estadual Paulista, 1996. 230 p.

GAMBOG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v.50, p-151-158, 1968.

GANZERA , M.; MUHAMMAD, I.; KHAN, R. A., KHAN, I. A. Improved method for the determination of oxindole alkaloids in *Uncaria tomentosa* by high performance liquid chromatography. **Planta Medica**, v. 67, p. 447-450, 2001.

GONZALEZ ORTEGA, G. **Trockenextrakte aus Passionsblumenkraut. Herstellung, Standartisierung, Wirkungsnachweis.** 1993. Tese (Doutorado em Ciências naturais) - Fakultat für Chemie und Pharmazie, Eberhard-Karls Universität, Tübingen.

JONES, K. **Cat's Claw, healing vine of Peru.** Sylvan Press, Seattle. 1995.

KHANAM, N.; KHOO, C.; KHAN, A.G. Effect of cytokinin combinations on organogenesis, shoot regeneration and tropane alkaloid production in *Duboisia myoropoides*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 62, p. 125-133, 2000.

KOHDA, H.; NAMERA, A.; KOYAMA, A.; YAMASAKI, K.; TANI, T.; Indole alkaloid production in callus cultures of *Uncaria rhyncophylla* Chem. **Pharm. Bull.**, v. 44, n. 2, p. 352-357, 1996.

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.).** 1997. 88 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

LAUS, G.; BRÖSSNER, D.; KEPLINGER, K. Alkaloids of peruvian *Uncaria tomentosa*. **Phytochemistry**, v.45, 853-860, 1997.]

MANN, J. **Secondary metabolism.** 2. ed. Oxford: Oxford Science, 1987. 374 p.

MATOS, F.J. A.; SOUSA, M. P.; OLIVEIRA, M. E.; MACHADO, M. I. L.; CRAVEIRO, A. A. **Constituintes químicos ativos e propriedades biológicas de plantas medicinais brasileiras.** Fortaleza: UFC, 2004. 448 p.

MAZZEI, J. L.; ROSARIO, S. L.; SILVA, R. S.; SIANI, A. C.; VALENTE, L. M. M.; D'AVILA, L. A.; Scale-up of Isolation of Oxindole Alkaloids from *Uncaria tomentosa* by HPLC using Chromatographic Model. **Revista de Fitoterapia**, v.2, p. 289, 2002.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-493, 1962.

OBREGON VILCHES, L. E. O. **Uña de gato** - *Cat's claw*. 3^a ed. Instituto de Fitoterapia Americano, Lima, 1997.

QUIROZ, J. de D. Z. et. al. Nuevos aspectos en el estudio agronómico y fitoquímico de las dos especies peruanas Del género *Uncaria*: *Uncaria tomentosa* (Willd) DC. Y la *Uncaria guianensis* (Aubl.) Gmel Una de Gato. Disponível em: <<http://www.agroselva.com>>. Acesso em: 20 mar. 2004

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 906 p.

REHWARLD, A.; MEIER, B.; STICHER, O. Qualitative and Quantitative reversed- phase high- performance liquid chromatography of flavonoides in *Crataegus* leaves and flowers. **Journal of Chromatography**, n. 69, p. 23- 25, 1994.

SANDOVAL, M.; OKUHAMA, N. N., ZHANG, X-J; CONDEZO, L. A., LAO, J.; ANGELES, F.M.; MUSAH, R.A.; BOBROWSKI, P.; MILLER, M.J.S. Anti-inflammatory and antioxidant activities of cat's claw (*Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis*) are independent of their alkaloid content. **Phytomedicine**, v.9, 325-337, 2002

TABATA, M.; YAMAMOTO, H.; HIRAOKA, N.; MATSUMOTO, Y.; KONOSHIMA, M. Regulation of nicotine production in tobacco tissue culture by plant growth regulators. **Phytochemistry**, Oxford, v.10, n.3, p.723-729, Mar. 1971.

ANEXOS

ANEXO A	Pag.
TABELA 1A. Discriminação do material vegetal de <i>Uncaria tomentosa</i> (UT) e <i>Uncaria guianensis</i> (UG) utilizado para análise de cromatografia de camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). UFLA/IQ/UFRJ, Lavras-MG, 2004.	170
TABELA 2A. Massa dos extratos metanólicos e extratos semi-purificados de (μg) calos cultivados de materiais <i>in vitro</i> , <i>in vivo</i> e plântulas de <i>Uncaria tomentosa</i> e <i>Uncaria guianensis</i> para análise em CCD UFLA/IQ/UFRJ, Lavras-MG, 2004.	171
TABELA 3A. Rendimentos das frações enriquecidas com alcalóides para análise em CLAE UFLA/IQ/URFJ. Lavras, MG, 2004.	172
TABELA 4A. Dados das massas e teores de alcalóides totais presentes em extratos metanólicos relativos às análises em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). UFLA/IQ/URFJ. Lavras- MG, 2004.	173

ANEXO B	Pág.
FIGURA 1B. Cromatograma em CLAE da amostra de folhas de planta matriz de <i>Uncaria tomentosa</i> (24 meses). SP = especiofilina; MIT = mitrafilina;PT = pteropodina; IMIT = isomitrafilina; IPT = isopteropodina. UFLA/IQ/UFRJ, Lavras-MG, 2004. ...	174
FIGURA 2B. Cromatograma em CLAE das amostras de cascas de sementes de <i>Uncaria tomentosa</i> . ESP = especiofilina; MIT = mitrafilina; PT = pteropodina; IPT = isopteropodina. UFLA/IQ/UFRJ, Lavras-MG, 2004.	175
FIGURA 3B. Cromatograma em CLAE das amostras de folhas de plantas (24 meses) de <i>Uncaria guianensis</i> . ESP = especiofilina; MIT = mitrafilina; PT = pteropodina; IMIT = isomitrafilina; IPT = isopteropodina. UFLA/IQ/UFRJ, Lavras-MG, 2004.	176
FIGURA 4B. Cromatograma em CLAE da amostra de cascas de sementes de <i>Uncaria guianensis</i> . UFLA/IQ/UFRJ, Lavras-MG, 2004. .	177
FIGURA 5B. Cromatograma em CLAE da amostra de calos aos 30 dias induzidos a partir de segmentos foliares de plantas cultivadas <i>in vivo</i> de <i>Uncaria tomentosa</i> . UFLA/IQ/UFRJ, Lavras-MG, 2004.	178
FIGURA 6B. Cromatograma em CLAE da amostra de calos aos 60 dias induzidos a partir de segmentos foliares de plantas cultivadas <i>in vivo</i> de <i>Uncaria tomentosa</i> . UFLA/IQ/UFRJ, Lavras-MG, 2004.	179
FIGURA 7B. Cromatograma em CLAE da amostra de calos aos 90 dias induzidos a partir de segmentos foliares de plantas cultivadas <i>in vivo</i> de <i>Uncaria tomentosa</i> . UFLA/IQ/UFRJ, Lavras-MG, 2004.	180
FIGURA 8B. Cromatograma em CLAE da amostra da plântula de <i>Uncaria tomentosa</i> . ESP = especiofilina; MIT = mitrafilina; PT = pteropodina; IMIT = isomitrafilina; IPT = isopteropodina. UFLA/IQ/UFRJ, Lavras-MG, 2004.	181

- FIGURA 9B.** Cromatograma em CLAE da amostra da plântula de *U.guianensis*. ESP = especiofilina; MIT = mitrafilina; UNCF= uncarina F; PT= pteropodina; IMIT = isomitrafilina; IPT = isopteropodina. UFLA/IQ/UFRJ, Lavras-MG, 2004. ... **182**
- FIGURA 10B.** Cromatograma em CLAE da amostra de folhas de plantas de *Uncaria guianensis* aos 30 dias de aclimação. ESP= especiofilina; PT = pteropodina; MIT= mitrafilina; IPT = isopteropodina. UFLA/IQ/UFRJ, Lavras-MG, 2004. **183**
- FIGURA 11B.** Cromatograma em CLAE da amostra de folhas de plantas de *Uncaria guianensis* aos 45 dias de aclimação. ESP = especiofilina; MIT = mitrafilina; PT = pteropodina; IMIT = isomitrafilina; IPT = isopteropodina. UFLA/IQ/UFRJ, Lavras-MG, 2004. **184**
- FIGURA 12B.** Cromatograma em CLAE da amostra de folhas de plantas de *Uncaria tomentosa* aos 30 dias de aclimatização. ESP = especiofilina; MIT = mitrafilina; PT = pteropodina; IMIT = isomitrafilina; IPT = isopteropodina. UFLA/IQ/UFRJ, Lavras-MG, 2004. **185**
- FIGURA 13B.** Cromatograma da amostra de folhas de plantas de *Uncaria tomentosa* aos 45 dias de aclimação. ESP = especiofilina; MIT = mitrafilina; PT = pteropodina; IPT = isopteropodina. UFLA/IQ/UFRJ, Lavras-MG, 2004. **186**

TABELA 1A. Discriminação do material vegetal de *Uncaria tomentosa* (UT) e *Uncaria guianensis* (UG) utilizado para análise de cromatografia de camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). UFLA/IQ/UFRJ, Lavras-MG, 2004.

