



**UNIVERSIDADE DE FEIRA DE SANTANA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**



**PALOMA RIBEIRO MEIRA**

**FATORES BIÓTICO E ABIÓTICOS QUE INFLUENCIAM NA  
CONCENTRAÇÃO DE PODOFILOTOXINA**

Feira de Santana, BA  
2013

**PALOMA RIBEIRO MEIRA**

**FATORES BIÓTICO E ABIÓTICOS QUE INFLUENCIAM NA  
CONCENTRAÇÃO DE PODOFILOTOXINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador<sup>a</sup>: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juceni P. David.

Co-orientador: Prof. Dr. José Raniere F. Santana

Feira de Santana, BA  
2013

À meu Deus, minha família e Helna, minha mentora.

## AGRADECIMENTOS

A Deus o pai todo poderoso por permitir que todas as coisas acontecessem em minha vida, me amparar e sustentar nas grandes adversidades pelas quais passei;

Ao meus orientadores Dra Juceni David e Dr. José Raniere Santana pela confiança em mim depositada;

Ao CNPq, pelo financiamento destes estudos;

Ao programa de pós-graduação em biotecnologia PPGBiotec-UEFS, na pessoa da Profa Dra Sandra Assis;

Ao secretário do programa Helton Ricardo, extremamente eficiente em todas as demandas;

Ao Dr Jorge David, Dr Lenaldo Muniz, Dr José Floriano Pastore e Dra Moema Bellitani por colaborarem na execução deste trabalho;

Aos amigos da EBDA que me acolheram especialmente Dr. Frederico Medeiros e Dra Ana Rita Bautista;

À queridas colegas de laboratório da EBDA Edivânia Araújo, Jaqueline, Ana Laura Gonçalves, Ana Camila e Carla Idalina;

À minha grande amiga, primeira orientadora e mentora, *in memoriam*, Helna Célia Passinho Soares, abaixo de Deus, quem me ensinou quase tudo que sei, segurou em minhas mãos quando a distância e a saudade da família eram maiores do que eu;

À Alessandra Guedes, professora e amiga querida, meu exemplo de profissional;

Ao anjo amigo Hector Hugo Medrado que não só cuidou de mim, mas colaborou imensamente na execução deste trabalho;

Aos meus tios e primos, em especial Taísa que me abrigou e cuidou de mim em minha trajetória em Salvador;

Ao meu pastor Carlos Moreno e à missionária Lidiane pelo ânimo que me emprestaram durante minha trajetória em Feira de Santana, pelo carinho e atenção sempre a mim dispensados;

À tia Marileide, que, depois de minha família, foi a primeira que acreditou que poderia crescer;

Aos grandes amigos que descobri com este trabalho, Adriana Fidelis, Fabiana Holanda, Mona de Oliveira, Mona Lisa Santana, Lucimário e Josimeire Bastos;

Aos amigos do coração que se fizeram presentes nos momentos mais necessários Ana Cláudia Fernandes, Ariana Lisboa, Raylane Vital, Tiago Vandrê (*in memorian*), Bruna Freire, Ana Juçara Sampaio, Nilda Sampaio e tantos outros;

E a todos que de uma maneira ou de outra me ajudaram, incentivaram, enfim estiveram comigo nessa jornada o meu muito obrigada, vocês são especiais.

“Sai da tua terra, da tua parentela e da casa de teu pai e vai para a terra que eu te mostrarei (...) e te abençoarei e te engrandecerei o nome. Sê tu uma bênção” Gn 12:1-2

## RESUMO

Este trabalho descreve a influência de fatores abióticos e biótico na concentração de metabólitos secundários de interesse farmacológico em plantas medicinais, ao mesmo tempo que se propõe a responder como esses fatores influenciam na concentração de podofilotoxina e yateína em *Leptohyptis macrostachys in vitro*, objetivo deste. A espécie *Leptohyptis macrostachys* foi estabelecida *in vitro* a partir de sementes coletadas na região da Chapada Diamantina-Ba; estudando o índice de velocidade de germinação, a germinabilidade e o tempo médio de germinação de sementes cultivadas em meio MS com diferentes concentrações de sais constituintes deste meio, bem como diferentes concentrações de sacarose e ácido giberélico. Foi estudado também, como fatores abióticos (meio de cultivo, fontes de carbono temperatura, fotoperíodo e trocas gasosas) e biótico (reguladores vegetais) influenciaram no desenvolvimento (quantidade de brotos folhas e raízes e presença de calos friáveis, compactos ou oxidados) e na produção de podofilotoxina e yateína. Para estudar a influência estes fatores na obtenção destes metabólitos, as plantas foram maceradas à 40°C em etanol para a produção do extrato. Este foi particionado com água e, após tratamento específico, injetado no CLAE. Foi estabelecido um protocolo de cultivo para *Leptohyptis macrostachys* a partir de sementes em meio MS ½ suplementado com 1,5% de sacarose e 11,55µM de GA<sub>3</sub>; não houve formação significativa de calos nos tratamentos aplicados e a concentração da podofilotoxina foi favorecida quando *L. macrostachys* foi cultivada em meio MS ½ suplementado com 1,5% de sacarose, fechada com filme de PVC e mantida em sala de crescimento a 30°C.

**Palavras-chave:** podofilotoxina, estabelecimento *in vitro*, multiplicação *in vitro*, *Leptohyptis*, Lamiaceae.

## ABSTRACT

This paper describes the influence of abiotic and biotic factors in the concentration of secondary metabolites of pharmaceutical interest in medicinal plants, while it aims to answer how these factors influence the concentration of podophyllotoxin and yateína *Leptohyptis macrostachys* in vitro, this goal. The specimen *Leptohyptis macrostachys* was established in vitro from seeds collected in the Chapada Diamantina-Ba; studying the rate of germination rate, the germination and mean germination of seeds grown on MS medium with different concentrations of salts constituents of this medium as well as different concentrations of sucrose and gibberellic acid. Was also studied, such as abiotic factors (culture medium, carbon source temperature, photoperiod and gas exchange) and biological (plant growth regulators) influenced the development (number of shoots and leaves and roots presence of friable callus, compact or oxidized) and production of podophyllotoxin and yateína. To study the influence of these factors in getting these metabolites, plants were steeped at 40 °C in ethanol to produce the extract. This was partitioned with water and after a specific treatment, injected into the HPLC. We established a protocol for *Leptohyptis macrostachys* growing from seeds in ½ MS medium supplemented with 1.5% sucrose and 11.55 mM of GA3, there was no significant formation of callus in treatments applied and the concentration of podophyllotoxin was favored when *L. macrostachys* was grown in ½ MS medium supplemented with 1.5% sucrose, closed with PVC film and kept in a growth room at 30 °C.

**Keywords:** podophyllotoxin, *in vitro* establishment, *in vitro* multiplication , *Leptohyptis*, Lamiaceae

## LISTA DE FIGURA

Figura 1: Subclasses de lignanas: dibenzilbutanosídicas (A), dibenzilbutirolactônicas (B), arilnaftalênicas (C), dibenzociclooctadiênicas (D), tetrahidrofurânicas (E) e furofurânicas (F)	30
Figura 2: Biossíntese do ácido chiquímico (DEWICK, 2002).	30
Figura 3: Formação do álcool coniferílico (DEWICK, 2002).	31
Figura 4: Estrutura ressonante (DEWICK, 2002).	31
Figura 5: Formação do pinosinol (DEWICK, 2002).	31
Figura 6: Biossíntese da podofilotoxina (BRANDÃO. 2010)	32
Figura 7: Estruturas do Etoposide (a), Teniposide (b) e Etopofos (c)	33
Figura 8: Plantas germinadas <i>in vitro</i> de <i>Leptohyptis macrostachys</i> .	37
Figura 9: Extratos em processo de secagem.	39
Figura 10: Partição acetato de etila e água (1:1).	40
Figura 11: Pré-concentração em cartucho Sep-pak C18 (Mane Fold).	40
Figura 12: Emissão de radícula de sementes de <i>Leptohyptis macrostachys</i> .	42
Figura 13: Plantas cultivada <i>in vitro</i> T1= MS metade 1,5% de sacarose ; T2= MS metade 3,0% de sacarose; T3= MS inteiro 1,5% de sacarose; T4= MS inteiro 1,5% de sacarose. Raízes indicadas por setas.	42
Figura 14: Plantas cultivadas <i>in vitro</i> por 30 dias em experimento de reguladores vegetais.	42
Figura 15: Plantas de <i>Leptohyptis macrostachys</i> mantidas em diferentes temperaturas por 30 dias.	42

Figura 16: Plantas cultivadas in vitro com diferentes tipos de fechamento dos tubos.

42

Figura 17: Plantas de *Leptohyptis macrostachys* cultivadas in vitro sob diferentes regimes de fotoperíodo após 30 dias de inoculação.

42

Figura 18: Comparativo do rendimento (mg/g de planta seca) de podofilotoxina em plantas de *Leptohyptis macrostachys* cultivadas in vitro.

42

Figura 19: Comparativo de médias considerando o rendimento (mg/g de planta seca) de podofilotoxina x yateína em plantas de *Leptohyptis macrostachys* cultivadas in vitro.

42

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resumo da Análise de variância para índice de velocidade de germinação (IVG), germinabilidade (G) e tempo médio de germinação (Tm) de <i>Leptohyptis macrostachys</i> em função da concentração dos sais no meio de cultura.	42
Tabela 2: Médias das variáveis índice de velocidade de germinação (IVG), germinabilidade (G) e tempo médio de germinação (Tm) de <i>Leptohyptis macrostachys</i> em função da concentração dos sais no meio de cultura	43
Tabela 3: Resumo da Análise de variância para índice de velocidade de germinação (IVG), germinabilidade (G) e tempo médio de germinação (Tm) de <i>Leptohyptis macrostachys</i> em função da concentração de sacarose.	44
Tabela 4: Médias das variáveis índice de velocidade de germinação (IVG), germinabilidade (G) e tempo médio de germinação (Tm) de <i>Leptohyptis macrostachys</i> em função da concentração de sacarose	44
Tabela 5: Resumo da Análise de variância para índice de velocidade de germinação (IVG), germinabilidade (G) e tempo médio de germinação (Tm) de <i>Leptohyptis macrostachys</i> em função da concentração do fitorregulador (Ácido giberélico – GA3).	46
Tabela 6: Médias das variáveis índice de velocidade de germinação (IVG), germinabilidade (G) e tempo médio de germinação (Tm) de <i>Leptohyptis macrostachys</i> em função da concentração do Fitorregulador (Ácido giberélico – GA3).	46
Tabela 7: Resumo da Análise de Variância para número de brotos, número de folhas e número de raízes de <i>Leptohyptis macrostachys</i> em função da concentração de sais x concentração de sacarose.	48
Tabela 8: Médias da variável número de raízes de <i>Leptohyptis macrostachys</i> em função da concentração dos sais.	48
Tabela 9: Número de brotos de <i>Leptohyptis macrostachys</i> em diferentes concentrações de sais e sacarose.	49
Tabela 10: Resumo da análise de variância para número de brotos, número de folhas, número de raízes, calos friável, calos compacto e calos oxidado em função dos fitorreguladores (BAP x ANA).	51
Tabela 11: Número de brotos de <i>Leptohyptis macrostachys</i> em diferentes concentrações de BAP e ANA.	51
Tabela 12: Número de folhas de <i>Leptohyptis macrostachys</i> em diferentes concentrações de BAP e ANA.	52
Tabela 13: Número de raízes em explantes de <i>Leptohyptis macrostachys</i> em diferentes concentrações de BAP e ANA.	53
Tabela 14: Calos friáveis em explantes de <i>Leptohyptis macrostachys</i> em diferentes concentrações de BAP e ANA	55

Tabela 15: Calos compactos em explantes de <i>Leptohyptis macrostachys</i> em diferentes concentrações de BAP e ANA.	55
Tabela 16: Calos oxidados em explantes de <i>Leptohyptis macrostachys</i> em diferentes concentrações de BAP e ANA.	56
Tabela 17: Resumo da análise de variância para número de brotos, número de folhas, número de raízes e calos friáveis de <i>Leptohyptis macrostachys</i> em função de diferentes temperaturas	57
Tabela 18: Valores médios para número de brotos, número de folhas e número de raízes em plantas de <i>Leptohyptis macrostachys</i> , em diferentes temperaturas.	58
Tabela 19: Resumo da análise de variância para as variáveis número de brotos, número de folhas e número de raízes em plantas de <i>Leptohyptis macrostachys</i> em função dos tipos de fechamento dos tubos.	59
Tabela 20: Valores médios para número de brotos, número de folhas e número de raízes em plantas de <i>Leptohyptis macrostachys</i> , em função de diferentes tipos de fechamento dos tubos de ensaio.	59
Tabela 21: Resumo da análise de variância para as variáveis número de brotos, número de folhas e número de raízes em plantas de <i>Leptohyptis macrostachys</i> em função de diferentes fotoperíodos.	60
Tabela 22: Valores médios para número de brotos, número de folhas e número de raízes em plantas de <i>Leptohyptis macrostachys</i> , em função de diferentes fotoperíodos.	61
Tabela 23: Resumo da análise de variância para podofilotoxina e yateína em plantas de <i>Leptohyptis macrostachys</i> em função de diferentes concentrações dos sais e de sacarose no meio de cultura.	62
Tabela 24: Valores médios de podofilotoxina em plantas de <i>Leptohyptis macrostachys</i> em função da concentração de sais e de sacarose no meio de cultura.	63
Tabela 25: Valores médios de yateína em plantas de <i>Leptohyptis macrostachys</i> em função das concentrações de sais no meio de cultura.	63
Tabela 26: Resumo da análise de variância para podofilotoxina e yateína em plantas de <i>Leptohyptis macrostachys</i> em função de diferentes concentrações de BAP e ANA.	64
Tabela 27: Valores médios de podofilotoxina em plantas de <i>Leptohyptis macrostachys</i> em função de diferentes concentrações de BAP e ANA.	64
Tabela 28: Valores médios de yateína em plantas de <i>Leptohyptis macrostachys</i> em função de diferentes concentrações de ANA.	64
Tabela 29: Resumo da análise de variância para podofilotoxina e yateína em plantas de <i>Leptohyptis macrostachys</i> em função de diferentes temperaturas.	65

Tabela 30: Valores médios de podofilotoxina e yateína em plantas de <i>Leptohyptis macrostachys</i> em função da temperatura.	65
Tabela 31: Resumo da análise de variância para podofilotoxina e yateína em plantas de <i>Leptohyptis macrostachys</i> em função de diferentes tipos de fechamento dos tubos de ensaio.	66
Tabela 32: Valores médios de podofilotoxina e yateína em plantas de <i>Leptohyptis macrostachys</i> em função do tipo de fechamento.	66
Tabela 33: Resumo da análise de variância para podofilotoxina e yateína em plantas de <i>Leptohyptis macrostachys</i> em função de diferentes fotoperíodos.	66
Tabela 34: Valores médios de podofilotoxina e yateína em plantas de <i>Leptohyptis macrostachys</i> em função do fotoperíodo.	67

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	17
1.1 OBJETIVOS	18
1.1.1 Objetivo geral	18
1.1.2 Objetivos específicos	18
1.2 JUSTIFICATIVA	18
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b>	20
2.1 BIOTECNOLOGIA	20
2.2 PLANTAS MEDICINAIS	21
2.3 FAMÍLIA LAMIACEAE	23
2.4 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	26
2.5.1 Lignan	28
2.5.2 Podofilotoxina e derivados	32
2.6 CONSIDERAÇÕES SOBRE A TÉCNICA DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA – CLAE	32
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	35
3.1 ESTABELECIMENTO IN VITRO DE LEPTOHYPTIS MACROSTACHYS	35
3.1.3.1 Concentração dos sais do meio de cultura	36
3.1.3.2 Concentração de sacarose no meio de cultura	36
3.1.3.3 Avaliação do efeito do ácido giberélico	36
3.1.3.4 Condições experimentais	36
3.1.3.5 Delineamento experimental	36
3.2 MULTIPLICAÇÃO IN VITRO DE LEPTOHYPTIS MACROSTACHYS	37
3.2.1.1 Concentração dos sais e concentração de sacarose no meio de cultura	37
3.2.1.2 Avaliação do efeito de BAP e ANA	38
3.2.1.3 Avaliação do efeito da temperatura	38
3.2.1.4 Avaliação do efeito do fechamento dos tubos	38
3.1.2.5 Avaliação do efeito do fotoperíodo	38
3.1.2.6 Condições experimentais	38
3.1.2.7 Delineamento experimental	39
3.1.2.8 Parâmetros avaliados	39
3.1.2.9 Fitoquímica	39