Amostra	Descriminação dos tratamentos	Tipo de análise
a	Calos originados de plântulas de UT sem auxina	CCD
b	Calos originados de plântulas de UG sem auxina	CCD
c	Calos originados de plântulas de UT com auxina	CCD
UT	Plântula de UT no tubo de ensaio	CCD / CLAE
UG	Plântula de UG no tubo de ensaio	CCD / CLAE
A	Calos com 30 dias UT (plantas <i>in vivo</i>)	CCD / CLAE
B	Calos com 60 dias UT (plantas <i>in vivo</i>)	CCD / CLAE
C	Calos com 90 dias UT (plantas <i>in vivo</i>)	CCD / CLAE
D	Folha da planta matriz UT aos 24 meses	CLAE
E	Cascas de sementes de UT com 12 meses	CLAE
F	Folha da planta matriz de UG aos 24 meses	CLAE
G	Cascas de sementes de UG com 12 meses	CLAE
H	Folhas de plantas de UG aos 30 dias de aclimatação	CLAE
I	Folhas de plantas de UG aos 45 dias de aclimatação	CLAE
J	Folhas de plantas de UT aos 30 dias de aclimatação	CLAE
L	Folhas de plantas de UT aos 45 dias de aclimatação	CLAE

TABELA 2A. Massa dos extratos metanólicos e extratos semi-purificados de (μg) calos cultivados de materiais *in vitro*, *in vivo* e plântulas de *Uncaria tomentosa* e *Uncaria guianensis* para análise em CCD UFLA/IQ/UFRJ, Lavras-MG, 2004.

Discriminação das Amostras	Massa do extrato (mg)	Massa extrato semi-purificado (μg)
Calos plântulas de UT sem auxina	15,63	156,3
Calos de plântulas de UG sem auxina	16,11	161,1
Picloram (5 dias)	19,81	198,1
ANA (5 dias)	20,92	209,2
2, 4,D (5 dias)	27,05	270,5
AIB (5 dias)	23,82	238,2
Picloram (20 dias)	18,77	187,7
ANA (20 dias)	21,50	215,0
2,4,D (20 dias)	23,91	239,1
AIB (20 dias)	27,31	273,1
Picloram (35 dias)	20,51	205,1
ANA (35 dias)	25,36	253,6
2, 4,D (35 dias)	20,10	201,0
AIB (35 dias)	21,80	218,0
Plântula de UT no tubo de ensaio	31,80	318,0
Plântula de UG no tubo de ensaio	62,90	629,0
Calos com 30 dias UT (plantas <i>in vivo</i>)	33,92	339,2
Calos com 60 dias UT (plantas <i>in vivo</i>)	15,92	159,2
Calos com 90 dias UT (plantas. <i>in vivo</i>)	19,70	197,0

TABELA 3A. Rendimentos das frações enriquecidas com alcalóides para análise em CLAE UFLA/IQ/URFJ. Lavras, MG, 2004

Amostra	Massa da planta (mg)	Massa do extrato Metanólico bruto (mg)	Volume em metanol (mL)	Massa da fração alcaloídica (mg)
UT	67,2	31,80	6,36	4,700
UG	997,0	62,90	12,58	3,900
A	1048	27,80	5,56	2,100
A1	1002	28,30	5,66	2,600
A2	1045	31,90	6,38	4,700
B	1010	37,00	7,40	3,700
B1	732,0	31,50	6,30	4,100
B2	720,0	31,60	6,32	4,400
C1	1004	22,60	4,52	4,000
C2	1001	24,40	4,88	4,700
C3	1005	27,90	5,58	4,500
D1	1000	26,80	5,36	3,100
D2	1007	27,80	5,56	4,300
D3	1003	30,50	6,10	3,800
E1	1008	26,80	5,36	2,700
E2	1009	26,00	5,20	1,300
E3	1000	23,90	4,78	1,800
F1	1000	32,60	6,52	2,300
F2	1000	28,00	5,60	2,000
F3	1004	25,40	5,08	2,000
G1	81,20	16,40	3,28	1,100
G2	82,20	9,200	1,84	1,500
G3	82,40	11,80	2,36	1,700
H1	54,50	17,30	3,46	1,700
H2	52,40	22,00	4,40	1,600
H3	51,60	21,80	4,36	1,300
I1	247,3	26,50	5,30	7,000
I2	226,2	25,80	5,16	5,200
I3	367,2	28,20	5,64	6,800
J1	502,5	23,20	4,64	3,600
J2	500,9	22,20	4,44	4,000
J3	502,1	40,80	8,16	4,500
L1	111,0	35,70	7,14	11,90
L2	114,4	46,90	9,38	15,10
L3	125,2	40,80	8,16	12,90

UT = plântulas de *U.tomentosa*; UG= plântulas de *U.guianensis*; A= calos *in vivo* 30 dias; B= calos *in vivo* 60 dias; C= calos *in vivo* 90 dias; D= folha de planta matriz de UT; E= cascas de sementes de UT; F= folha de planta matriz de UG; G= cascas de sementes de UG; H= folhas de planta de UG aos 30 dias de aclimatização; I= folhas de planta de UG aos 45 dias de aclimatização; J= folhas de planta de UT aos 30 dias de aclimatização; L= folhas de planta de UT aos 45 dias de aclimatização.

TABELA 4A. Dados das massas e teores de alcalóides totais presentes em extratos metanólicos relativos às análises em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). UFLA/IQ/URFJ. Lavras- MG, 2004.

Amostra	Conc. da amostra (µg/mL)	Alcalóides totais na amostra injetada (µg/mL)	Alcalóides na amostra injetada (%)	Massa de alcalóides na fração alcaloídica (mg)	Teor de alcalóides no extrato (%)
Plantula					
UT	470,0	6,40	1,36	0,064	0,20
UG	390,0	12,8	3,28	0,128	0,20
Calos					
30dias	420,0	0	0,00	0	0,00
30 dias	520,0	0	0,00	0	0,00
30 dias	470,0	0	0,00	0	0,00
60 dias	370,0	0	0,00	0	0,00
60 dias	410,0	0	0,00	0	0,00
60 dias	440,0	0	0,00	0	0,00
90 dias	400,0	0	0,00	0	0,00
90 dias	470,0	0,60	0,13	0,006	0,02
90 dias	450,0	0	0,00	0	0,00
F. matriz					
UT	310,0	59,3	19,1	0,593	2,21
UT	430,0	10,0	2,33	0,100	0,36
UT	380,0	53,2	14,0	0,532	1,74
UG	460,0	25,7	5,59	0,129	0,39
UG	400,0	27,5	6,88	0,138	0,49
UG	400,0	23,0	5,75	0,115	0,45
Casca sem.					
UT	540,0	8,50	1,57	0,043	0,16
UT	260,0	0	0,00	0	0,00
UT	360,0	4,90	1,36	0,025	0,10
UG	220,0	0,00	0	0,00	0,00
UG	300,0	0,80	0,27	0,004	0,04
UG	340,0	0	0,00	0	0,00
Planta 30 dias					
UG	340,0	31,0	9,12	0,155	0,90
UG	320,0	33,6	10,5	0,168	0,76
UG	260,0	110	42,4	0,551	2,53
UT	360,0	60,6	16,8	0,606	1,88
UT	400,0	35,1	8,78	0,351	1,51
UT	450,0	33,6	7,47	0,336	1,51
Planta 45 dias					
UG	00,0	74,0	10,6	0,740	2,79
UG	520,0	35,6	6,85	0,356	1,38
UG	680,0	30,0	4,41	0,300	1,06
UT	476,0	40,2	8,45	1,005	2,82
UT	604,0	34,3	5,68	0,858	1,83
UT	516,0	38,0	7,36	0,950	2,33

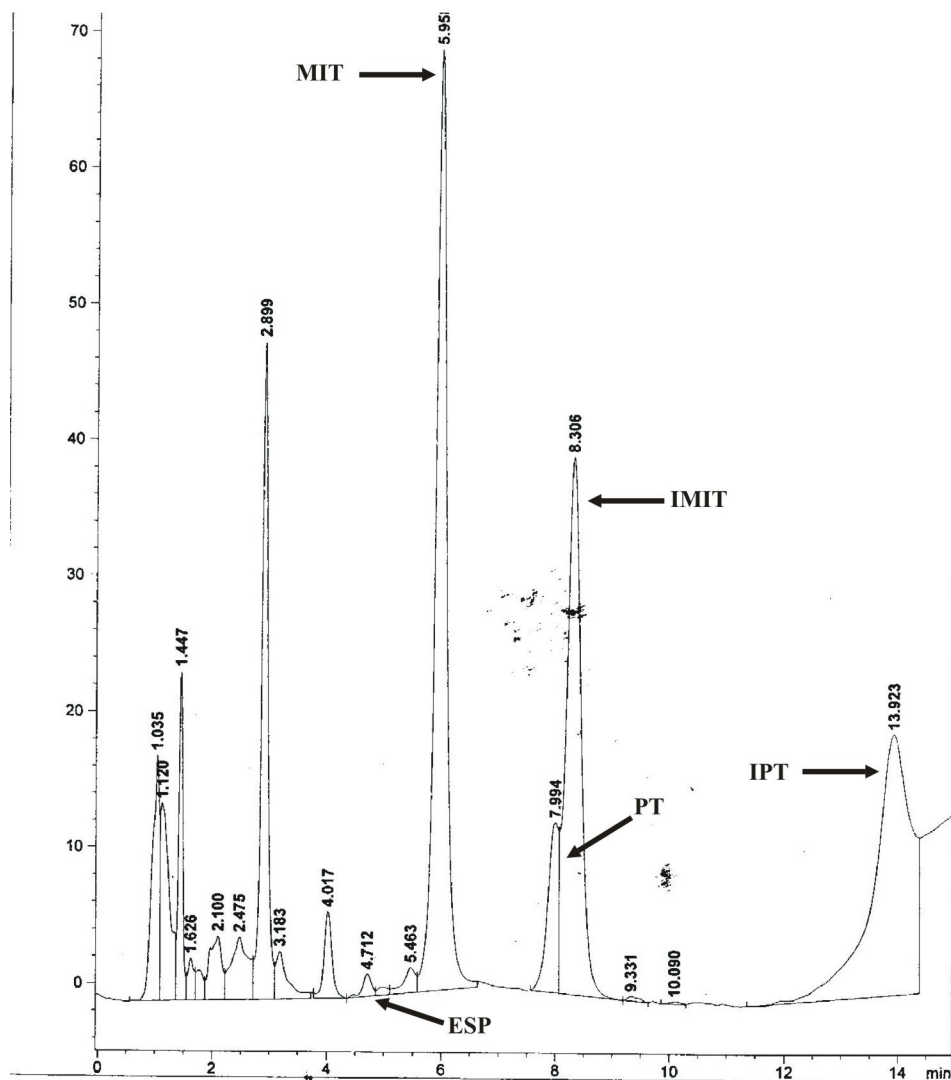


FIGURA 1B. Cromatograma em CLAE da amostra de folhas de planta matriz de *Uncaria tomentosa* (24 meses). SP = especiofilina; MIT = mitrafilina; PT = pteropodina; IMIT = isomitrafilina; IPT = isopteropodina. UFLA/IQ/UFRJ, Lavras-MG, 2004.

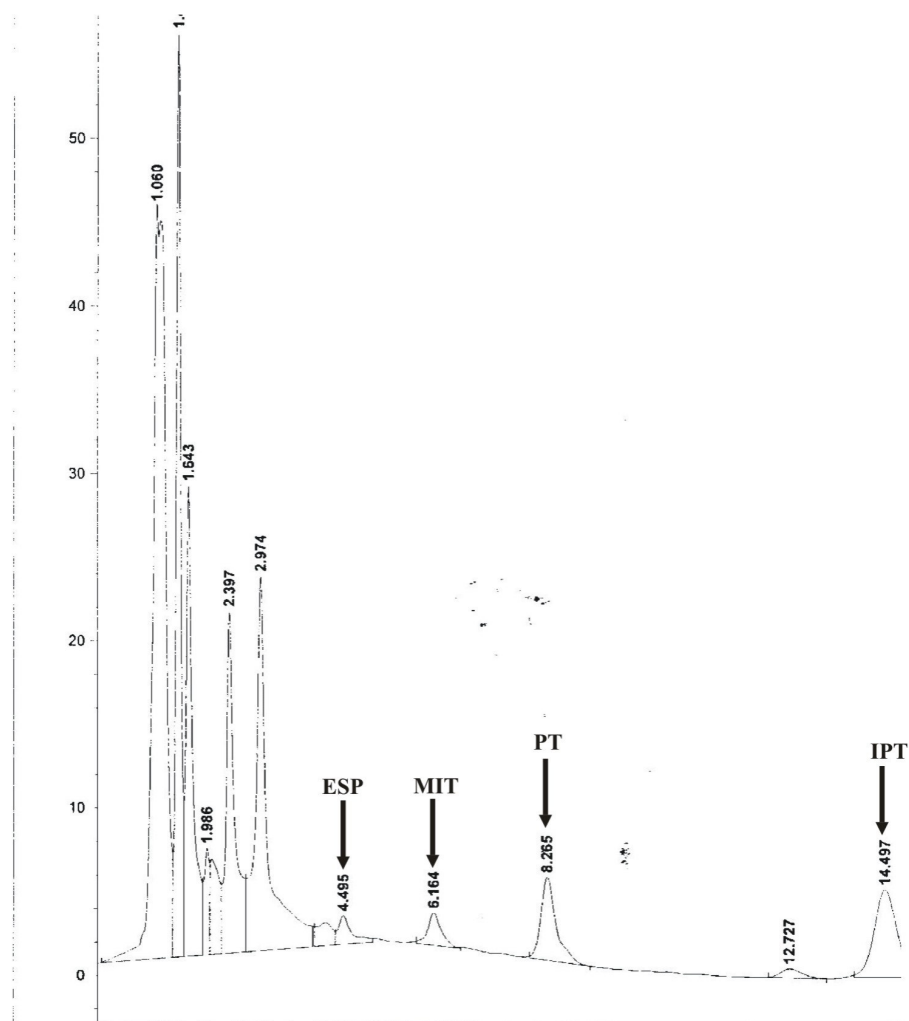


FIGURA 2B. Cromatograma em CLAE das amostras de cascas de sementes de *Uncaria tomentosa*. ESP = especiofilina; MIT = mitrafilina; PT = pteropodina; IPT = isopteropodina. UFLA/IQ/UFRJ, Lavras-MG, 2004.