<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	42
4.1 ESTABELECIMENTO IN VITRO DE LEPTOHYPTIS MACROSTACHYS	42
4.1.1 Concentração dos sais do meio de cultura	42
4.1.2 Concentração de sacarose no meio de cultura	43
4.1.2 Avaliação do efeito do ácido giberélico	45
4.2 MULTIPLICAÇÃO IN VITRO DE LEPTOHYPTIS MACROSTACHYS	48
4.2.1 Concentração dos sais x concentração de sacarose	48
4.2.2 Avaliação do efeito de BAP e ANA	50
4.2.3 Avaliação do efeito da temperatura	57
4.2.4 Avaliação do efeito do fechamento dos tubos	59
4.2.5 Avaliação do efeito do fotoperíodo	60
4.2.6 Fitoquímica	62
4.2.6.1 Concentração dos sais x concentração de sacarose	62
4.2.6.2 Avaliação do efeito de BAP e ANA	63
4.2.6.3 Avaliação do efeito da temperatura	65
4.2.6.4 Avaliação do efeito do fechamento dos tubos	65
4.2.6.5 Avaliação do efeito do fotoperíodo	66
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	68
5.1 ESTABELECIMENTO IN VITRO DE LEPTOHYPTIS MACROSTACHYS	68
5.2 MULTIPLICAÇÃO IN VITRO DE LEPTOHYPTIS MACROSTACHYS	69
<b>6 REFERÊNCIAS</b>	70
APÊNDICE A – Cromatograma e espectro UV do padrão de podofilotoxina.	79
APÊNDICE B – Cromatograma e espectro UV do padrão de yateína.	80
APÊNDICE C – Cromatograma e espectros UV de podofilotoxina e yateína, respectivamente, no extrato de plantas de <i>Leptohyptis macrostachys</i> cultivadas <i>in vitro</i> em meio MS ½ com 1,5% de sacarose.	81
APÊNDICE D – Cromatograma e espectros UV de podofilotoxina e yateína, respectivamente, no extrato de plantas de <i>Leptohyptis macrostachys</i> cultivadas <i>in vitro</i> em meio MS ½ com 3,0% de sacarose.	82
APÊNDICE E – Cromatograma e espectros UV de podofilotoxina e yateína, respectivamente, no extrato de plantas de <i>Leptohyptis macrostachys</i>	83

cultivadas <i>in vitro</i> em meio MS completo com 1,5% de sacarose	
APÊNDICE F – Cromatograma e espectros UV de podofilotoxina e yateína, respectivamente, no extrato de plantas de <i>Leptohyptis macrostachys</i> cultivadas <i>in vitro</i> em meio MS completo com 3,0% de sacarose.	84
APÊNDICE G – Cromatograma e espectros UV de podofilotoxina e yateína, respectivamente, no extrato de plantas de <i>Leptohyptis macrostachys</i> cultivadas <i>in vitro</i> (controle).	85
APÊNDICE H – Cromatograma e espectros UV de podofilotoxina e yateína, respectivamente, no extrato de plantas de <i>Leptohyptis macrostachys</i> cultivadas <i>in vitro</i> na presença de 5,37µM de ANA.	86
APÊNDICE I – Cromatograma e espectros UV de podofilotoxina e yateína, respectivamente, no extrato de plantas de <i>Leptohyptis macrostachys</i> cultivadas <i>in vitro</i> na presença de 10,74µM de ANA.	87
APÊNDICE J – Cromatograma e espectros UV de podofilotoxina e yateína, respectivamente, no extrato de plantas de <i>Leptohyptis macrostachys</i> cultivadas <i>in vitro</i> na presença de 4,44µM de BAP.	88
APÊNDICE K – Cromatograma e espectros UV de podofilotoxina e yateína, respectivamente, no extrato de plantas de <i>Leptohyptis macrostachys</i> cultivadas <i>in vitro</i> na presença de 4,44µM de BAP e 5,37µM de ANA.	89
APÊNDICE L – Cromatograma e espectros UV de podofilotoxina e yateína, respectivamente, no extrato de plantas de <i>Leptohyptis macrostachys</i> cultivadas <i>in vitro</i> na presença de 4,44µM de BAP e 10,74µM de ANA.	90
APÊNDICE M – Cromatograma e espectros UV de podofilotoxina e yateína, respectivamente, no extrato de plantas de <i>Leptohyptis macrostachys</i> cultivadas <i>in vitro</i> na presença de 8,88µM de BAP.	91
APÊNDICE N – Cromatograma e espectros UV de podofilotoxina e yateína, respectivamente, no extrato de plantas de <i>Leptohyptis macrostachys</i> cultivadas <i>in vitro</i> na presença de 8,88µM de BAP e 5,37µM de ANA.	92
APÊNDICE O – Cromatograma e espectros UV de podofilotoxina e yateína, respectivamente, no extrato de plantas de <i>Leptohyptis macrostachys</i> cultivadas <i>in vitro</i> na presença de 8,88µM de BAP e 10,74µM de ANA.	93
APÊNDICE P – Cromatograma e espectros UV de podofilotoxina e yateína, respectivamente, no extrato de plantas de <i>Leptohyptis macrostachys</i>	94

cultivadas *in vitro* sob 30°C de temperatura.

APÊNDICE Q – Cromatograma e espectros UV de podofilotoxina e yateína, respectivamente, no extrato de plantas de *Leptohyptis macrostachys* cultivadas *in vitro* com tubos fechados com tampa plástica. 95

APÊNDICE R – Cromatograma e espectros UV de podofilotoxina e yateína, respectivamente, no extrato de plantas de *Leptohyptis macrostachys* cultivadas *in vitro* sob fotoperíodo de 8h. 96

ANEXO A – Constituintes do meio MS 97

## 1 INTRODUÇÃO

Os metabólitos secundários de plantas não são produzidos necessariamente sob todas as condições e na maioria das vezes seu papel não é bem conhecido (DEWICK, 2002).

Essas substâncias representam uma importante fonte de compostos ativos farmacêuticos, pigmentos, fragrâncias, aditivos alimentícios, etc. Contudo, a produção de compostos fitoquímicos frequentemente envolve a extração da planta viva, que necessita, muitas vezes, de bastante tempo para se desenvolver, e isso pode levar à extinção de espécies nativas (VALLE, 2003).

Para transpor essa dificuldade, segundo Lourenço (2003) a produção de biomoléculas, como a chiconina, berberina e taxol, tem sido obtida via cultura de células em escala industrial. Outra estratégia pode ser o aumento da biomassa, a partir de ferramentas biotecnológicas, como no caso de raízes de ginseng.

Os processos biotecnológicos para o cultivo de células, tecidos e órgãos ou de plantas íntegras para a produção de compostos de interesse à sociedade, têm sido considerados como sistemas de alto potencial para a superação de problemas na produção em campo de plantas. Dentre estes podem-se citar sazonalidade, variação ambiental, localização geográfica, ataque de pragas e instabilidade política como interferentes na produção de substâncias ativas (VALLE, 2003).

Para avaliar a formação dos compostos bioativos *in vitro* ou *ex vitro*, a cromatografia é uma técnica amplamente utilizada. Esta técnica é fundamentada na migração diferencial; os componentes de uma mistura podem ser separados na cromatografia líquida, devido a diferentes interações entre a fase móvel e estacionária (DEGANI, CASS & VIEIRA, 1998).

O tema deste trabalho versa sobre a influência de fatores abióticos e biótico na concentração de metabólitos secundários de interesse farmacológico em *Leptohyptis macrostachys* após estabelecimento e multiplicação *in vitro*, ao mesmo tempo, se propõe a responder o quanto esses fatores influenciam na produção de podofilotoxina e yateína em *L. macrostachys* cultivada *in vitro*.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

Analisar a influência de fatores abióticos e biótico na produção de podofilotoxina e yateína em *Leptohypitismacrostachys* cultivada *in vitro*.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- Estabelecer protocolo de germinação *in vitro* de *Leptohypitis macrostachys*;
- Estabelecer protocolo de multiplicação *in vitro* de *Leptohypitis macrostachys*;
- Avaliar o desenvolvimento de plântulas de *L. macrostachys*;
- Utilizar estratégias biotecnológicas para otimizar a produção *in vitro* de podofilotoxina e yateína;
- Contribuir para a compreensão da regulação de podofilotoxina em *Leptohypitis macrostachys*;
- Realizar extração e quantificar podofilotoxina e yateína em *L. macrostachys*;
- Analisar os perfis cromatográficos dos extratos da planta em estudo;

## 1.2 JUSTIFICATIVA

Segundo Liebsch e Mikich (2009), os fatores que influenciam os ritmos fenológicos podem ser divididos em duas categorias: bióticos e abióticos. Os fatores bióticos incluem adaptações morfológicas e fisiológicas, além da interação com polinizadores e dispersores. Os fatores abióticos incluem precipitação, temperatura e fotoperíodo, que são considerados os mais importantes.

Não só fatores abióticos como também a variabilidade genética das plantas culmina num alto grau de inconstância nos níveis de metabólitos secundários (AFFONSO et al., 2009).

Neste contexto, a cultura de tecidos pode ser usada para induzir modificações qualitativas na produção destes metabólitos pela alteração de nutrientes e/ou reguladores nas condições de crescimento *in vitro* (AFFONSO et al., 2009).

Assim, o uso de ferramentas biotecnológicas, tais como cultura de tecidos, pode favorecer a produção de metabólitos secundários a partir de uma fonte vegetal homogênea e bem definida (AFFONSO et al., 2009).

As lignanas são metabólitos secundários produzidos a partir do acoplamento oxidativo de unidades fenilpropanoídicas (C<sub>6</sub>C<sub>3</sub>) oriundas da via chiquimato. Dentre as lignanas de ocorrência natural que apresentam propriedades farmacológicas cabe destaque à podofilotoxina (DEWICK, 2002).

Trata-se de um composto farmacologicamente importante por sua atividade anticancerígena. A podofilotoxina é um composto líder para a semi-síntese de fármacos usados no tratamento de carcinomas, a saber: etoposíde, teniposíde e etopofos (FARKYA, BISARIA e SRIVASTAVA, 2004).

A busca incessante por melhores tratamentos do câncer, o potencial da podofilotoxina como composto líder, a escassa disponibilidade e as dispendiosas técnicas de síntese orgânica tornam a síntese da podofilotoxina inviável comercialmente, mesmo diante da necessidade de sobreprodução deste composto (FARKYA, BISARIA e SRIVASTAVA, 2004).

Segundo Verpoorte, Contin e Memelink (2002), em alguns casos, o screening, a seleção de matrizes e a otimização do meio de cultura pode aumentar de 20 a 30 vezes a produção de metabólitos. Assim, a cultura de tecidos ou de células torna-se uma alternativa viável para a produção de podofilotoxina e, por conseguinte, pode levar a redução do custo da semi-síntese dos fármacos antineoplásicos.

Dentre os gêneros que apresentam maior abundância desta lignana Ionkova (2007) citam *Hyptis*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 BIOTECNOLOGIA

A biotecnologia é voltada para a indústria, baseada na busca e descoberta de recursos biológicos potencialmente exploráveis. Uma abordagem clássica das etapas do processo de busca e descoberta biotecnológica passa, resumidamente, pela coleta de material biológico, seguida da seleção e triagem de materiais com os atributos desejados, seleção final dos melhores candidatos a partir de uma lista reduzida de opções e culmina com o desenvolvimento de um produto comercial ou processo industrial (BULL *et al*, 2000).

A engenharia metabólica tem oferecido novas perspectivas para melhorar a produção de compostos de interesse. Esta abordagem pode ser utilizada para aperfeiçoar a produção em cultura celular, na própria unidade ou até mesmo no cultivo de outras espécies de plantas ou organismos (VERPOORT, CONTIN e MEMELINK, 2002).

A biotecnologia vegetal constitui uma ferramenta importante na obtenção de biomoléculas de interesse farmacológico e industrial, mostrando-se importante ainda na descoberta e manipulação de enzimas-chaves em rotas metabólicas, o que proporciona controle e intensificação na produção de moléculas bioativas (LOURENÇO, 2003).

A utilização de técnicas biotecnológicas em plantas tais como, micropropagação, cultura de células e tecidos vegetais, biotransformação e engenharia genética, pode resolver ou minimizar alguns dos problemas presentes no ambiente. Estas técnicas visam o aumento e o direcionamento da propagação de plantas superiores, além da produção de metabólitos secundários que tenham relevância do ponto de vista terapêutico e que, por algum impedimento, não podem ser produzidos por síntese (HOLTON *et al.*, 1994; NICOLAU *et al.*, 1994).

A cultura de tecidos é a ciência do crescimento de células vegetais, tecidos ou organismos isolados a partir da planta mãe em meio artificial e condições

assépticas. Inclui técnicas e métodos usados para pesquisa em muitas disciplinas botânicas e têm geralmente objetivos práticos (GEORGE, HALL & KLERK, 2008).

Atualmente, a tecnologia de cultura de tecidos vegetais figura como uma promissora via na produção de metabólitos secundários economicamente importantes tais como, flavorizantes, corantes e produtos farmacêuticos em ambientes controlados (TISSERAT & VAUGHN, 2008).

A cultura de tecidos pode ser empregada para a multiplicação de espécies de difícil propagação e para a limpeza clonal, por meio da qual é possível, em algumas espécies, a produção de mudas livres de vírus (BRASIL, 2002). Pode ser utilizada ainda na compreensão da nutrição das células, bem como na elucidação das vias metabólicas e enzimas envolvidas na produção de compostos bioativos, conseqüentemente, favorecendo a sobreprodução destes (PEREIRA, 2003).

A micropropagação é a técnica de maior aplicabilidade da cultura de tecido e tem sido utilizada para multiplicar centenas de espécies medicinais. Essa técnica é usada rotineiramente para aumentar a quantidade de genótipos selecionados, ou para substituir acessos que tenham adquirido caracteres indesejáveis como baixa produtividade e susceptibilidade às doenças (DEBNATH, MALIK e BISEN, 2006).

A propagação de plantas, através da cultura de tecidos, baseia-se no princípio da totipotência, o qual se considera que cada célula vegetal tem o potencial para regenerar uma planta inteira. Assim, este princípio pode ser aplicado na regeneração de plantas a partir de culturas celulares e de tecidos (BOTTA et. al., 2001).

Com a propagação de plantas através de cultura de tecidos torna-se possível propagar plantas “*true-to-type*” isto é, como clones. Estas plantas obtidas de cultura de tecidos são chamadas de microplantas, podendo derivatizar-se de culturas de tecidos de três maneiras: a partir de gemas pré-existentes ou gomos primordiais (Meristemas) que são estimulados a crescer e proliferar; morfogênese indireta, quando novas gemas são induzidas a se formar em tecidos desorganizados; ou a partir de embriões somáticos, que lembram os embriões zigóticos, e que podem crescer da mesma forma (GEORGE, HALL & KLERK, 2008).

Os principais benefícios da aplicação de técnicas de micropropagação de plantas medicinais são:

- a) Possibilidade de aumento rápido do número de indivíduos geneticamente idênticos a partir de plantas selecionadas;
- b) Produção de mudas durante todo o ano;
- c) A produção de plantas com elevada qualidade sanitária, livre de patógenos;
- d) A possibilidade de conservação de germoplasma, garantindo a manutenção da biodiversidade e;
- e) Melhoramento genético de plantas por meio da associação de métodos de cultura de tecidos e regeneração *in vitro* (MULABAGAL e Hsin-Sheng., 2004).

Esta técnica ainda pode ser empregada no sentido de resolver ou minimizar problemas como dificuldade de identificação botânica, variabilidade genética com alterações quantitativas nos metabólitos secundários e pressão antrópica, seja na multiplicação sistematizada de plantas elites pelo processo de micropropagação, ou na produção de metabólitos secundários que tenham relevância do ponto de vista terapêutico (PEREIRA, 2003).