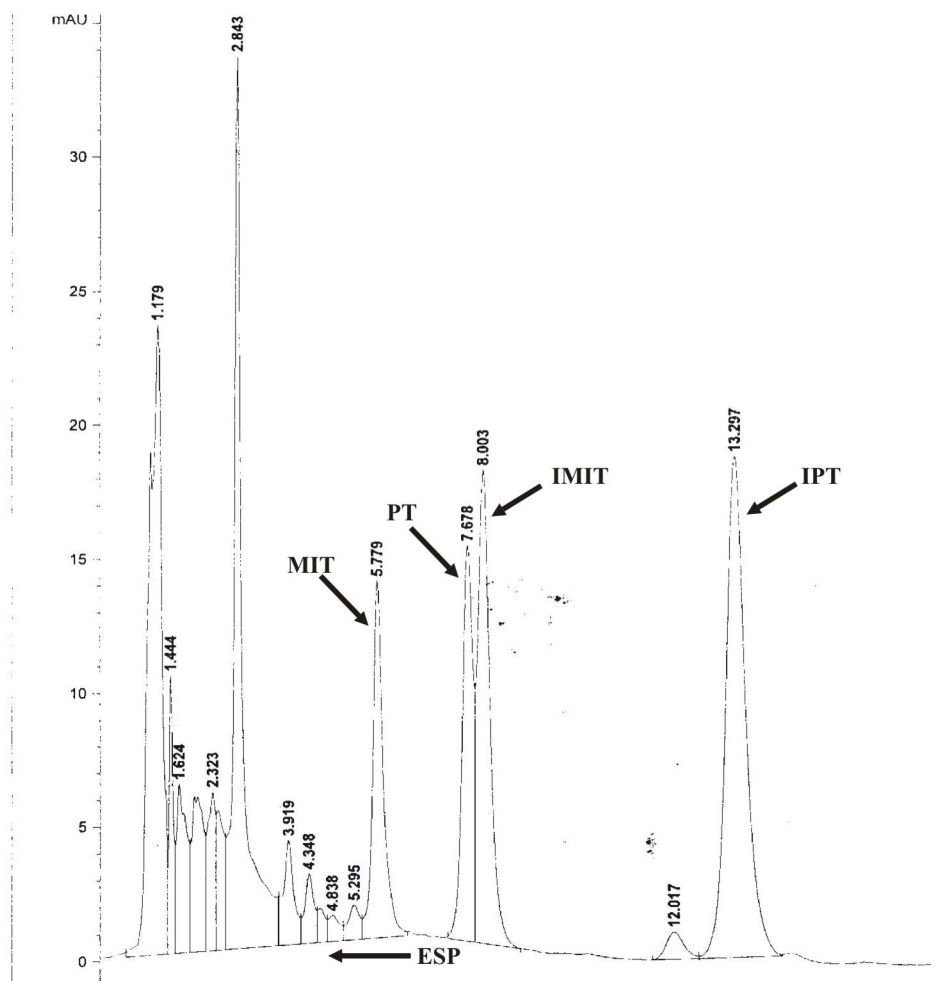


FIGURA 3B. Cromatograma em CLAE das amostras de folhas de plantas (24 meses) de *Uncaria guianensis*. ESP = especiofilina; MIT = mitrafilina; PT = pteropodina; IMIT = isomitrafilina; IPT = isopteropodina. UFLA/IQ/UFRJ, Lavras-MG, 2004.

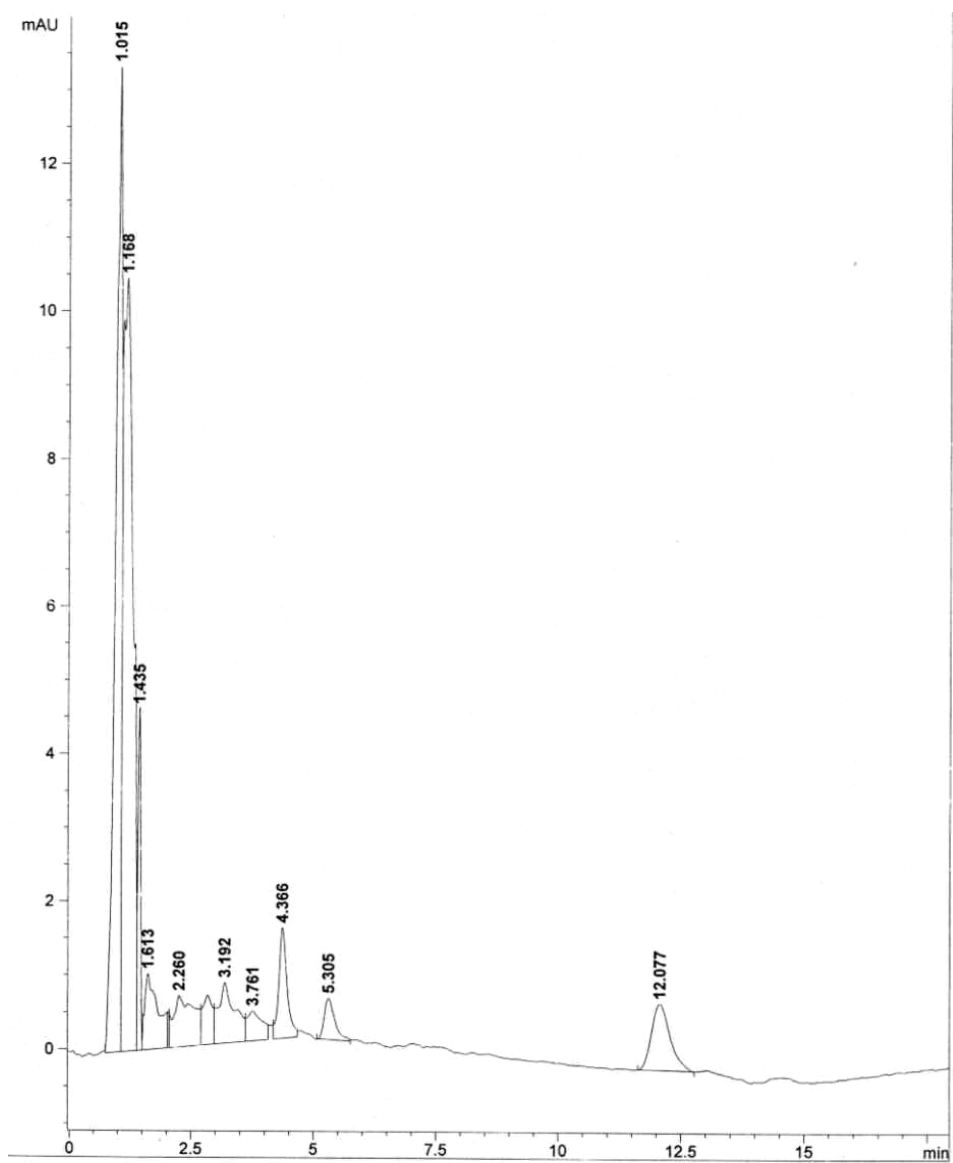


FIGURA 4B. Cromatograma em CLAE da amostra de cascas de sementes de *Uncaria guianensis*. UFLA/IQ/UFRJ, Lavras-MG, 2004.