### 2.3 PLANTAS MEDICINAIS

De acordo com a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos no Brasil (PNPMFB), grande parte da população de países em desenvolvimento depende da medicina tradicional na atenção primária, tendo em vista que 80% desta população utilizam práticas tradicionais nos seus cuidados básicos de saúde e 85% destes utilizam plantas ou preparações destas (BRASIL, 2006).

Os fitoterápicos constituem importante fonte de inovação em saúde, sendo objeto de interesses empresariais privados e fator de competitividade do Complexo Produtivo da Saúde (BRASIL, 2006).

A conversão de plantas e de suas partes, cujo valor medicinal tenha sido confirmado pelas pesquisas, em fármacos para a população esbarra na dificuldade de se obter matéria-prima na quantidade e qualidade necessária para suprir a

demanda requerida pelo mercado nacional e internacional (AMARAL e SILVA, 2003).

A eficácia e segurança de muitas plantas medicinais já foram comprovadas cientificamente o que as tornam legítimas como recurso terapêutico benéfico e indispensável para a humanidade (VEIGA JÚNIOR, PINTO & MACIEL, 2005). Entretanto, há problemas de vários níveis que limitam o seu uso entre eles podemos citar:

- a. Dificuldade de identificação botânica, muitas plantas possuem semelhanças morfológicas que só podem ser distinguidas por especialista;
- b. Algumas espécies sintetizam os metabólitos secundários em concentrações muito baixas o que exige processos de extração dispendiosos e elaboração de formulações farmacêuticas complexas;
- c. Há enorme variabilidade genética com alterações quantitativas e qualitativas nos metabólitos secundários o que dificulta a obtenção de droga padronizada;
- d. Muitas plantas estão sob forte pressão antrópica, expostas a erosão genética e redução drástica de populações endêmicas o que dificulta a utilização em larga escala.

A limitação dos ambientes naturais, a baixa concentração de alguns produtos de interesse, as dificuldades agrícolas encontradas em algumas plantas medicinais e aromáticas e o risco de extinção de espécies têm estimulado nos últimos anos as pesquisas que visam à produção *in vitro* de metabólitos secundários como alternativa aos processos agrícolas tradicionais (VERPOORTE CONTIN e MEMELINK, 2002).

## 2.4 FAMÍLIA LAMIACEAE

Entre as principais famílias botânicas representantes das plantas medicinais está a Lamiaceae, que é uma das maiores famílias de Angiospermas. A família Lamiaceae é representada por diversas plantas medicinais e condimentares, tais como, erva cidreira (*Hyptis* sp.), alfazema (*Lavandula* sp.), cordão-de-frade (*Leonotis*

sp.), macaé (*Leonurus* sp.), orégano (*Origanum* sp.), boldo (*Plectranthus* sp.), alecrim (*Rosmarinus* sp.), sálvia (*Salvia* sp.) e tomilho (*Thymus* sp.) (VIANNA, 2009).

As Lamiaceae pertencem à ordem Tubiflorae (Lamiales), abrangendo cerca de 200 gêneros e aproximadamente 3.200 espécies distribuídas em todo o mundo (BOTREL et. al., 2010).

No Brasil são conhecidos cerca de 30 gêneros e 350 espécies e em outras regiões de Cerrado ao leste da América do Sul, a família *Lamiaceae* é representada principalmente pela subtribo *Hyptidinae* (SILVA et al., 2011).

Trata-se de uma vasta família de distribuição cosmopolita, mas centrada, principalmente, na região mediterrânea, onde constitui parte integrante da vegetação (FALCÃO, FERNANDES e MENEZES, 2003).

Esta família é um grupo taxonômico que tem sido extensivamente estudado. A maior parte das espécies desta é herbácea e, na Venezuela, a maioria cresce em florestas e em savanas. Algumas espécies sob radiação solar e outras sob sombra das copas das árvores (CASTRILLO et. al., 2001).

É constituída por ervas, arbustos ou árvores; caules geralmente quadrados em corte transversal. Outra característica da família é a presença de pêlos glandulares, com óleos voláteis, e tectores (FALCÃO e MENEZES, 2003).

O gênero *Hyptis* contém cerca de 400 espécies distribuídas desde o sul dos Estados Unidos até a Argentina (FALCÃO, FERNANDES e MENEZES, 2003). No Brasil, concentra-se principalmente em estados centrais (ANDRADE, et. al., 2010).

Este gênero é rico em espécies de importância econômica e etnofarmacológica. As populações as utilizam para fins medicinais, no Brasil, México, Índia, China, Equador, Tailândia, Caribe, Norte da Nigéria e em outras localidades da África (FALCÃO, FERNANDES e MENEZES, 2003).

A região nordeste do Brasil possui uma grande diversidade de espécies nativas do gênero *Hyptis* que são conhecidas por suas propriedades medicinais e seu uso comum na medicina popular. Com o aumento do uso de terras para a

agricultura e exploração de recursos muitas dessas espécies estão em risco de extinguir antes de serem estudadas (BLANK et al., 2008).

As espécies do gênero *Hyptis* se caracterizam pela presença de substâncias com potencial farmacológico bastante interessante, apresentando uma composição muito rica em óleos essenciais (FALCÃO, FERNANDES e MENEZES, 2003). Várias espécies têm sido relacionadas a tratamentos de infecções gastrointestinais, cólicas, e dores, bem como em tratamentos de infecções de pele (AZEVEDO et. al., 2002).

Andrade et al. (2010) afirmam que espécies deste gênero são usadas a medicina popular como antiinflamatórios, antinociceptivo, anticonvulsivante e antiulcerogênica. Estudos demonstraram outras atividades biológicas importantes tais como, atividade antifúngica, antibacteriana, antiulcerogênica, larvicida e antidepressiva (BOTREL et. al., 2010).

A espécie mais estudada é a *H. suaveolens*, que em muitos países é considerada uma erva daninha como no norte da Austrália, por exemplo, pois é capaz de se regenerar após ser destruída pelo fogo. *H. suaveolens* é a única das 25 espécies de *Hyptis* que teve a composição da mucilagem da casca da semente estudada (FALCÃO E MENEZES, 2003).

Dentre os metabólitos secundários característicos desta família cita-se os terpenóides (monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos e triterpenos), compostos fenólicos, sobretudo ácidos fenólicos, como o ácido rosmarínico além de flavonoides. A presença de metabólitos contendo nitrogênio, como os alcaloides, é mais escassa (WINK, 2003).

Outra classe de metabólitos secundários de grande significado biológico encontrado nas espécies da família Lamiaceae é representada pelas lignanas, com ocorrência relatada apenas nos gêneros *Phlomis*, *Vitex*, *Mosla*, *Hyptis* e *Eriope* (BRANDÃO, 2010).

Poucos estudos têm sido realizados com o gênero *Hyptis* no sentido de promover o conhecimento do metabolismo secundário ou até mesmo causar sobreprodução dos metabólitos de interesse farmacológico, ainda sendo este

considerado um dos gêneros que possuem grande quantidade de podofilotoxina (IONKOVA, 2007).

Em 1982, Kadkade mostrou, pela primeira vez, que a cultura de calos *Podophyllum peltatum* poderia ser uma importante fonte alternativa de podofilotoxina. Após isso foram desenvolvidas culturas *in vitro* de várias espécies de plantas que fornecem diversos tipos de lignoides (FUSS, 2003).

Kuhnt, Rimpler e Heinrich (1994) foram os pioneiros na identificação de podofilotoxina e seus derivados em fração do extrato de *Hyptis verticillata*. Desde então tem se desenvolvido técnicas de extração e isolamento desta substância.

De acordo com Pastore et. al (2011), do gênero *Hyptis* foi separado, devido a características filogenéticas, o gênero *Leptohyptis* composto de seis espécies endêmicas da Caatinga e Campos Rupestres. Entre as espécies desse novo gênero, destaca-se a *Leptohyptis macrostachys*, objeto deste estudo, uma espécie recorrente no semiárido nordestino vulgarmente intitulada “hortelã do mato” e “alfavaca brava” com larga utilização nas afecções do trato respiratório (SOUZA et al 2012)

## 2.5 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Como os animais, os vegetais sofrem constantes agressões por agentes bióticos e abióticos. Vírus, bactérias, fungos, insetos e outros organismos podem causar doenças, cada um por um mecanismo próprio, ou danos físicos. Em geral, agentes não-biológicos como radiação ultravioleta, temperatura, umidade e outros danificam os tecidos (PINHEIRO, 2000).

As plantas, por não poderem se deslocar, desenvolveram mecanismos sofisticados de defesa contra herbívoros, patógenos e outros agentes de estresse. Alguns produtos do metabolismo das plantas têm forte ação tóxica e funcionam, eventualmente, como defesa (OLIVEIRA, 2000).

Entende-se por metabolismo vegetal o conjunto de reações químicas que ocorrem no interior das células e pode ser dividido em primário e secundário (SILVA, 2006).

Os metabólitos primários são encontrados em todos os vegetais e possuem rotas metabólicas que são essenciais ao desenvolvimento do indivíduo, a exemplo dos aminoácidos, nucleotídeos, ácidos orgânicos, acil-lipídeos e fitoesteróis. Enquanto que, o metabolismo secundário abrange espécies químicas que não parecem participar diretamente nos processos de crescimento e desenvolvimento vegetal (BUCHANAN, 2000).

As substâncias oriundas do metabolismo secundário foram inicialmente consideradas como subprodutos do metabolismo primário. Posteriormente, com o advento da tecnologia analítica, muitas funções foram elucidadas para estes compostos (FUNASAKI, 2006).

A composição dos metabólitos secundários nas plantas é resultado do balanço entre biossíntese e transformações que ocorrem durante o crescimento, em decorrência principalmente de fatores genéticos, ambientais e do manejo agrônomico utilizado (BOTREL et. al., 2010).

Desde o quarto século a.C haviam relatos sobre a preocupação quanto ao período de coleta de plantas que serviam para o tratamento de males diversos. Não demorou até que essas observações levassem os pesquisadores a concluir que os metabólitos secundários tem uma interface com o ambiente circundante de maneira tal que alterações no último afetam as concentrações dos primeiros (GOBBO-NETO e LOPES, 2007).

Segundo Silva (2006), metade dos 25 medicamentos mais vendidos do mundo tem sua origem em metabólitos secundários de origem vegetal.

Os produtos vegetais constituem-se modelos para a síntese de análogos mais potentes ou menos tóxicos, como é o caso do ácido acetilsalicílico. A produção dos metabólitos secundários tem sido realizada através de cultivo em campo, mas muitas plantas são de difícil adaptação fora do ecossistema originário, dessa forma a produção *in vitro* torna-se uma alternativa (FUNASAKI, 2006).

As principais vantagens da produção de metabólitos vegetais *in vitro* são

- a. a independência de fatores ambientais,

- b. o aumento do controle da produção,
- c. o uso de linhagens celulares que garanta uma qualidade consistente do produto,
- d. a viabilização econômica de produtos oriundos de espécies de difícil cultivo,
- e. a utilização de elicitores ou indutores no direcionamento da produção e
- f. o aproveitamento das biotransformações que ocorrem durante o cultivo de células vegetais *in vitro* (OGATA et al., 2004).

Os metabólitos secundários possuem estruturas moleculares diversas e complexas. Entretanto, a maioria desses compostos pertence a diferentes classes, com características estruturais particulares devido a sua rota biossintética (MEDRADO, 2011).

As principais classes de metabólitos secundários são policetídeos ou ácidos graxos, terpenoides e esteroides, fenilpropanoides, lignanas, flavonoides, alcaloides, aminoácidos e peptídeos especiais e carboidratos especiais (MEDRADO, 2011).

Os principais grupos de metabólitos secundários sabidamente são os alcaloides, os terpenoides e os flavonoides. Contudo, estudos recentes indicam que os lignoides ocupam posição de destaque devido à ampla distribuição no reino vegetal e à importância tanto para as plantas, quanto para o homem. Esta classe possui uma grande variação estrutural que implica diretamente na diversidade de classes encontradas na natureza tais como, lignanas.

### **2.5.1 Lignanas**

Como vários outros metabólitos secundários, as lignanas representam um meio de proteção contra herbívoros e microrganismos que as sintetizam (AYRES & LOIKE, 1990). Estas substâncias têm sido encontradas em diversas partes das plantas como as folhas, flores, frutos, cascas e raízes (UHLE, 2006).

Devido ao elevado número de lignanas distribuídas no reino vegetal, supõe-se que as propriedades biológicas dessas substâncias sejam essenciais ao desenvolvimento do próprio vegetal. Dessa forma, essas substâncias podem ser

aproveitadas pelo homem servindo de modelo para síntese de fármacos (BARROS, 2008).

O uso de plantas que produzem lignanas é recorrente na medicina tradicional da China e do Japão. Os ameríndios e os nativos do Himalaia também já conheciam os benefícios e os perigos do manuseio destas plantas (AYRES & LOIKE, 1990).

Em todo o mundo inúmeras atividades terapêuticas foram relacionadas com as lignanas, tais como, purgativa, vermífuga, analgésica, antipirética, antirreumática, diurética, antimicrobiana, antioxidante, e citotóxica (AYRES & LOIKE, 1990).

As lignanas também podem apresentar atividade estrogênica e antiestrogênica, dependendo da dose administrada, do tempo e do estágio de desenvolvimento. Estas podem depositar-se nos tecidos e influenciar o estado oxidativo de órgãos específicos como fígado e glândulas mamárias (SALES, 2009).

As lignanas clássicas e as neolignanas, os dois tipos de classificação tradicionais desses compostos, diferem entre si pelo padrão de ligação: as primeiras apresentam suas unidades fenilpropanoide ligadas por padrão  $\beta$ - $\beta'$  (8-8'), enquanto que as neolignanas possuem padrão de acoplamento diferentes deste. Seis subclasses compõem as lignanas clássicas: dibenzilbutanosídicas (A), dibenzilbutirolactônicas (B), arilnaftalênicas (C), dibenzociclooctadiênicas (D), tetrahidrofurânicas (E) e furofurânicas (F) (Figura 1). (PAN, 2009).

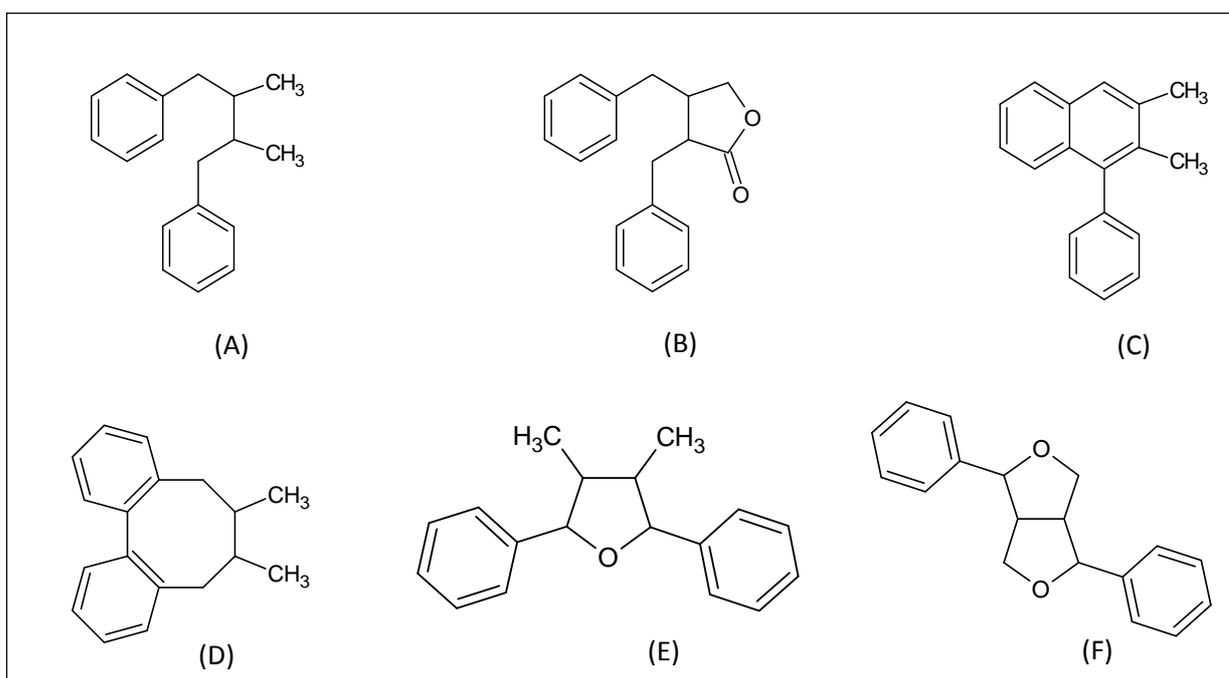


Figura 1: Subclasses de lignanas: dibenzilbutanosídicas (A), dibenzilbutirolactônicas (B),

A biossíntese destes compostos tem sido de grande interesse, principalmente, porque apresentam atividades biológicas de interesse clínico. Algumas são usadas na medicina e como suplementos nutricionais, tais como derivados semissintéticos da podofilotoxina em terapias contra o câncer e, a sesamina na saúde e na nutrição (SUZUKI & UMEZAWA, 2007)

As lignanas são produzidas a partir de unidades fenilpropanoídicas ( $C_6C_3$ ) via chiquimato. A condensação aldólica da D-eritrose-4-fosfato com o fosfoenolpiruvato (PEP) catalisada por enzima resulta no ácido chiquímico, cujo intermediário é o ácido 3-dehidroquímico. Este por sua vez sofre desidratação seguida de redução para formar o ácido chiquímico, como demonstrado na Figura 2 (DEWICK, 2002).

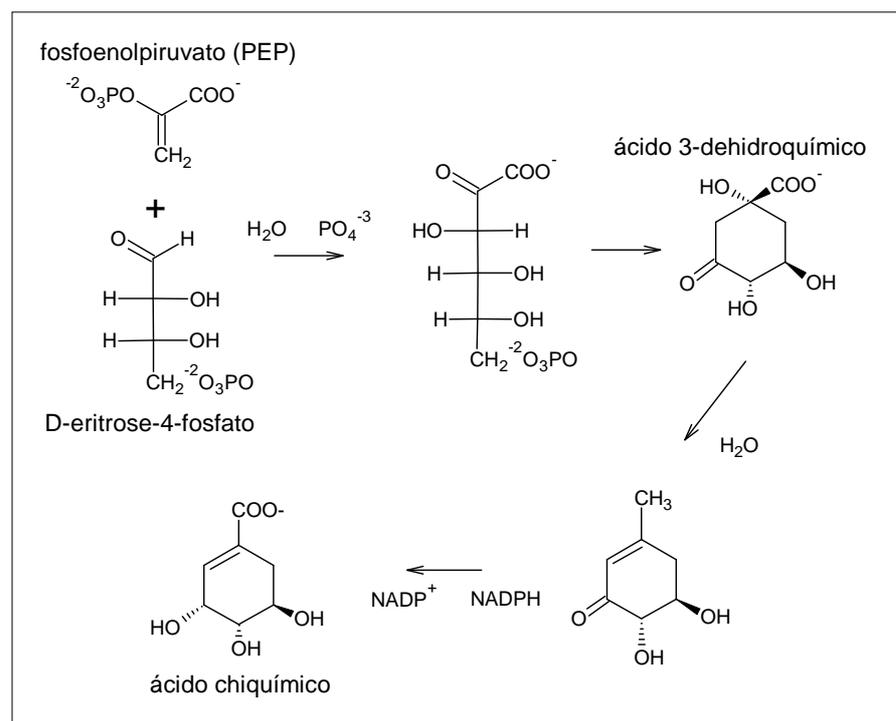


Figura 2: Biossíntese do ácido chiquímico (DEWICK, 2002).

Ocorre a formação do ácido corísmico através da adição do fosfoenolpiruvato ao ácido chiquímico e reações posteriores dão origem aos aminoácidos aromáticos (triptofano, fenilalanina e tirosina). A Fenilalanina sofre retirada de amônia para a formação do ácido cinâmico por meio da enzima fenilalanina amônio liase (PAL),

principal enzima da via do ácido chiquímico. Este último passa por sucessivas reações sendo duas oxidações consecutivas na presença de NADPH, uma

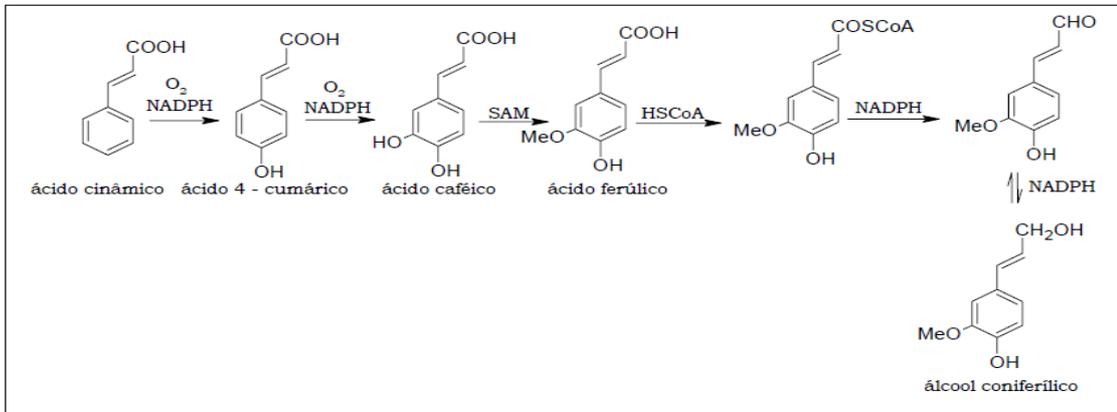


Figura 3: Formação do álcool coniferílico (DEWICK, 2002).

metilação, uma esterificação e duas reduções dando origem ao álcool coniferílico (Figura 3) (DEWICK, 2002).

Um elétron do grupo fenólico é então oxidado por uma peroxidase e resulta em estruturas ressonantes na cadeia lateral (Figura 4).

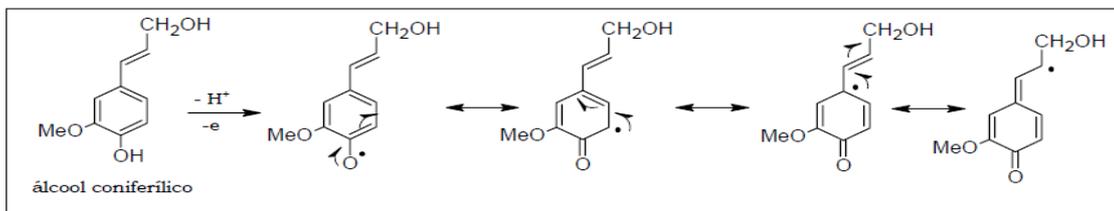


Figura 4: Estrutura ressonante (DEWICK, 2002).

Em seguida o álcool coniferílico oxidado sofre ataque nucleofílico de duas hidroxilas para formar o pinosresinol (Figura 5).

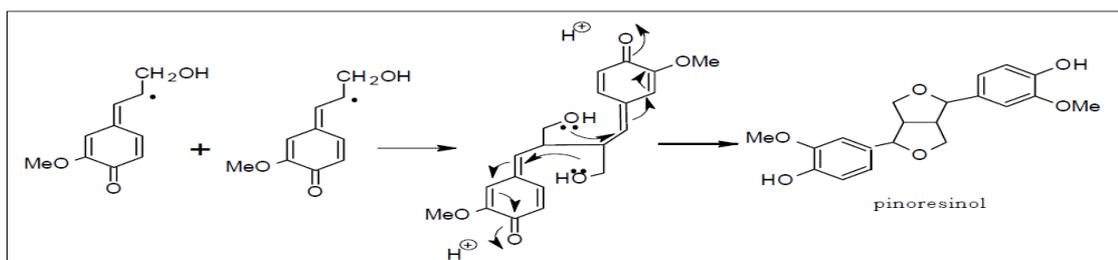


Figura 5: Formação do pinosresinol (DEWICK, 2002).

As etapas seguintes, a partir de duas moléculas de pinosresinol, levam a formação do (+)-lariciresinol e (-)-secoisolariciresinol, via pinosresinol lariciresinol redutase, através de reduções estereoseletivas sequenciais. O secoisolariciresinol é oxidado, pela secoisolariciresinol desidrogenase, formando (-)-matairesinol. Este último é considerado o precursor comum das chamadas podofilotoxinas. É então formada a yateína, seguido da desoxipodofilotoxina, que sob ação da desoxipodofilotoxina 6-hidrolase resulta na formação da  $\beta$ -peltatina e com a ação da desoxipodofilotoxina 7-hidrolase, forma-se a (-)-podofilotoxina (figura 10) (FUSS 2003, CANEL 2000).

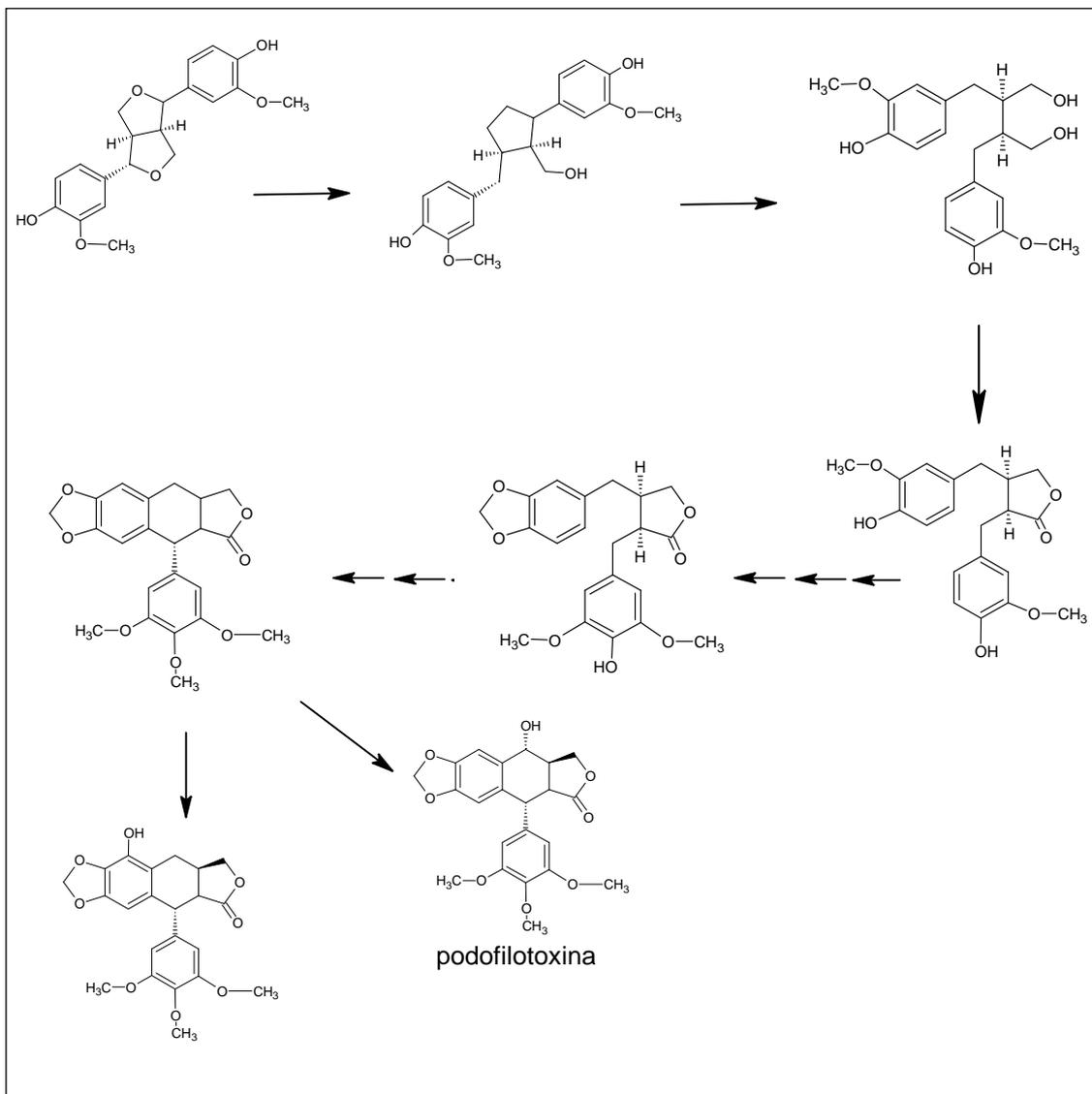


Figura 6: Biossíntese da podofilotoxina (BRANDÃO. 2010)

## 2.5.2 Podofilotoxina e derivados

A podofilotoxina é um composto farmacologicamente importante por sua atividade anticancerígena; tem como precursor a yateína e é um composto líder para a semisíntese de fármacos usados no tratamento de carcinomas, a saber: etoposide, teniposide e etopofos (Figura 7) (FARKYA, BISARIA e SRIVASTAVA, 2004).

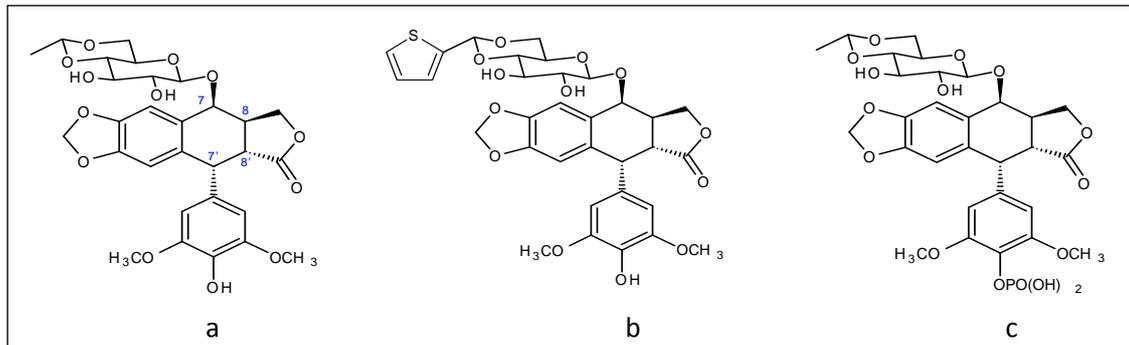


Figura 7: Estruturas do Etoposide (a), Teniposide (b) e Etopofos (c)

O maior efeito citotóxico da podofilotoxina é a inibição celular na metáfase, inibindo a separação dos cromossomos, o que resulta na retenção da divisão celular no estado mitótico do ciclo celular. Porém, devido ao fato destes efeitos atingirem tanto células normais como células cancerígenas, o seu uso tem sido limitado (DAVID, 2001).

Os derivados da podofilotoxina, o etoposide e teniposide induzem a quebra das ligações simples e duplas do DNA (DAVID, 2001). Estes se ligam a topoisomerase II levando ao bloqueio pré-mitótico no final da fase S ou no início da fase G<sub>2</sub>, dessa forma, impede que essa enzima repare as duas fitas de DNA que foram previamente quebradas (BRANDÃO et al, 2010).

O etoposide e o teniposide foram desenvolvidos na década de 1970 com o intuito de minorar o efeito tóxico gastrointestinal. Posteriormente, foram introduzidos no tratamento clínico com participação muito significativa no tratamento quimioterápico do câncer (BRANDÃO et al, 2010).

## 2.6 CONSIDERAÇÕES SOBRE A TÉCNICA DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA – CLAE

A invenção da cromatografia é atribuída ao botânico russo Mikhael Tswett no início do século XX. Esse método consiste na separação de misturas nas quais os

constituintes se distribuem entre duas fases, uma estacionária e outra móvel que percola através da primeira (LANÇAS, 2009).

Esta separação pode ocorrer sobre diferentes superfícies plana ou em tubo. Baseando na forma física do sistema cromatográfico classifica-se cromatografia planar ou cromatografia em coluna (LANÇAS, 2009). Outra classificação considera a fase móvel como parâmetro da separação (DEGANI, CASS & VIEIRA, 1998).

A cromatografia pode ser utilizada para a identificação de compostos por comparação com padrões previamente existentes, para a purificação de compostos, separando-se as substâncias indesejáveis e/ou componentes de uma mistura (DEGANI, CASS & VIEIRA, 1998).