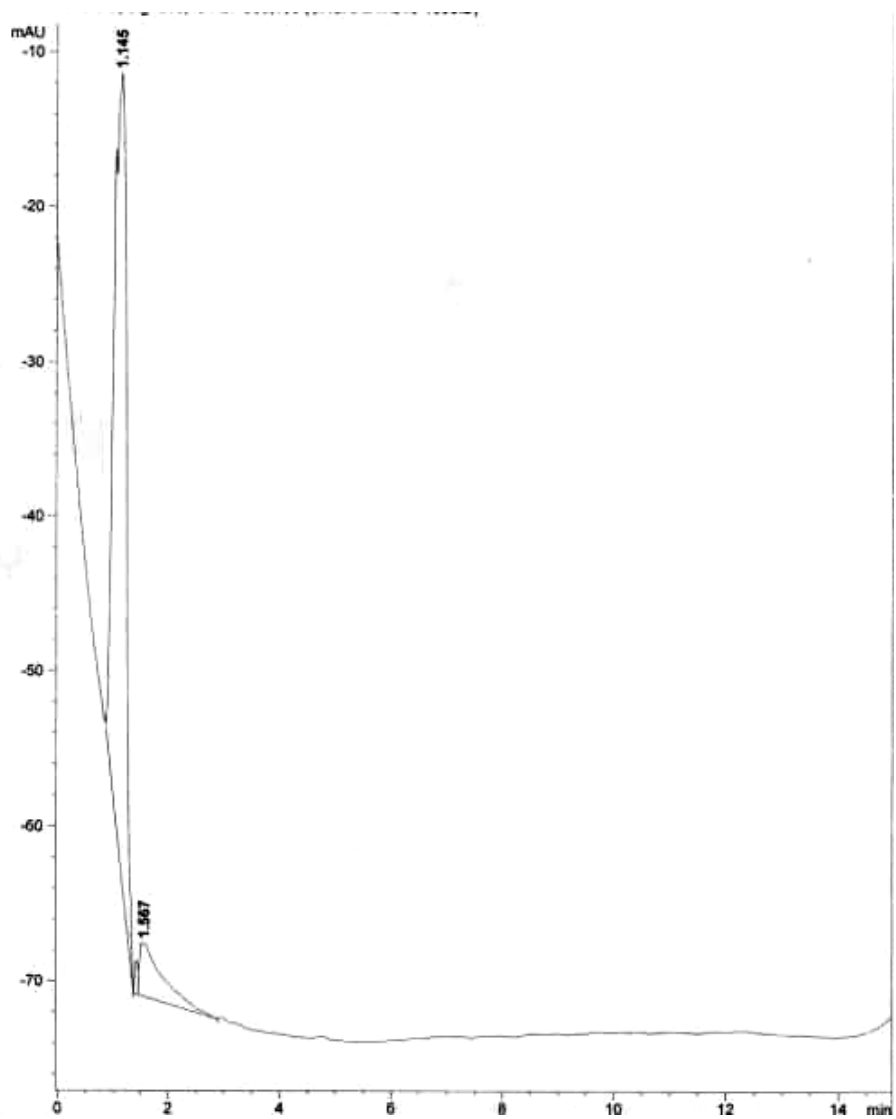


FIGURA 5B. Cromatograma em CLAE da amostra de calos aos 30 dias induzidos a partir de segmentos foliares de plantas cultivadas *in vivo* de *Uncaria tomentosa*. UFLA/IQ/UFRJ, Lavras-MG, 2004.

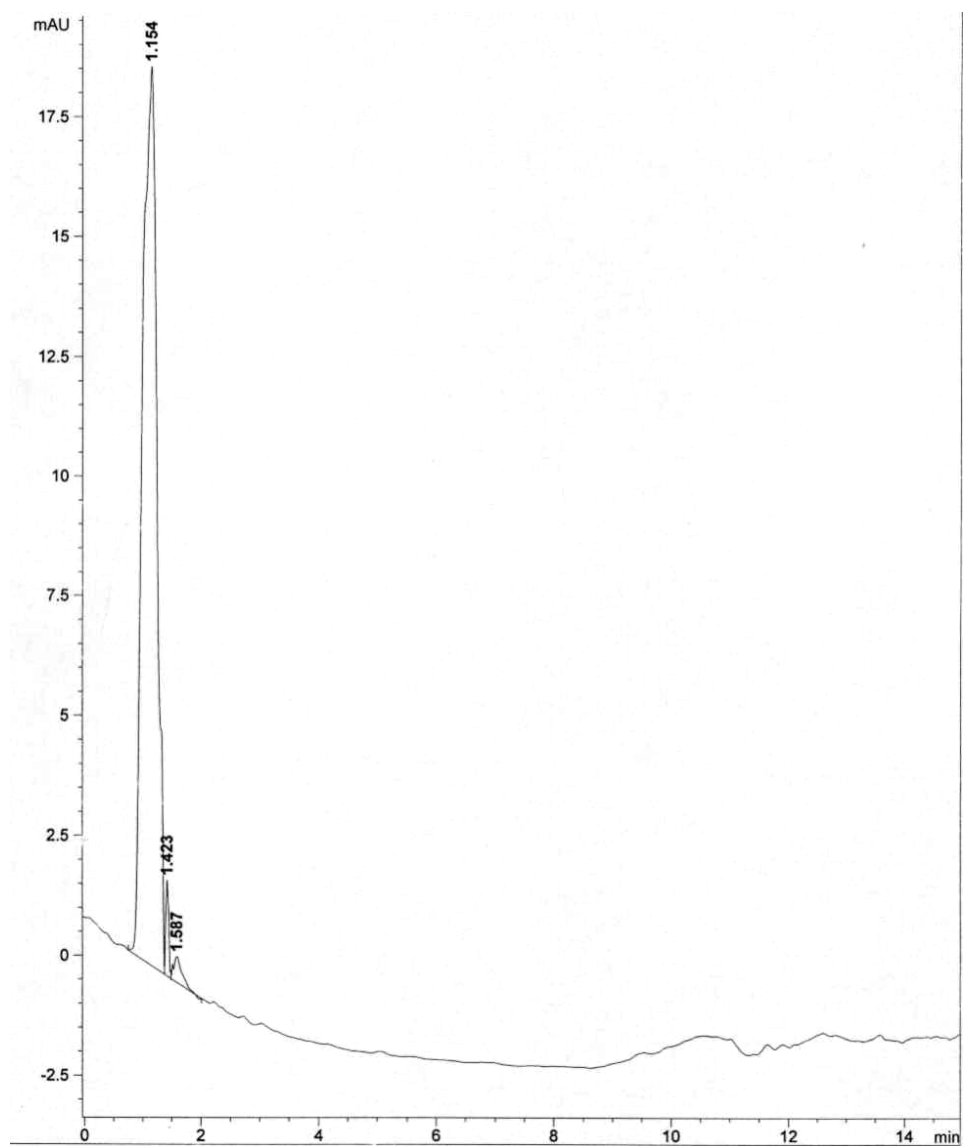


FIGURA 6B. Cromatograma em CLAE da amostra de calos aos 60 dias induzidos a partir de segmentos foliares de plantas cultivadas *in vivo* de *Uncaria tomentosa*. UFLA/IQ/UFRJ, Lavras-MG, 2004.

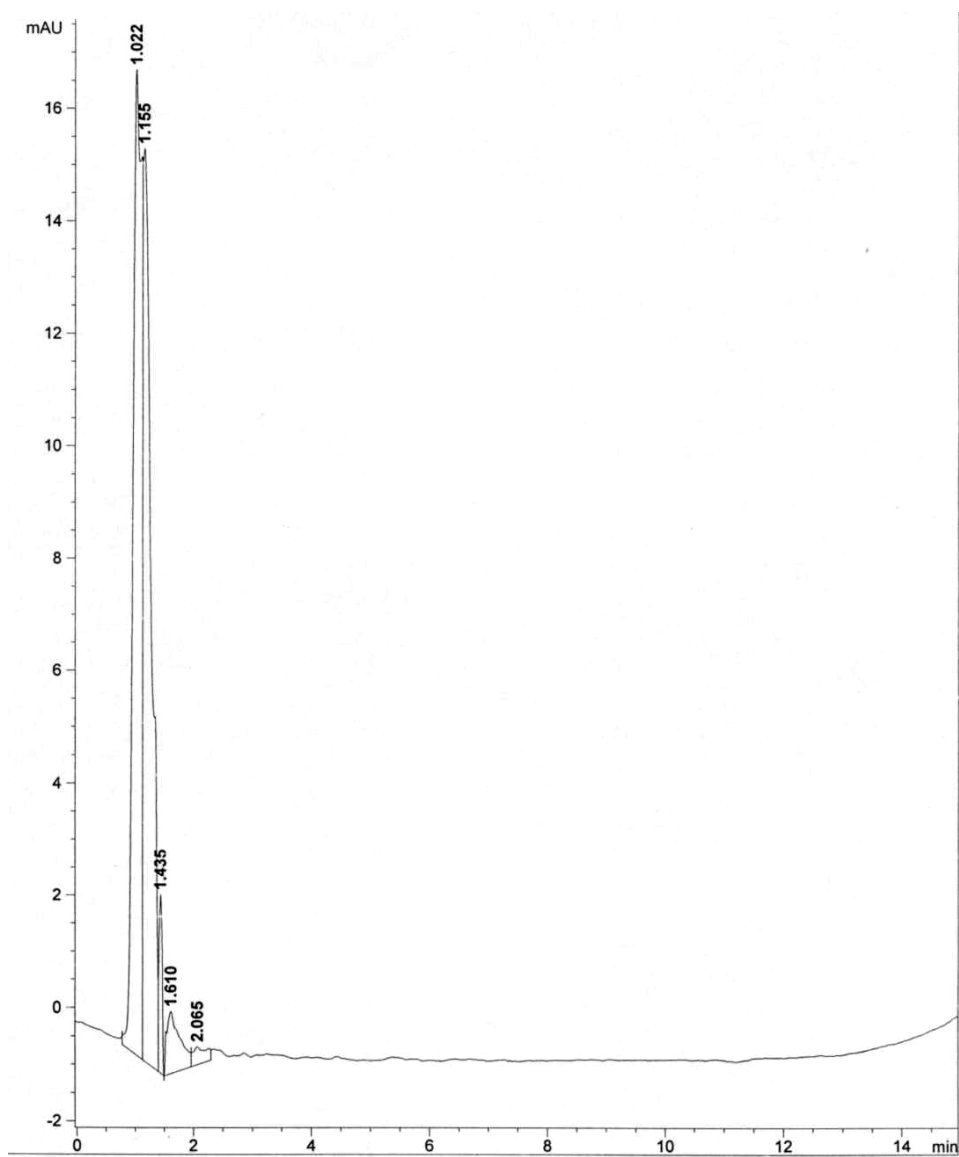


FIGURA 7B. Cromatograma em CLAE da amostra de calos aos 90 dias induzidos a partir de segmentos foliares de plantas cultivadas *in vivo* de *Uncaria tomentosa*. UFLA/IQ/UFRJ, Lavras-MG, 2004.

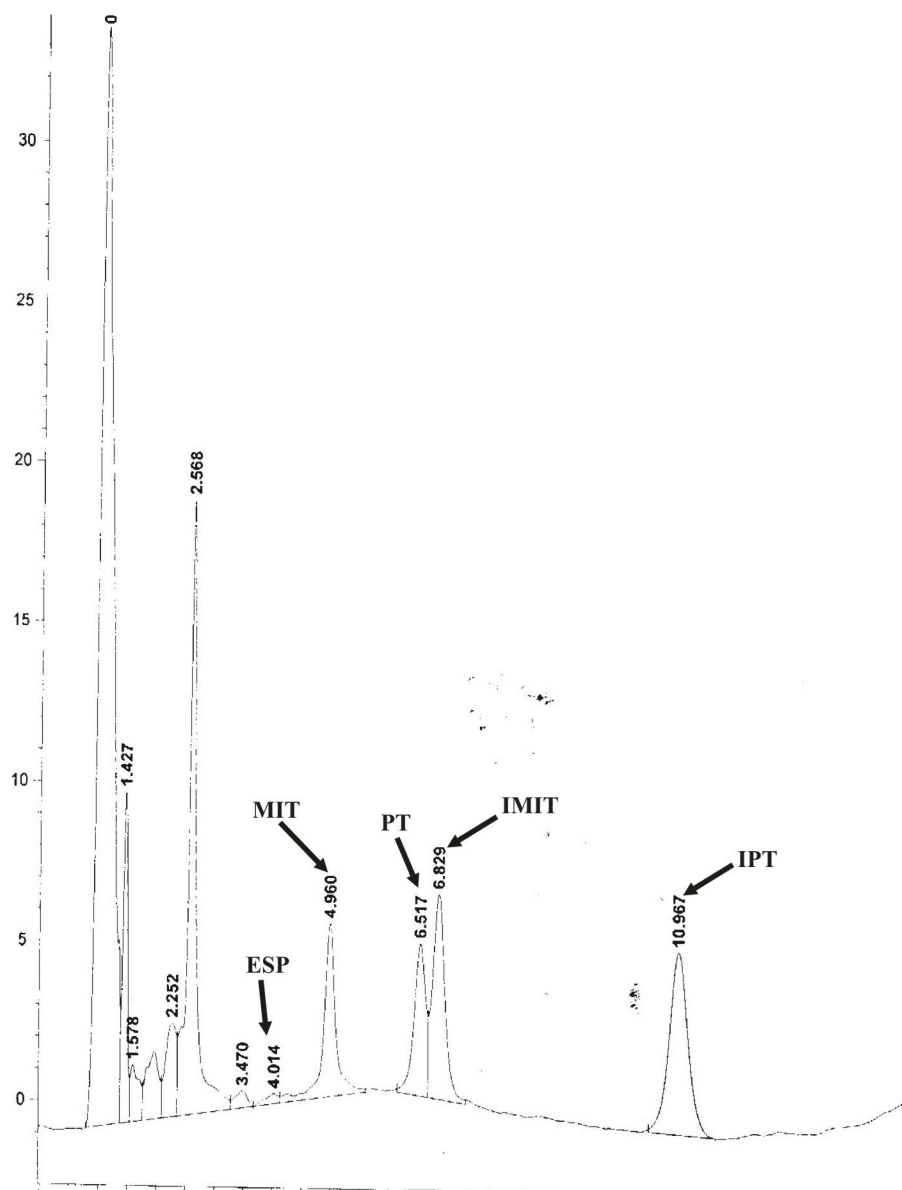


FIGURA 8B. Cromatograma em CLAE da amostra da plântula de *Uncaria tomentosa*. ESP = especiofilina; MIT = mitrafilina; PT = pteropodina; IMIT = isomitrafilina; IPT = isopteropodina. UFLA/IQ/UFRJ, Lavras-MG, 2004.

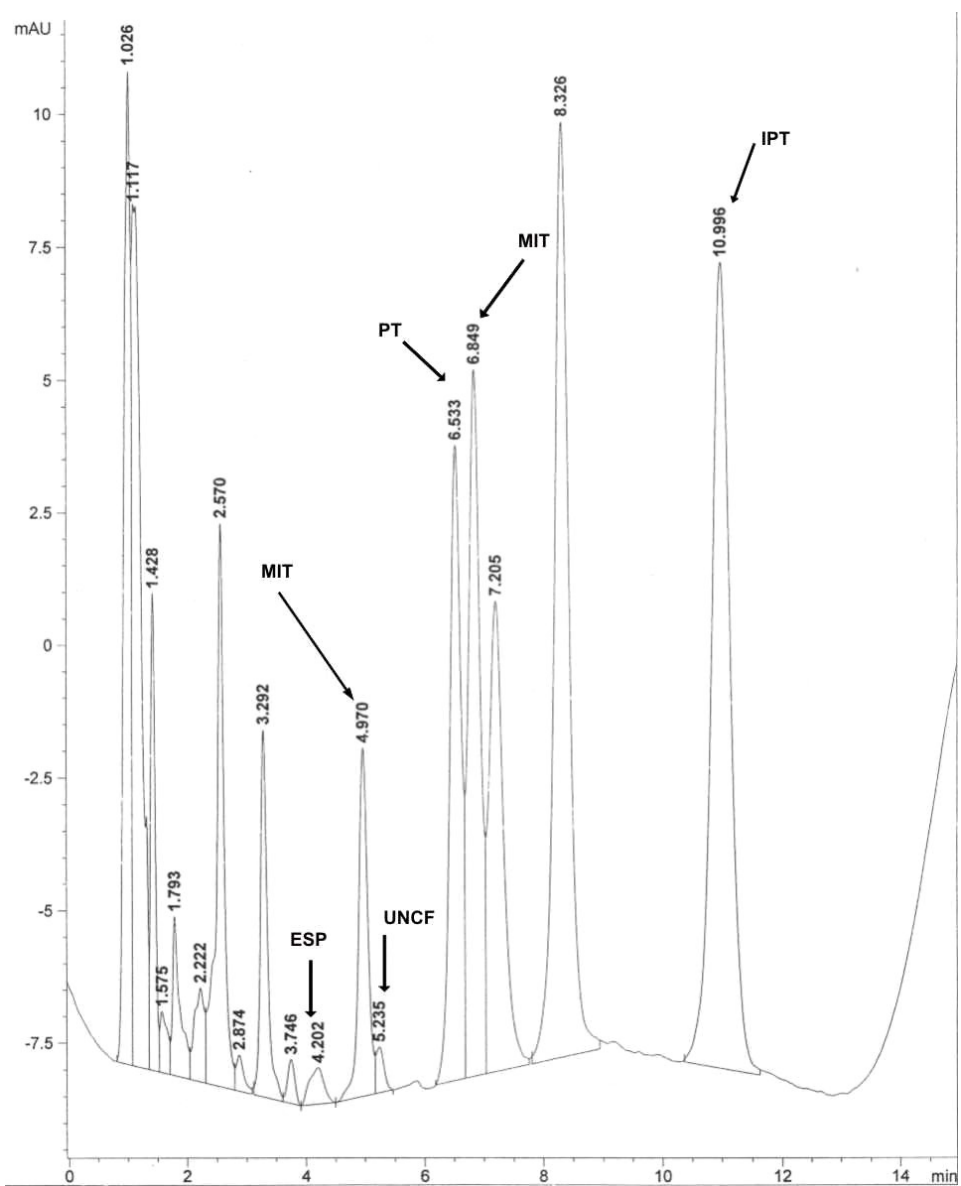


FIGURA 9B. Cromatograma em CLAE da amostra da plântula de *U. guianensis*.
 ESP = especiofilina; MIT = mitrafilina; UNCF= uncarina F; PT= pteropodina; IMIT = isomitrafilina; IPT = isopteropodina.
 UFLA/IQ/UFRJ, Lavras-MG, 2004.