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em menos de trinta anos, passou a ser um dos métodos analíticos mais utilizados para fins qualitativos e quantitativos. Este crescimento decorre da adaptabilidade para determinações quantitativas com boa sensibilidade, a possibilidade de separar espécies não voláteis e termicamente instáveis e podem ser utilizados em muitos campos da ciência, como o da medicina (TOHNI et al., 2002).

Atualmente, o uso de técnicas hífenadas ou técnicas acopladas contribui com estudos em produtos naturais de frações semipurificadas. Sua principal vantagem frente às técnicas espectroscópicas isoladas deve-se ao fato de utilizar pequenas concentrações do analito na sua forma purificada; Isto não acontece com as técnicas sem hífenação, que só são válidas após um protocolo de purificação (RODRIGUES et al, 2006)

Muitos laboratórios em todo o mundo utilizam de sistemas de CLAE em fase reversa (CLAE-FR) que consistem de uma fase estacionária de menor polaridade e uma fase móvel de maior polaridade, enquanto a fase normal tem as polaridades invertidas. Dentre as vantagens destes sistemas destaca-se maior rapidez em análises e boa reprodutibilidade dos tempos de retenção, além de usar água como solvente (TOHNI et al., 2002).

Separações analíticas são predominantemente realizadas em fase reversa, sendo a fase C18 (octadecilsílica) a mais usada, ao passo que são preferidas fases

que atuem no modo normal para fins preparativos, em vista de que separações no modo reverso utilizam fases móveis aquosas (DEGANI, CASS & VIEIRA, 1998).

### 3 MATERIAIS E METODOS

Os experimentos foram desenvolvidos no laboratório de cultura de tecidos da Central de Laboratórios da EBDA (LCTV-CLA/EBDA) e no laboratório de pesquisa em produtos naturais do Instituto de Química da UFBA (GPPN-IQ/UFBA).

#### 3.1 ESTABELECIMENTO IN VITRO DE *Leptohyptis macrostachys*

##### 3.1.1 Material vegetal

As sementes de *L. macrostachys* foram coletadas no município de Morro do Chapéu, região da Chapada Diamantina (Latitude: 11°35'53.0", Longitude: 041°09'49.5" e altitude: 1086 m). As exsicatas foram depositadas no Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS).

##### 3.1.2 Desinfestação

As sementes foram submetidas à desinfestação com imersão em álcool a 70% (1min), seguido de hipoclorito de sódio (1,0% de cloro ativo) com uma gota de detergente neutro (10min), finalizando com lavagem tripla em água destilada e autoclavada.

##### 3.1.3 Condições de cultivo *in vitro*

As sementes foram inoculadas em tubos de vidro 20cmx1,5cm contendo aproximadamente 10mL.

Para avaliar os experimentos de germinação foram analisados os parâmetros índice de velocidade de germinação (IVG), germinabilidade (G) e tempo médio.

Para avaliar os experimentos de multiplicação foram analisados os parâmetros quantidade de brotos, de folhas e de raízes, além de presença de calos friáveis, compactos ou oxidados.

Em todos os experimentos foi utilizado meio MS (Murashige e Skoog) com variações na concentração dos sais e diferentes suplementações. A composição do meio MS esta descrita no anexo A.

#### 3.1.3.1 Concentração dos sais do meio de cultura

Foram utilizados meio de cultura 1- MS com concentração total dos sais (MS completo), 2- MS com concentração reduzida à metade (MS ½) e 3- ausência dos sais do meio MS (ágar), todos suplementados com sacarose (3%) e solidificados com ágar (0,7%).

#### 3.1.3.2 Concentração da sacarose no meio de cultura

As sementes foram inoculadas em meio de cultura MS (Murashige e Skoog) com metade da concentração total dos sais (MS ½) sem suplementação, suplementados com 1,5% de sacarose ou 3% de sacarose, todos solidificados com ágar (0,7%).

#### 3.1.3.3 Avaliação do efeito do ácido giberélico

As sementes foram inoculadas em meio de cultura MS (Murashige e Skoog) com metade da concentração total dos sais, solidificado com 0,7% de ágar, suplementados com 3% de sacarose e 2,88µM, 5,77µM ou 11,55µM de ácido giberélico.

#### 3.1.3.4 Condições experimentais

O pH do meio de cultura foi ajustado para  $5,7 \pm 0,1$  antes da autoclavagem para todos os meios testados. As plantas foram mantidas a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  por 30 dias em sala de crescimento com umidade relativa de 60% e radiação fotossintética ativa de  $30\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

#### 3.1.3.5 Delineamento experimental

O delineamento experimental inteiramente casualizado com 5 repetições por tratamento, sendo cada repetição formada por 10 tubos para todos os experimentos (concentração de sais, concentração de sacarose e regulador vegetal). Para análise

dos dados foi utilizado o programa SISVAR (FERREIRA, 2011) testados a 5% de probabilidade e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey.

Foram avaliados germinabilidade (%), índice de velocidade de germinação e tempo médio de germinação (dias). Os tubos que apresentaram algum tipo de contaminação foram desprezados e as avaliações permaneceram até que não fossem registradas germinações por 4 dias seguidos totalizando 30 dias.

Depois uma semana as sementes germinadas mantidas em ágar foram transferidas para meio de cultivo MS completo e MS ½. As sementes germinadas em outros meios foram multiplicadas após 30 dias de cultivo (Figura 8).

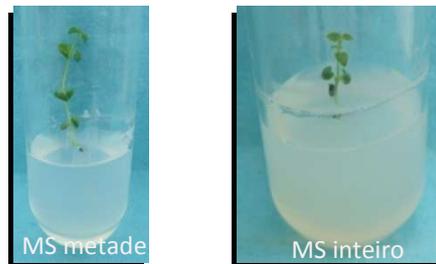


Figura 8: Plantas germinadas *in vitro* de *Leptohyptis macrostachys*.

### 3.2 MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE *Leptohyptis macrostachys*

As plantas germinadas *in vitro* nos diferentes meios testados com 30 dias de idade foram utilizadas como fonte de explantes.

#### 3.2.1 Condições de cultivo *in vitro*

Os explantes (região do nó) com aproximadamente 0,5cm de comprimento foram inoculados individualmente em tubos de ensaio com cerca de 10mL de meio de cultura.

##### 3.2.1.1 Concentração dos sais e de sacarose no meio de cultura

Os explantes foram inoculados em meio de cultura MS (Murashige e Skoog) com concentração total dos sais, e concentração reduzida à metade, ambos suplementados com sacarose 3%(p/v) ou 1,5% (p/v) e solidificado com ágar (0,7%).

As culturas foram mantidas a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  por 30 dias em sala de crescimento com umidade relativa de 60% e radiação fotossintética ativa de  $30\mu\text{mol.m}^2\text{s}^{-1}$ .

#### 3.2.1.2 Avaliação do efeito de BAP e ANA

Os explantes foram inoculados em meio de cultura MS com metade da concentração total dos sais, suplementados com 3% de sacarose e BAP (0, 4,44, ou  $8,88\mu\text{M}$ ) combinado com ANA (0, 5,37, ou  $10,74\mu\text{M}$ ) esolidificado com ágar. As culturas foram mantidas a  $25 \pm 3^\circ\text{C}$  por 30 dias em sala de crescimento com umidade relativa de 60% e radiação fotossintética ativa de  $30\mu\text{mol.m}^2\text{s}^{-1}$

#### 3.2.1.3 Avaliação do efeito da temperatura

Os explantes foram inoculados em meio de cultura MS com metade da concentração total dos sais, suplementados com 3% de sacarose e solidificado com ágar. As culturas foram mantidas a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  por 30 dias em sala de crescimento com umidade relativa de 60% e radiação fotossintética ativa de  $30\mu\text{mol.m}^2\text{s}^{-1}$  (controle) e a  $30 \pm 2^\circ\text{C}$  por 30 dias em sala de crescimento com umidade relativa de 60% e radiação fotossintética ativa de  $30\mu\text{mol.m}^2\text{s}^{-1}$ .

#### 3.2.1.4 Avaliação do fechamento dos tubos

Os explantes foram inoculados em meio de cultura MS com metade da concentração total dos sais, suplementados com 3% de sacarose e solidificado com ágar. Para esta condição foi considerado dois tipos de fechamento dos tubos de ensaio com PVC (não permite trocas gasosas) e com tampa de plástica (permite trocas gasosas). As culturas foram mantidas a  $25 \pm 3^\circ\text{C}$  por 30 dias em sala de crescimento com umidade relativa de 60% e radiação fotossintética ativa de  $30\mu\text{mol.m}^2\text{s}^{-1}$ .

#### 3.1.2.5 Avaliação do fotoperíodo

Os explantes foram inoculados em meio de cultura MS com metade da concentração total dos sais, suplementados com 3% de sacarose e solidificado com ágar. As plantas foram mantidas a  $25 \pm 3^\circ\text{C}$  por 30 dias em sala de crescimento com umidade relativa de 60% e radiação fotossintética ativa de  $30\mu\text{mol.m}^2\text{s}^{-1}$ , com fotoperíodo de 16h/luz para o grupo controle e 8h/luz para o grupo teste.

### 3.1.2.6 Condições experimentais

O pH dos meios de cultura foi ajustado para  $5,7 \pm 0,1$  antes da autoclavagem.

### 3.1.2.7 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco repetições por tratamento, sendo cada repetição formada por 20 tubos para todos os experimentos os concentração de sais x concentração de sacarose, temperatura, fechamento dos tubos e fotoperíodo). O experimento com BAP e ANA foi elaborado em arranjo fatorial 3x3. Para análise dos dados foi utilizado o programa SISVAR (FERREIRA, 2011) testados a 5% de probabilidade e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey.

### 3.1.2.8 Parâmetros avaliados

Foram feitas avaliações semanais nas quais se considerou: a quantidade de brotos raízes e folhas, friabilidade e oxidação de calos, além das análises de determinação de podofilotoxina e yateína.

### 3.1.2.9 Fitoquímica

A metodologia que se fez uso neste trabalho para as análises fitoquímicas foi desenvolvida por Brandão(2010) quando este estabeleceu o método para determinação das lignanas podofilotoxina,  $\alpha$ -peltatina,  $\beta$ -peltatina,  $\alpha$ -peltatina-5-O- $\beta$ -D-glicopiranosídeo e yateína, em 38 espécimes de vegetais.

#### a. Preparação dos extratos

As plantas cultivadas *in vitro* foram secas em estufa de circulação de ar quente a 40°C por 48h. Para realizar a extração foram acrescentados 15mL de etanol à cada 2g de planta seca e rasurada e mantida a 40°C por 2h, sob agitação.



Figura 9: Extratos em processo de secagem.

Após este período procedeu a filtração, na qual o resíduo foi desprezado e o filtrado levado a secura completa em capela de exaustão. O extrato seco foi então ressuspendido e particionado com água e acetato de etila (1:1). Com o objetivo de exaurir o extrato esta etapa foi repetida. A fase acetato de etila resultante foi dividida ao meio e o solvente evaporado.



Figura 10: Partição acetato de etila e água (1:1).

Logo após o extrato semipurificado foi dissolvido em 10mL de solução aquosa de acetonitrila (8:2 – água:acetonitrila) e pré-concentrado em cartucho Sep-pak C<sub>18</sub>. O produto retido no cartucho foi recuperado com 10mL de acetonitrila em frasco mensurado e levado a secar. Em seguida o material foi redissolvido em metanol, filtrado em membrana 0,22µm (Supelco USA) e injetado no CLAE em triplicata. (BRANDÃO, 2010).



Figura 11: Pré-concentração em cartucho Sep-pak C<sub>18</sub> (Mane Fold).

#### b. Equipamentos e padrões

Para a realização das análises cromatográficas foi utilizado CLAE Shimadzu® modelo 2010 com autoinjeter modelo SIL-10AD, bomba de solvente modelo SCL-10AVP e detector UV-VIS SPD-M10A, Corp., Kyoto, Japão. A separação cromatográfica foi realizada com coluna LiChroCART Purospher Star® RP18-e (50 mm x 4 mm i.d.) (3µm) (Merck, Darmstadt, Germany) combinado com pré-coluna LiChroCART 4-4 LiChrospher 100RP18 (3µm) da Merck.

Os padrões utilizados foram podofilotoxina(Sigma-Aldrich /USA) e yateína (isolada no Grupo de Pesquisa em Produtos Naturais – GPPN – UFBA).

#### c. Condições de análise

Utilizou-se como fase móvel metanol, água, acetonitrila e ácido acético, grau HPLC. O gradiente de eluição, formado pelas fases A (MeOH:H<sub>2</sub>O:MeCO<sub>2</sub>H 14:85:1) e solvente B (MeCN) inicial (t=0) foi 8:2, diminuindo progressivamente para 7,8:2,2 aos 8 minutos de corrida , 7:3 aos 12 minutos e 5,5:4,5 aos 18 minutos. A corrida completa durou 22 minutos com um fluxo 0,8mL/min e volume de injeção de 2µL à temperatura ambiente.

A faixa de leitura do detector de arranjo de diodo foi estabelecida em 210 à 400nm e a aquisição cromatográfica foi definida em 290nm. Comparando os tempos de retenção dos padrões e das amostras, bem como os espectros do Ultra Violeta procedeu a identificação das lignanas (BRANDÃO, 2010).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE *Leptohyptis macrostachys*

#### 4.1.1 Concentração dos sais do meio de cultura

O protocolo de assepsia das sementes foi eficiente com taxa de contaminação inferior a 1%. A emissão de radícula iniciou após sete dias de inoculação (Figura 12).



Figura 12: Emissão de radícula de sementes de *Leptohyptis macrostachys*.

Não houve de diferença significativa entre os tratamentos Água + Agar MS metade e MS inteiro para as variáveis germinabilidade (G) e índice de velocidade de germinação (IVG) (Tabela 1).

Tabela 1: Resumo da Análise de variância para índice de velocidade de germinação (IVG), germinabilidade (G) e tempo médio de germinação (Tm) de *Leptohyptis macrostachys* em função da concentração dos sais no meio de cultura.

Fonte de variação	GL	Quadrados médios		
		IVG <sup>z</sup>	G <sup>z</sup>	Tm
Tratamento	2	0,0003 <sup>ns</sup>	0,0003 <sup>ns</sup>	28,8394*
Resíduo	12	0,0124	0,0005	6,6750
CV (%)		9,36	2,09	20,39

<sup>ns</sup>: Não há diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey; <sup>z</sup> A estatística foi realizada em médias transformadas em  $\sqrt{x} + 1$ .

Os menores resultados para a variável tempo médio de germinação (Tm) foram verificados em meio ágar e não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos Ágar e MS metade (Tabela 2).

Tabela 2: Médias das variáveis índice de velocidade de germinação (IVG), germinabilidade (G) e tempo médio de germinação (Tm) de *Leptohyptis macrostachys* em função da concentração dos sais no meio de cultura.

Meio de cultura	IVG	G	Tm
Ágar	1,1983 a	1,0410 a	10,2286 b
MS ½	1,1826 b	1,0408 b	12,7452 ab
MS completo	1,1877 b	1,0545 b	15,0300 a
Médias	1,1895	1,0454	12,6679

Médias seguidas pela mesma letra minúscula em cada coluna, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

A presença de sais nos meios de cultivo retarda o Tm de *L. macrostachys*, contudo, o IVG e G não sofreram influência significativa. A adição de macronutrientes e fontes de carbono ao meio de cultura implicam em considerável decréscimo do potencial osmótico do meio (GEORGE, 1993 *apud* REIS et al, 2008). Em decorrência deste fenômeno, a disponibilidade de água para o processo de embebição da semente na germinação também pode ter sido reduzida. Isso pode ter resultado num maior tempo médio de germinação para as sementes expostas ao meio com maior concentração de sais.

De acordo com Santos (2011) a concentração dos sais do meio de cultura influencia a protrusão da radícula de sementes de *Hyptis leucocephala* germinando em meio MS com metade da concentração dos sais. Em sementes de cambuzeiro (*Myrciaria tenella*) esta influência também foi observada, Barin, Ledo e Silva (2012) registram 100% de germinação na ausência de sais do meio de cultivo.