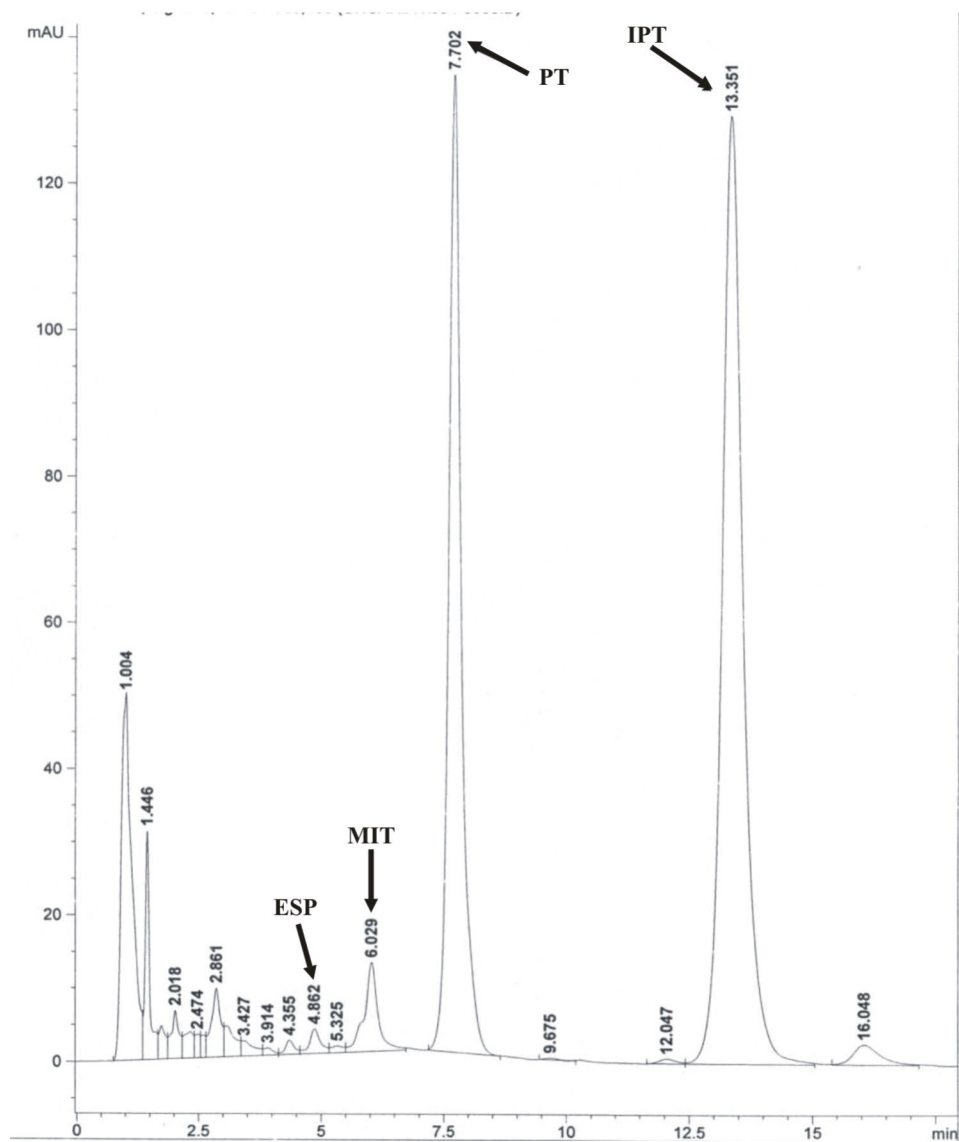


FIGURA 10B. Cromatograma em CLAE da amostra de folhas de plantas de *Uncaria guianensis* aos 30 dias de aclimação. ESP= especiofilina; PT = pteropodina; MIT= mitrafilina; IPT = isopteropodina. UFLA/IQ/UFRJ, Lavras-MG, 2004.

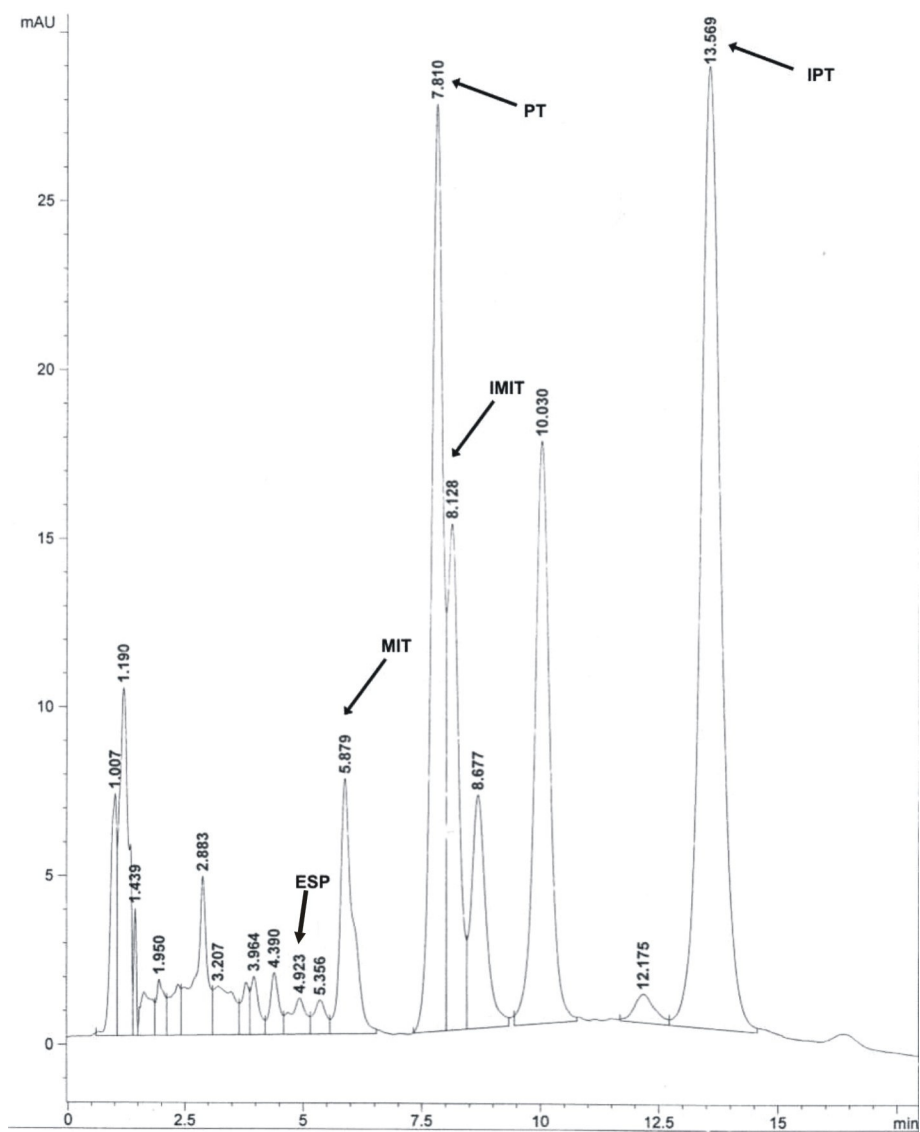


FIGURA 11B. Cromatograma em CLAE da amostra de folhas de plantas de *Uncaria guianensis* aos 45 dias de aclimação. ESP = especiofilina; MIT = mitrafilina; PT = pteropodina; IMIT = isomitrafilina; IPT = isopteropodina. UFLA/IQ/UFRJ, Lavras-MG, 2004.