Para embriões de macaúba, *Acrocomia aculeata*, o meio WPM (45% da concentração de sais do meio MS) foi considerado mais indicado para o cultivo. Guimarães et al (2012) atribuíram aos sais presentes no meio MS a redução do IVG, da porcentagem de germinação bem como do comprimento do médio dos embriões zigóticos de *Acrocomia aculeata*.

#### 4.1.2 Concentração de sacarose no meio de cultura

A emissão de radícula iniciou após quatro dias de inoculação. Após 30 dias de cultivo as plantas foram multiplicadas para meios de cultivo semelhantes aos de origem exceto meio de cultivo sem suplementação de sacarose. Não houve diferença significativa entre os tratamentos ausência de sacarose ou suplementação

Fonte de variação	GL	Quadrados médios		
		IVG	G	Tm
Tratamento	2	0,1065	0,1102	1,484 <sup>ns</sup>
Resíduo	12	0,0035	0,0040	1,4328
CV (%)		5,28	5,54	37,62

com 1,5% de sacarose e 3,0% de sacarose para a variável tempo médio de germinação (Tm) (Tabela 3).

Tabela 3: Resumo da Análise de variância para índice de velocidade de germinação (IVG), germinabilidade (G) e tempo médio de germinação (Tm) de *Leptohyptis macrostachys* em função da concentração de sacarose.

<sup>ns</sup>: não há diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as médias das variáveis índice de velocidade de germinação (IVG) e germinabilidade (G) para o tratamento cujo meio não foi suplementado com sacarose e o que teve adição 3,0% de sacarose. O tempo médio de germinação (TMG) não diferiu para todos os tratamentos. As maiores médias foram verificadas para o tratamento que possuía 1,5% de sacarose em todos os parâmetros (Tabela 4).

Tabela 4: Médias das variáveis índice de velocidade de germinação (IVG), germinabilidade (G) e tempo médio de germinação (Tm) de *Leptohyptis macrostachys* em função da concentração de sacarose.

Sacarose (%)	IVG*	G <sup>z</sup>	Tm <sup>z</sup>
0,0	1,0320 a	1,0396 a	2,5110 a
1,5	1,2875 a	1,3005 a	3,5165b
3,0	1,0474 a	1,0577 a	3,2155 a

Médias seguidas pela mesma letra minúscula em cada coluna, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.<sup>z</sup> A estatística foi realizada em médias transformadas em  $\sqrt{x} + 1$ .

A suplementação do meio de cultura com 1,5% de sacarose favoreceu IVG e G, mas não alterou o Tm em relação aos demais tratamentos. De acordo com Paiva-Neto e Otoni (2003) a contribuição osmótica da fonte de carbono tem relação inversa com a concentração da mesma. Em outras palavras, a elevada concentração de sacarose pode levar a perda de água da semente para o meio hipertônico em decorrência da pressão osmótica. Este fenômeno pode ter levado ao aumento de G e IVG para o tratamento com 3,0% de sacarose.

Reis et al (2008) estudando a influência da sacarose na germinação de *Melissa officinalis* sugeriram que pelo fato da semente já possuir alguma reserva de carboidrato foi possível a emissão da radícula na ausência de sacarose. Ao passo que a suplementação com 3% de sacarose pode ter levado a uma excessiva contribuição osmótica ou até à toxicidade do carboidrato. Assim também pode ter ocorrido com a germinação de *Leptohyptis macrostachys*.

No estudo com *Melissa officinalis* L. foi observado que os melhores resultados para porcentagem de germinação, comprimento da parte aérea e IVG foram obtidos quando o meio era suplementado com 1,5% de sacarose independente da concentração de sais do meio de cultivo (REIS et al, 2008).

Entretanto a adição de sacarose no meio de cultura não favorece a germinação de sementes de mangaba. As melhores taxas de germinação, neste estudo, foram observadas na ausência de sacarose e suplementadas com 10g L<sup>-1</sup> (1%) (PINHEIRO et al, 2001).

Na germinação de murici pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.), Nogueira et. al (2004) observaram que o acréscimo de sacarose nos meios testados alterou as porcentagens de germinação pela influência no balanço osmótico.

#### **4.1.3 Avaliação do efeito do ácido giberélico**

A emissão de radícula iniciou ao segundo dia para as sementes inoculadas em meio suplementado com a maior concentração de ácido giberélico e, para essa concentração, as sementes permaneceram germinando por maior período de

tempo. Houve diferença estatisticamente significativa ao nível de probabilidade de 0,05 pelo teste de Tukey para todas as variáveis (Tabela 5).

Tabela 5: Resumo da Análise de variância para índice de velocidade de germinação (IVG), germinabilidade (G) e tempo médio de germinação (Tm) de *Leptohyptis macrostachys* em função da concentração do regulador vegetal (Ácido giberélico – GA<sub>3</sub>).

Fonte de variação	GL	Quadrados médios		
		IVG <sup>z</sup>	G <sup>z</sup>	Tm <sup>z</sup>
Tratamento	3	0,2926*	0,0793*	2,9751*
Resíduo	16	0,0230	0,0054	0,3207
CV (%)		11,92	6,41	28,38

\*diferencia estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.<sup>z</sup> A estatística foi realizada em médias transformadas em  $\sqrt{x} + 1$ .

O IVG para os tratamentos sem adição de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) e com adição de 2,88µM não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade. O mesmo ocorre com os meios suplementados com 5,77µM e 11,55µM. Para esta variável foi observado que os aumentos das médias são diretamente proporcionais a concentração de GA<sub>3</sub>.

Para a variável germinabilidade foi obtida menor média para o meio sem adição do regulador vegetal que não difere estatisticamente daquela do meio com 2,88µM de giberilina e, é maior do que a média para o tratamento com 11,55µM que não difere estatisticamente do meio com 5,77µM de GA<sub>3</sub>. Este último não difere estatisticamente do meio suplementados com 2,88µM.

O menor tempo médio foi observado com ausência de GA<sub>3</sub> que não difere significativamente do meio suplementado com 2,88µM. Apesar de apresentar a maior média para este parâmetro, o resultado da adição de 11,55µM não difere estatisticamente dos meios com 2,88 µM e 5,77 µM de GA<sub>3</sub> (Tabela 6).

Tabela 6: Médias das variáveis índice de velocidade de germinação (IVG), germinabilidade (G) e tempo médio de germinação (Tm) de *Leptohyptis macrostachys* em função da concentração do regulador vegetal (Ácido giberélico – GA<sub>3</sub>).

GA <sub>3</sub> (µM)	IVG	G	Tm
0,00	1,0000 b	1,0000 c	1,0000 b
2,88	1,1422 b	1,0979 bc	1,7727 ab
5,77	1,4292 a	1,2076 ab	2,5732 a

11,55

1,5170 a

1,2880 a

2,6363 a

Médias seguidas pela mesma letra minúscula em cada coluna, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

De acordo com Melo et al. (1979), o tratamento de sementes com giberelinas pode promover a germinação. Por meio do aumento na produção de hidrolases, como proteases e  $\alpha$ -amilases que degradam a camada de aleurona de sementes com endosperma esse processo pode ser acelerado (LEITE & HEBLING, 2007).

Fisiologicamente, os hormônios podem estar relacionados com o desenvolvimento das sementes ou podem estar sendo acumulados para a sua subsequente participação no controle da germinação e crescimento da planta (BEWLEY & BLACK, 1983). Neste estudo a presença de ácido giberélico no meio aumentou tanto a germinabilidade e o IVG, quanto o tempo médio de germinação.

Pinheiro et al (2001), conseguiram favorecer a germinação de sementes de mangaba (*Harcornia speciosa*) quando tratadas com 0,1mg/L de ácido giberélico. Para Peixoto et al. (2011) que estudaram a ação da giberilina em sementes ex vitro estimulou a percentagem de primeira contagem, o índice de velocidade de emergência e a percentagem de emergência. Sementes de lavanda (*Lavandula angustifolia* Miller) tratadas com GA<sub>3</sub>, tanto à 288 como 577  $\mu$ M, aumentam a percentagem de germinação (AOYAMA, .ONO & FURLAN, 1996)

Em *Cattileya warnerii*, contudo, Leite e Hebling (2007) observaram que as concentrações de 5, 10 e 20mg/L de giberilina adicionadas ao meio de cultura não estimularam a germinação quando mantidas em fotoperíodo de 16h e atribuíram a uma possível toxicidade às concentrações utilizadas de ácido giberélico.

## 4.2 MULTIPLICAÇÃO IN VITRO DE *Leptohyptis macrostachys*

### 4.2.1 Concentração dos sais e sacarose no meio de cultura

Não foi observado efeito significativo da concentração dos sais e da sacarose para as variáveis analisadas: número de folhas em todas as fontes de variação. Para a quantidade de raízes não houve diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade, nas fontes de variação: concentração de sacarose e interação sais x sacarose (Tabela 7).

Tabela 7: Resumo da Análise de Variância para número de brotos, número de folhas e número de raízes de *Leptohyptis macrostachys* em função da concentração de sais x concentração de sacarose.

Fonte de variação	GL	Quadrados médios		
		Nº de Brotos	Nº de folhas	Nº de Raízes <sup>z</sup>
Conc. Sais	1	3,2160	32,0045 <sup>ns</sup>	0,0974
Conc. Sac	1	3,0109	0,2880 <sup>ns</sup>	0,0015 <sup>ns</sup>
Sais x Sac	1	2,1912	33,5405 <sup>ns</sup>	0,0130 <sup>ns</sup>
Resíduo	16	0,4065	11,7404	0,0058
CV (%)		12,29	12,37	6,93

<sup>ns</sup> não há diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. <sup>z</sup> A estatística foi realizada em médias transformadas em  $\sqrt{x} + 1$ .

No que se refere a concentração dos sais a variável quantidade de raízes evidenciou maiores médias para o meio MS ½ (Tabela 8).

Tabela 8: Médias da variável número de raízes de *Leptohyptis macrostachys* em função da concentração dos sais.

Tratamentos	Qtde de Raízes
MS ½	1,1672 a
MS completo	1,0276 b

Médias seguidas pela mesma letra minúscula em cada coluna não diferem entre si nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

A análise da interação entre concentração de sais e concentração de sacarose dos meios de cultivo demonstrou que apenas os tratamentos MS completo suplementado com 1,5% ou 3,0% de sacarose apresentaram diferença significativa entre si (Tabela 9).

O número de brotos foi em média maior quando inoculado o explante em meio MS completo com 1,5% de sacarose, se comparado ao meio MS ½ com mesma suplementação de sacarose e ao meio MS completo com 3,0% de sacarose. Os demais tratamentos não apresentaram diferença estatisticamente significativa (Tabela 9)

Tabela 9: Número de brotos de *Leptohyptis macrostachysem* diferentes concentrações de sais e sacarose.

Sacarose (%)	Quantidade de brotos	
	Concentração dos sais no meio de cultura	
	MS ½	MS completo
1,5	4,8440 Ba	6,3080 Aa
3,0	4,7300 Aa	4,8700 Ab
Média	4,7870	5,5890

Os valores seguidos pela mesma letra minúscula não diferem entre si na vertical, seguidos pela mesma letra maiúscula não diferem entre si na horizontal.

Não foi evidenciada a presença de calos para nenhum tratamento conforme mostra a Figura 14.

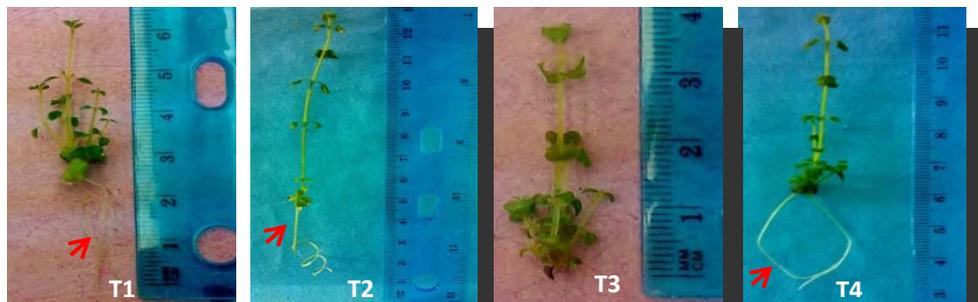


Figura 13: Plantas cultivada *in vitro* T1= MS metade 1,5% de sacarose ; T2= MS metade 3,0% de sacarose; T3= MS inteiro 1,5% de sacarose; T4= MS inteiro 1,5% de sacarose. Raízes indicadas por setas.

O excesso de sacarose pode inibir a síntese de clorofila, e dessa forma, reduzir a capacidade fotossintética das culturas, mesmo sendo este componente essencial ao crescimento da planta (YAMADA & SATO, 1978 apud RIBEIRO et al, 2008). A concentração de sacarose também afeta a assimilação de nitrogênio do meio de cultura pelas células (NAGAO, PASQUAL e RAMOS, 1994; MALDANER et al., 2006). Torres Caldas e Buzo (1998) atribuem ao nitrato a manutenção de boas taxas de crescimento.

Apesar de não apresentar brotos com maiores dimensões – conforme observado em MS ½ suplementado com 3,0% de sacarose (Figura 16 T2) – o meio MS completo suplementado com 1,5% de sacarose favoreceu a brotação em número.

Catapan Otuki e Viana (2001) estudando *Phyllanthus stipulatus* – quebra-pedra – também conseguiu maior número de brotos utilizando meio MS ½. Taylor e Standen (2001) obtiveram maiores brotos tratando as plantas com maiores

concentrações de sacarose. *Zantedeschia aethiopica* (copo de leite) apresentou maior número (3,5) e comprimento de brotos (3,4 cm) ao ser cultivada em meio MS com 125% da concentração dos sais e suplementado com 3% de sacarose.

Durante o enraizamento, a fotossíntese realizada pelos explantes nas condições *in vitro* é relativamente baixa, e como a formação de raízes é um processo que requer energia, o fornecimento de carboidratos é quase sempre necessário assim como o de macro e micronutrientes, contudo, o excesso destes pode prejudicar o enraizamento (ERIG, SCHUCH & CHAVES, 2004).

Foi observado que o maior número das raízes estava presente em meio MS com metade da concentração dos sais. Neste tratamento a maioria destas apresentavam aproximadamente 1,0cm de comprimento.

Ao contrário do observado neste estudo Catapan, Otuki e Viana (2001) obtiveram maior número de raízes quando *Phyllanthus stipulatus* foi cultivada em MS completo. Por outro lado, Sorace et al (2008) obtiveram maior número de raízes com metade da concentração dos macronutrientes no meio MS suplementado com 4% de sacarose.

Erig, Schuch e Chaves (2004) observaram para as duas cultivares de *Cydonia oblonga* (MC e Adams) que 75% da concentração total dos sais do meio MS é suficiente para a obtenção da maior percentagem de enraizamento, número médio de raízes e comprimento médio de raízes.

#### **4.2.2 Avaliação do efeito de BAP e ANA**

As variáveis número de brotos, número de folhas, número de raízes e calos oxidado apresentaram diferença estatisticamente significativa ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. As variáveis calos friáveis e compactos não apresentaram diferença estatisticamente significativa para a fonte de variação BAP (Tabela 10).

Tabela 10: Resumo da análise de variância para número de brotos, número de folhas, número de raízes, calos friável, calos compacto e calos oxidado em função dos reguladores vegetais (BAP x ANA).

Fonte de variação	GL	Quadrados médios					
		Nº de Brotos	Nº de folhas	Nº de Raízes	Calos		
					Friável <sup>z</sup>	Compacto	Oxidado
BAP	2	66,4310**	370,4827**	30,7024**	0,0012 <sup>ns</sup>	0,0199 <sup>ns</sup>	0,0080**
ANA	2	205,7082**	1320,0122**	7,1190**	0,0084**	0,9005**	0,0116**
BAP X ANA	4	105,2086**	693,6265**	7,1190**	0,0034**	0,1950**	0,0099**
Resíduo	36	2,5434	21,1046	0,5775	0,0004	0,0092	0,0006
CV (%)		27,55	21,25	29,09	1,99	39,47	2,28

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey; \*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey; <sup>ns</sup>: não há diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos ; <sup>z</sup> A estatística foi realizada em médias transformadas em  $\sqrt{x} + 1$ .

O número de brotos na ausência de BAP aumentou com a concentração de ANA. Quando o meio foi suplementado com 4,44 $\mu$ M de BAP ocorreu o inverso, o número de brotos é inveramente proporcional à concentração de ANA. A adição de ANA ao meio contendo 8,88 $\mu$ M de BAP inibiu a produção de brotos. A maior média foi evidencia para o explante mantido em meio suplementado apenas com 8,88 $\mu$ M de BAP (Tabela 11).

Na ausência de ANA o número de brotos apresentado com 4,44 e 8,88 $\mu$ M de BAP não diferem entre si. Quando o meio é suplementado com 5,37 $\mu$ M de ANA a adição de 4,44 $\mu$ M de BAP favorece a brotação e o aumento ou a falta deste regulador diminui significativamente. Por outro lado, ao suplementar o meio com 10,74 $\mu$ M de ANA a adição de BAP reduz onúmero de brotos (Tabela 11).

Tabela 11: Número de brotos de *Leptohyptis macrostachysem* diferentes concentrações de BAP e ANA.

ANA $\mu$ M	BAP $\mu$ M		
	0,00	4,44	8,88
0,00	2,1300 Bb	14,5960Aa	13,4640 Aa
5,37	2,7500 Bb	6,0400 Ab	1,9800 Bb
10,74	5,7680 Aa	2,5420 Bc	2,8200 Bb
<b>Média</b>	3,5489	7,7260	6,0880

Os valores seguidos pela mesma letra minúscula não diferem entre si em cada coluna, seguidos pela mesma letra maiúscula não diferem entre si em cada linha.

Para variável número de folhasa maior média foi obtida no meio suplementado apenas com 8,88 $\mu$ M de BAP. Na ausencia de BAP a quantidade de folhas aumenta com a concentração de ANA. Ao fixar a concentração de BAP em

4,44 $\mu$ M ou 8,88 $\mu$ M onúmero de folhas é inversamente proporcional à concentração de ANA (Tabela 12).

Na ausência de ANA esta variável é diretamente proporcional à concentração de BAP. Na presença de 5,37 $\mu$ M de ANA a adição de 4,44 $\mu$ M de BAP favorece onúmero de folhas, porém o dobro desta concentração reduz de modo a não diferir do tratamento sem BAP. (Tabela 12).

Tabela 12: Número de folhas de *Leptohyptis macrostachys* em diferentes concentrações de BAP e ANA.

ANA $\mu$ M	BAP $\mu$ M		
	0,00	4,44	8,88
0,00	15,4460 Bb	40,5940 Aa	41,3220 Aa
5,37	12,7800 Bb	27,5820 Ab	8,7200 Bb
10,74	22,9740 Aa	12,5920 Bc	12,6000 Bb
<b>Média</b>	17,0667	26,9227	20,8807

Os valores seguidos pela mesma letra minúscula não diferem entre si em cada coluna, seguidos pela mesma letra maiúscula não diferem entre si em cada linha.

Gratapagliae Machado (1998) afirmaram que concentrações excessivas de auxina no meio de cultura podem inibir a multiplicação ou favorecer demasiadamente o enraizamento ou a formação de calos em detrimento à multiplicação.

Neste estudo foi observado que a medida que aumentava a concentração de auxina havia aumento donúmero de brotos e folhas. Isso leva a crer que a concentração de auxina ainda pode ser aumentada para que esse fenômeno seja observado, ou seja, as concentrações de auxina aqui utilizadas foram insuficientes para causar inibição. No entanto, quando combinados BAP x ANA, a auxina reduzo número de brotações.

O maior número de brotos foi verificada para 4,44 $\mu$ M de BAP. Assim, a presença de BAP se faz necessária para a indução de brotação e a interação dos reguladores vegetais não favoreceu a brotação de *Leptohyptis macrostachys*.

Reis et al.(2008) trabalhando com *Melissa officinalis* L. constataram que plantas subcultivadas em meio MS contendo 4,44 $\mu$ M de BAP apresentaram maior número de brotos.

Ao contrário do observado para *L. macrostachys*, a regeneração de brotos a partir dos segmentos internodais em *Manihot esculenta* foi menos efetiva em meio contendo 0,44µM de BAP (LIMA et al., 2002).

Em *Achmea ramosa* os melhores resultados para a porcentagem de explante responsivos à indução de brotos foram obtidos após 60 dias de cultivo nos meios MS com 2,0 µM ANA + 2,0 µM BAP (63, 3%) e 2,0 µM ANA + 4,0 µM BAP (60,0%), indicando que essas condições foram favoráveis às melhores respostas morfogênicas (FARIA, 2011)

A presença de BAP no meio de cultivo inibiu ao enraizamento. Foram observadas raízes tanto no controle como nas duas concentrações de ANA, sendo que quanto maior o número de ANA no meio, tanto maior a média de número de raízes (Tabela 13).

Tabela 13: Número de raízes em explantes de *Leptohyptis macrostachys* em diferentes concentrações de BAP e ANA.

ANA µM	BAP µM		
	0,00	4,44	8,88
0,00	0,0920 Bb	0,0000 Aa	0,0000 Aa
5,37	3,6300 Aa	0,0000 Aa	0,0000 Aa
10,74	3,7120 Aa	0,0000 Aa	0,0000 Aa
<b>Média</b>	2,4780	0,0000	0,0000

Os valores seguidos pela mesma letra minúscula não diferem entre si em cada coluna, seguidos pela mesma letra maiúscula não diferem entre si em cada linha.

Houve discreto enraizamento no grupo controle (Figura 15) levando a crer que existem auxinas endógenas proporcionando o surgimento de raízes. A inibição de enraizamento observada na presença de BAP no meio de cultivo pode sugerir que existam citocininas endógenas levando a toxicidade frente ao acréscimo destas.

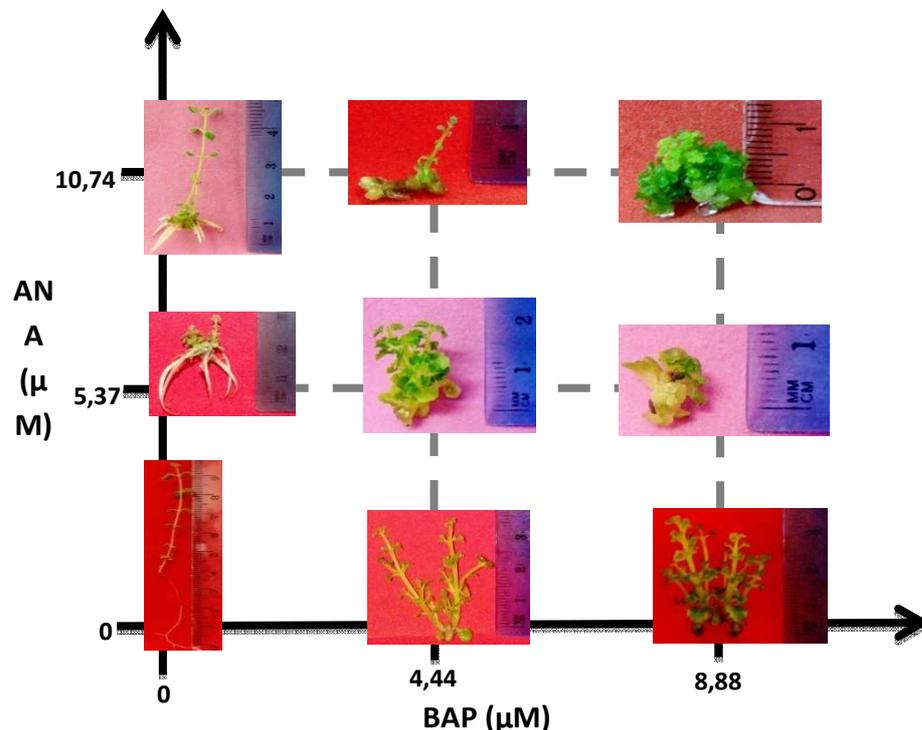


Figura 14: Plantas cultivadas *in vitro* por 30 dias em experimento de reguladores vegetais.

Segundo Assis e Teixeira (1998), as auxinas são as principais responsáveis pela rizogênese, têm no ANA e no AIB (Ácido Indolbutírico) seus representantes mais utilizados. Todavia, o comportamento das plantas frente às auxinas não são universais; certas espécies, principalmente as lenhosas, enraízam com dificuldade ou não enraízam, mesmo na presença de auxinas e algumas espécies até dispensam o uso de reguladores de crescimento no seu enraizamento (SOARES et al 2007).

Barbosa, Caldas & Souza (2004) observaram que tratamentos com reguladores de crescimento promoveram arizogênese *in vitro* em 100% dos brotos do híbrido de abacaxizeiro PExSC-52 produzidos em meio com BAP ou com BAP + ANA.

Estudando a estabelecimento *in vitro* de *Carica papaya* Teixeira e Teixeira (2004) avaliaram a influência de BAP e ANA na organogênese de moringa. Observaram que nenhuma das concentrações de ANA (0,27; 0,54; 0,81 ou 1,07  $\mu\text{M}$ ) proporcionou enraizamento dos explantes.

Os calos friáveis não foram observados ou tiveram pequena frequência em todos os tratamentos (Figura 14). O aumento da concentração de ANA na ausência

de BAP aumenta o número de calos presentes nos tratamentos. Na concentração 4,44 $\mu$ M de BAP apenas combinado com 10,74 $\mu$ M de ANA que houve produção significativa deste calos (Tabela 14).

Tabela 14: Calos friáveis em explantes de *Leptohyptis macrostachysem* diferentes concentrações de BAP e ANA.

ANA $\mu$ M	BAP $\mu$ M		
	0,00	4,44	8,88
0,00	1,0049 Aa	1,0000 Aa	1,0000 Aa
5,37	1,0196 Aa	1,0000 Aa	1,0148 Aa
10,74	1,0198 Ba	1,0909 Ab	1,0294 Ba
<b>Média</b>	1,0148	1,0303	1,0205

Os valores seguidos pela mesma letra minúscula não diferem entre si em cada coluna, seguidos pela mesma letra maiúscula não diferem entre si em cada linha.

Os calos compactos não foram visualizados na ausência de ANA em nenhuma concentração de BAP. A junção de 5,37 $\mu$ M de ANA a 4,44  $\mu$ M de BAP parece inibir a produção de calos compactos, ao passo que o aumento da concentração de BAP em duas vezes favorece essa variável analisada. Ao fixar a concentração de ANA em 10,74 $\mu$ M ocorre o inverso. A concentração de 8,88 $\mu$ M de BAP, desta vez, parece inibir a produção do calos enquanto que metade desta favorece. (Tabela 15).

Tabela 15: Calos compactos em explantes de *Leptohyptis macrostachysem* diferentes concentrações de BAP e ANA.

ANA $\mu$ M	BAP $\mu$ M		
	0,00	4,44	8,88
0,00	0,0000 Ac	0,0000 Ab	0,0000 Ac
5,37	0,2700 Bb	0,0000 Cb	0,4500 Aa
10,74	0,5640 Ba	0,6160 Ba	0,2900 Ab
<b>Média</b>	0,2780	0,2053	0,2467

Os valores seguidos pela mesma letra minúscula não diferem entre si em cada coluna, seguidos pela mesma letra maiúscula não diferem entre si em cada linha.

Quando a concentração de ANA foi fixada em 8,88 $\mu$ M tanto 5,37 $\mu$ M quanto 10,74 $\mu$ M de ANA favoreceram a produção de calos oxidado, entretanto a maior média foi observada para a primeira combinação: 8,88  $\mu$ molL<sup>-1</sup> BAP e 5,37 $\mu$ M ANA (Tabela 16).

Tabela 16: Calos oxidados em explantes de *Leptohyptis macrostachysem* diferentes concentrações de BAP e ANA.

ANA ( $\mu\text{M}$ )	BAP ( $\mu\text{M}$ )		
	0,00	4,44	8,88
0,00	1,0049 Ac	1,0000 Ab	1,0000 Ab
5,37	1,1307 Aa	1,0000 Bb	1,0049 Bb
10,74	1,0445 Ab	1,0580 Aa	1,0580Aa
<b>Média</b>	1,0600	1,0193	1,0210

Os valores seguidos pela mesma letra minúscula não diferem entre si em cada coluna, seguidos pela mesma letra maiúscula não diferem entre si em cada linha.

Os reguladores vegetais são considerados os principais controladores da morfogênese *in vitro* (MOURA et al, 2001). Enquanto as citocininas estimulam a divisão celular, as auxinas por outro lado, controlam o crescimento e o alongamento das células (PASQUAL, 2001).

A interação entre os reguladores de crescimento, que ocorre naturalmente em plantas, torna-se crucial para o crescimento e organogênese dos indivíduos (GEORGE, 2008). Para indução de calo é necessário estabelecer o balanço hormonal intermediário de auxinas e citocininas favorável (NOGUEIRA et al., 2007).

Muitas vezes, o suprimento exógeno de reguladores de crescimento, é necessário para a indução de calo. O balanço hormonal obtido entre os níveis de citocininas e auxinas, exógenas e endógenas à planta, pode estimular a proliferação celular, entretanto, citocininas exógenas nem sempre são necessárias de forma que muitos tecidos desenvolvem-se *in vitro* apenas com suprimento de auxinas (NOGUEIRA et al., 2007).

O BAP, dentre as citocininas, tem sido muito eficaz para promover a multiplicação em diversas espécies e parece ser o mais adequado para a multiplicação de parte aérea e indução de gemas adventícias (MOURA et al, 2001).

Estudando a indução de calos em *Hyptis leucocephala*, Pereira et al. (2012) não observaram produção de calos friáveis. Na ausência de ANA, os calos compactos também não foram observados. A maior porcentagem de calos foi obtida na combinação de 8,88  $\mu\text{M}$  de BAP com 10,74  $\mu\text{M}$  ou 21,48  $\mu\text{M}$  de ANA e 17,76  $\mu\text{M}$  de BAP junto a 5,37  $\mu\text{molL}^{-1}$ , 10,74  $\mu\text{M}$  ou 21,48  $\mu\text{M}$  de ANA. Contudo todos os calos produzidos eram compactos (Figura 14).

Santos et al (2008), ao contrário, obtiveram calos friáveis em diversas concentrações de BAP. As maiores percentagem de calos foram observadas em concentrações de 1,78 $\mu$ M e 3,55 $\mu$ M de BAP.

Vera, Miranda e Vilarreal (2009) obtiveram 100% de formação de calos em cultivo in vitro de *Hyptis verticilata* utilizando um balanço de reguladores vegetais, 4,44 $\mu$ Mde BAP associado a 0,27 $\mu$ Mde ANA ou 8,88 $\mu$ Mde BAP associado a 0,27 $\mu$ Mde ANA.

#### 4.2.3 Avaliação do efeito da temperatura

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas para a variável calos friáveis. Outros tipos de calos, neste experimento, não foram observados. As variáveis número de brotos, número de folhas e número de raízes apresentaram diferença estatisticamente significativa ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey (Tabela 17).

Tabela 17: Resumo da análise de variância para número de brotos, número de folhas, número de raízes e calos friáveis de *Leptohyptis macrostachys* em função de diferentes temperaturas.

Fonte de variação	GL	Quadrados médios			
		Nº de brotos	Nº de folhas	Nº de raízes	Calos Friável <sup>z</sup>
Tratamento	1	20,7061**	672,3361**	1,7228**	0,0001 <sup>ns</sup>
Resíduo	7	0,0737	1,2737	0,0367	0,0001
CV (%)		7,78	4,87	39,62	0,83

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey; \*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey; <sup>ns</sup> Não há diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos; <sup>z</sup> A estatística foi realizada em médias transformadas em  $\sqrt{x} + 1$ .

Na comparação das médias percebe-se que, para todos os parâmetros analisados – número de brotos, número de folhas, e número de raízes – foram observadas maiores médias quando as plantas foram cultivadas a 30°C (Tabela 18).

Tabela 18: Valores médios para número de brotos, número de folhas e número de raízes em plantas de *Leptohyptis macrostachys*, em diferentes temperaturas.