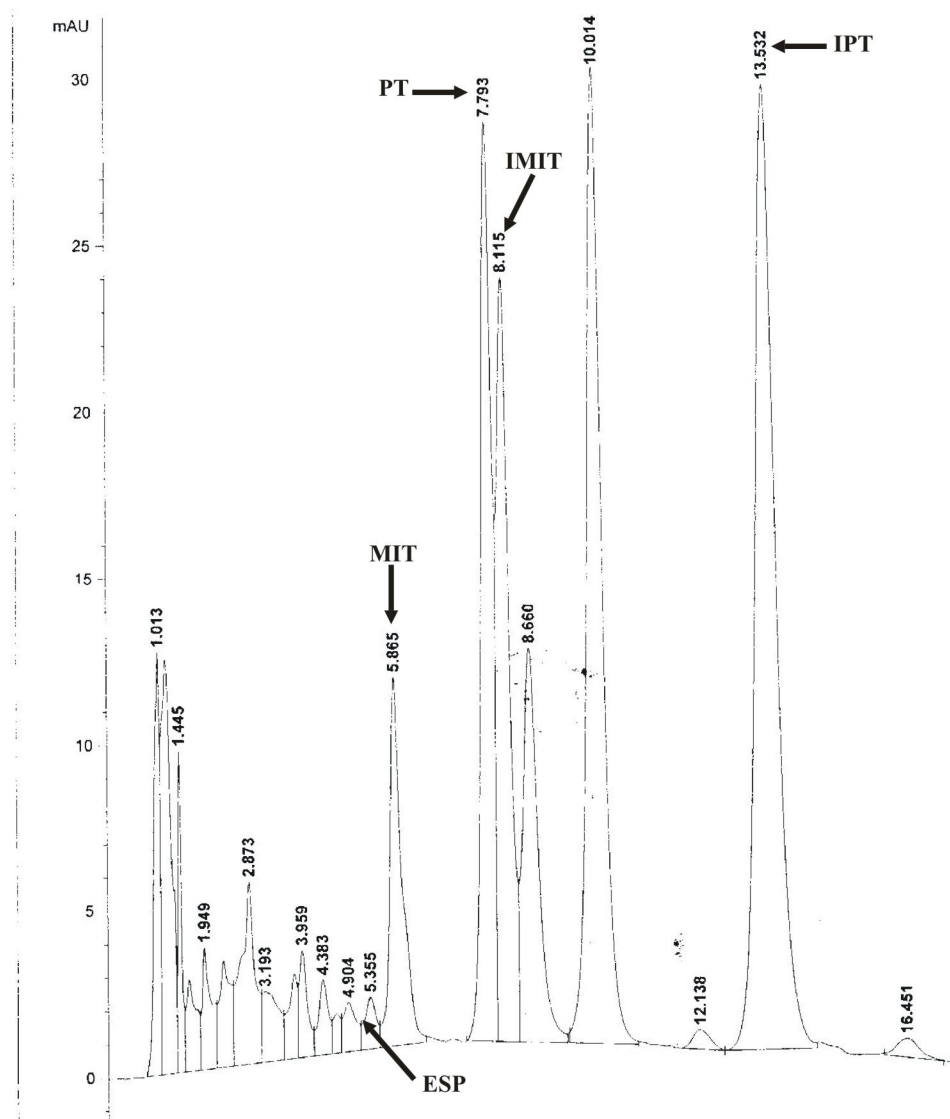


FIGURA 12B. Cromatograma em CLAE da amostra de folhas de plantas de *Uncaria tomentosa* aos 30 dias de aclimatização. ESP = especiofilina; MIT = mitrafilina; PT = pteropodina; IMIT = isomitrafilina; IPT = isopteropodina. UFLA/IQ/UFRJ, Lavras-MG, 2004.

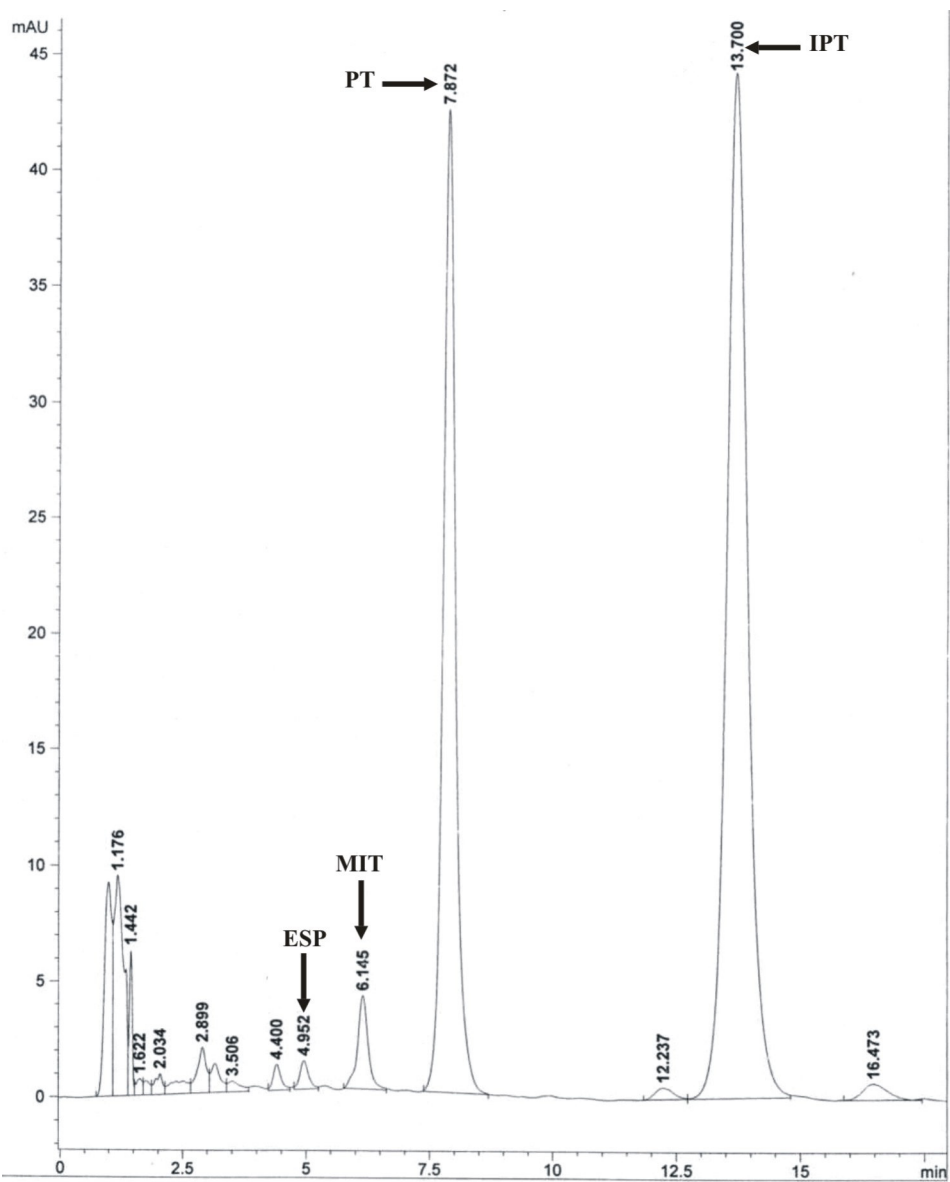


FIGURA 13B. Cromatograma da amostra de folhas de plantas de *Uncaria tomentosa* aos 45 dias de aclimação. ESP = especiofilina; MIT = mitrafilina; PT = pteropodina; IPT = isopteropodina. UFLA/IQ/UFRJ, Lavras-MG, 2004.