Tratamentos	Qtde de brotos	Qtde de folhas	Qtde de raízes
25°C	2,1300 b	15,4460 b	0,0920 b
30°C	51825a	32,8400 a	0,9725 a
<b>Médias</b>	<b>3,65625</b>	<b>24,143</b>	<b>0,53225</b>

Médias seguidas pela mesma letra minúscula em cada coluna não diferem entre si nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Submetidas às diferentes temperaturas, *Leptohyptis macrostachys*, comportou-se de modo bem diferente produzindo plantas distintas em suas características morfológicas (Figura 16).

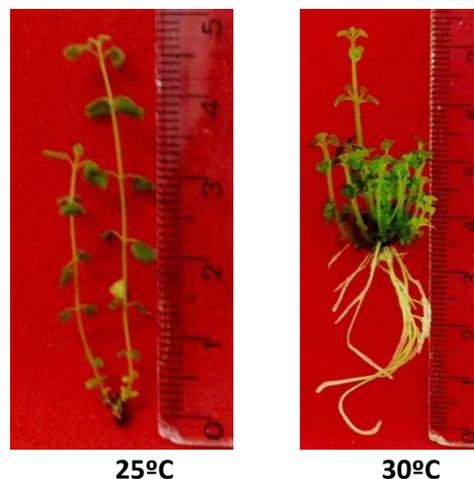


Figura 15: Plantas de *Leptohyptis macrostachys* mantidas em diferentes temperaturas por 30 dias.

Majada et al. (2000) citaram que na aclimação características anatômicas de *Dianthus caryophyllus* sofreram forte influencia das condições ambientais. Antolín, Hekneby & Sanchez-Diáz (2005) ao aclimatar *Trifolium michelianum* Savi em baixas temperaturas, notaram aumento da matéria seca em relação a temperaturas superiores.

Por outro lado Perez et al. (2001) verificaram que a redução da temperatura resultava na inibição do crescimento de plantas e *Festuca arundinacea*. Clarkson et al. (1986) reportaram que raízes eram formadas em menor número em plantas de *Lolium perene* cultivadas sob temperaturas inferiores a 25°C, quando comparadas as crescidas em temperaturas superiores a essa.

#### 4.2.4 Avaliação do efeito do fechamento dos tubos

A variável número de folhas apresentou diferença estatisticamente significativa ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey e número de raízes, ao nível de 5%. As demais variáveis analisadas não foram significativas (Tabela 19).

Tabela 19: Resumo da análise de variância para as variáveis número de brotos, número de folhas e número de raízes em plantas de *Leptohyptis macrostachys* em função dos tipos de fechamento dos tubos.

Fonte de variação	GL	Quadrados médios		
		Nº de brotos	Nº de folhas	Nº de raízes <sup>z</sup>
Tipos de fechamentos	1	0,2624 <sup>ns</sup>	9,3316 <sup>**</sup>	0,2549 <sup>*</sup>
Resíduo	8	0,0507	0,8132	0,0326
CV (%)		11,44	6,23	14,98

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey; \*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey; <sup>ns</sup>Não há diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos; <sup>z</sup>A estatística foi realizada em médias transformadas em  $\sqrt{x} + 1$ .

A quantidade de folhas foi favorecida pela vedação com filme PVC, enquanto que a quantidade de raízes foi maior quando foi usada tampa plástica (Tabela 20).

Tabela 20: Valores médios para número de brotos, número de folhas e número de raízes em plantas de *Leptohyptis macrostachys*, em função de diferentes tipos de fechamento dos tubos de ensaio.

Tipo de fechamento	Nº de folhas	Nº de raízes
Filme de PVC	15,4460 a	1,0447 b
Tampa plástica	13,5140 b	1,3640 a
Média	14,48	1,20435

Médias seguidas pela mesma letra minúscula em cada coluna não diferem entre si nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

O microambiente dentro dos tubos de cultura parece ser um ambiente homogêneo, mas na verdade é o responsável pela variabilidade no comportamento das culturas, uma vez que os fatores determinantes para a qualidade do microambiente são os tipos de frasco, tipo de tampa e volume de meio presente (BANDEIRA et al, 2007).

A forma de vedação empregada interfere nas trocas gasosas entre o microambiente dentro do frasco e o ar atmosférico, ocasionando o aumento da concentração de CO<sub>2</sub> e etileno dentro dos frascos se for utilizada vedação hermética (BANDEIRA et al, 2007, CID, 2001).

Neste estudo não foi observado diferença significativa para a maioria das variáveis analisadas, possivelmente o tempo de cultivo não foi suficiente para alteração significativa do microambiente. A semelhanças entre as plantas pode ser vista na Figura 17.

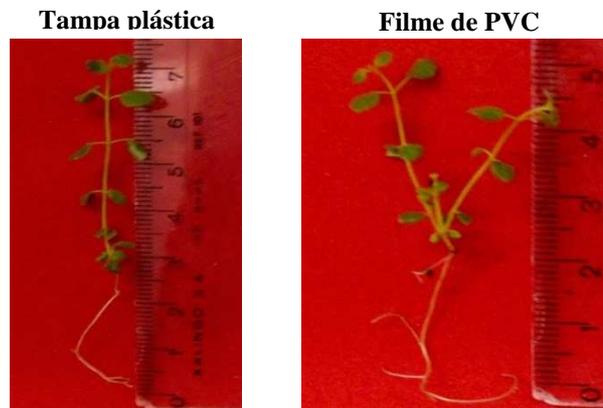


Figura 16: Plantas cultivadas *in vitro* com diferentes tipos de fechamento dos tubos.

#### 4.2.5 Avaliação do efeito do fotoperíodo

A variável número de raízes apresentaram diferença estatisticamente significativa ao nível de 5% e número de brotos e número de folhas apresentaram diferença estatisticamente significativa ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey, enquanto que as variáveis calos friáveis, compactos e oxidados não foi verificado diferença significativa em função dos tratamentos utilizados (Tabela 21).

Tabela 21: Resumo da análise de variância para as variáveis número de brotos, número de folhas e número de raízes em plantas de *Leptohyptis macrostachys* em função de diferentes fotoperíodos.

Fonte de variação	GL	Quadrados médios					
		Nº de brotos	Nº de folhas	Nº de raízes <sup>z</sup>	Calos		
Friável <sup>z</sup>	Compacto <sup>z</sup>				Oxidado <sup>z</sup>		
Fotoperíodo	1	22,9522**	100,9333**	0,2110*	0,0005 <sup>ns</sup>	0,0001 <sup>ns</sup>	0,0009 <sup>ns</sup>
Resíduo	8	0,9037	1,5038	0,0236	0,0006	0,0001	0,0005
CV (%)		26,08	6,58	12,92	2,33	0,78	2,20

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey; \*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey; <sup>ns</sup> Não há diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos; <sup>z</sup> A estatística foi realizada em médias transformadas em  $\sqrt{x} + 1$ .

Todas as variáveis apresentaram maiores médias para o fotoperíodo de 8h (Tabela 22).

Tabela 22: Valores médios para número de brotos, número de folhas e número de raízes em plantas de *Leptohyptis macrostachys*, em função de diferentes fotoperíodos.

Fotoperíodo (h)	Nº de brotos	Nº de folhas	Nº de raízes <sup>z</sup>
16	2,1300 b	15,4460 b	1,0447 b
8	5,1600 a	21,8000 a	1,3352 a
<b>Médias</b>	<b>3,645</b>	<b>18,623</b>	<b>1,18995</b>

Médias seguidas pela mesma letra minúscula em cada coluna não diferem entre si nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

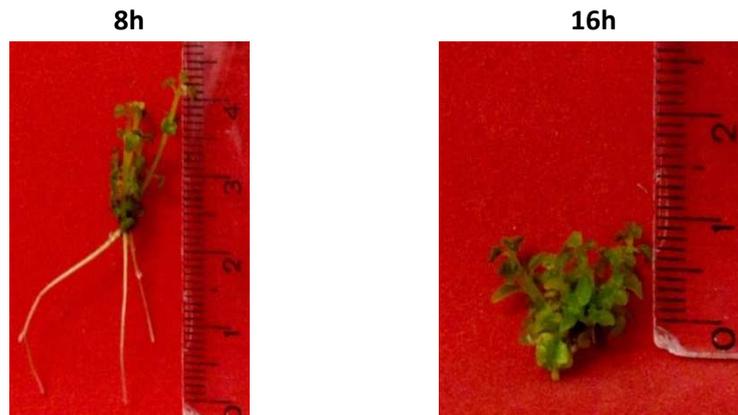


Figura 17: Plantas de *Leptohyptis macrostachys* cultivadas *in vitro* sob diferentes regimes de fotoperíodo após 30 dias de inoculação.

A luz oriunda de lâmpadas fluorescentes (luzbranca) pode induzir a produção de formaldeído e deficiência de ferro nas plantas de cultura de tecidos. O formaldeído é produzido a partir do EDTA (ácido etilenodiaminotetracético), quando é oxidado pela redução fotoquímica do ferro, podendo ser acumulado em níveis inibidores. Além disso, o meio se torna deficiente em ferro, pois, o mesmo perde a quelatação, o que resulta na sua precipitação. (HANGARTER & STASINOPOULOS, 1991).

De acordo com Caldas, Torres e Buso (1998) tanto o  $Fe^{+2}$ , quanto o  $Fe^{+3}$  são tóxicos as plantas e a absorção de ferro é dependente da quelatação com EDTA que facilita a absorção pelas células e substitui o citrato de ferro ou o cloreto e sulfato de ferro, outros utilizados como fonte deste nutriente.

Assim a maior exposição à luz pode ter contribuído tanto para a deficiência de ferro para as plantas quanto para a toxicidade a este nutriente.

Corrêa et al. (2003) relataram que a interação do fotoperíodo de 16 horas de luz com temperatura de 25°C, proporcionou melhor crescimento do sistema

radicular em comparação aos fotoperíodos de 8, 10 e 12 horas de luz associado à temperatura de 15°C.

Pasqual et al., (1997) micropropagando macieira (explantos de porta enxerto de MM.111) não observou diferença entre o número médio de brotos para plantas cultivadas com 8 ou 16h de fotoperíodo e para plantas cultivadas com 10 ou 14h de fotoperíodo. Sendo que os últimos produziram ainda menos brotos que os primeiros.

#### 4.2.6 Fitoquímica

A identificação e a quantificação de podofilotoxina e yateína foi feita por meio de CLAE. Os cromatogramas e os espectros que ilustram a identificação de podofilotoxina, metabólito de interesse; e yateína, seu precursor, estão em anexo (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q e R).

##### 4.2.6.1 Concentração dos sais no meio de cultura x Concentração de sacarose no meio de cultura

A Tabela 23 demonstra o resumo da análise de variância para as variáveis podofilotoxina e yateína. A podofilotoxina apresentou diferença estatisticamente significativa ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey. A yateína apenas para concentração dos sais apresentou a mesma significância supracitada.

Tabela 23: Resumo da análise de variância para podofilotoxina e yateína em plantas de *Leptochyptis macrostachys* em função de diferentes concentrações dos sais de sacarose no meio de cultura.

Fonte de variação	GL	Quadrados médios	
		Podofilotoxina	Yateína <sup>z</sup>
Conc. Sais	1	3,2925**	8,0922**
Conc. Sac	1	31,4750**	1,4680 <sup>ns</sup>
Sais X Sac	1	10,9762**	0,2446 <sup>ns</sup>
Resíduo	8	0,0734	0,4939
CV (%)		9,92	25,80

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey; \*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey; <sup>ns</sup> Não há diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos; <sup>z</sup> A estatística foi realizada em médias transformadas em  $\sqrt{x} + 1$ .

A produção de podofilotoxina sofreu influência tanto da concentração da sacarose como dos sais do meio de cultivo. O rendimento desta substância é maior

quando o meio tem metade com a concentração total dos sais e é suplementado com 1,5% de sacarose (Tabela 24).

Tabela 24: Valores médios de podofilotoxina em plantas de *Leptohyptis macrostachys* em função da concentração de sais e de sacarose no meio de cultura.

Sacarose (%)	Concentração dos sais do meio de cultura	
	MS ½	MS completo
1,50	5,8309 Aa	2,8705 Ba
3,00	0,6791 Bb	1,5442 Ab
Média	3,2550	2,2073

Os valores seguidos pela mesma letra minúscula não diferem entre si em cada coluna, seguidos pela mesma letra maiúscula não diferem entre si em cada linha.

A produção de yateína sofreu influência apenas da concentração de sais no meio de cultivo. Seu maior rendimento foi observado no meio contendo metade da concentração dos sais (Tabela 25).

Tabela 25: Valores médios de yateína em plantas de *Leptohyptis macrostachys* em função das concentrações de sais no meio de cultura.

Concentração dos sais	YATEÍNA
MS ½	3,5449 b
MS completo	1,9026 a
Média	2,7237

Médias seguidas pela mesma letra minúscula em cada coluna não diferem entre si nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

#### 4.2.6.2 Avaliação do efeito de BAP e ANA

Na análise de variância pelo teste de Tukey apodofilotoxina provou diferir estatisticamente em todas as fontes de variação ao nível de 1% de probabilidade. A yateína difere ao mesmo nível de probabilidade para as fontes de variação ANA e BAP x ANA, mas para a fonte de variação BAP a diferença não foi estatisticamente significativa. (Tabela 26).

Tabela 26: Resumo da análise de variância para podofilotoxina e yateína em plantas de *Leptohyptis macrostachys* em função de diferentes concentrações de BAP e ANA.

Fonte de variação	GL	Quadrados médios	
		PODOFILOTOXINA	YATEÍNA

BAP	2	5,6204**	2,1767 <sup>ns</sup>
ANA	2	6,4136**	33,8478**
BAP X ANA	4	2,8615**	8,0698**
Resíduo	18	0,0004	1,5757
CV (%)		1,51	32,15

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey; \*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey; <sup>ns</sup> Não há diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos; <sup>z</sup>A estatística foi realizada em médias transformadas em  $\sqrt{x} + 1$ .

A variável podofilotoxina foi em média maior para o balanço de reguladores vegetais composto por 8,88 $\mu$ M de BAP e 5,37 $\mu$ M de ANA (Tabela 27). A yateína parece ter sido inibida pela presença do ANA e sua média foi maior na ausência desta auxina (Tabela 28).

Tabela 27: Valores médios de podofilotoxina em plantas de *Leptohyptis macrostachys* em função de diferentes concentrações de BAP e ANA.

ANA ( $\mu$ M)	BAP ( $\mu$ M)		
	0,00	4,44	8,88
0,00	0,4015 Ab	0,8431 aC	0,6678 aB
5,37	0,2926 Aa	2,2430 Bc	4,0871 Cc
10,74	0,4670 Ac	1,1091 Bb	1,0787 Bb
<b>Média</b>	0,3870	1,3883	1,9547

Os valores seguidos pela mesma letra minúscula não diferem entre si em cada coluna, seguidos pela mesma letra maiúscula não diferem entre si em cada linha.

Tabela 28: Valores médios de yateína em plantas de *Leptohyptis macrostachys* em função de diferentes concentrações de BAP e ANA.

ANA ( $\mu$ M)	BAP ( $\mu$ M)		
	0,00	4,44	8,88
0,00	7,1838 Ab	6,6848 Aba	4,1824 Ba
5,37	1,8553 Ab	4,2934 Aab	4,3272 Aa
10,74	1,0705 Aa	2,0343 A	3,5098 Aa
<b>Média</b>	3,3699	4,3375	4,0065

Médias seguidas pela mesma letra minúscula em cada coluna não diferem entre si nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

#### 4.2.6.3 Avaliação do efeito da temperatura

No resumo da análise de variância fica evidente que tanto a podofilotoxina quanto a yateína apresentam diferença estatisticamente significativa, diferem ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey (Tabela 29).

Tabela 29:Resumo da análise de variância para podofilotoxina e yateína em plantas de *Leptohyptis macrostachys* em função de diferentes temperaturas.

Fonte de variação	GL	Quadrados médios	
		PODOFILOTOXINA	YATEÍNA
Temperatura	1	0,2848**	434,8185**
Resíduo	4	0,0094	0,0064
CV (%)		15,63	0,51

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey; \*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey; <sup>ns</sup> Não há diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos; <sup>z</sup>A estatística foi realizada em médias transformadas em  $\sqrt{x} + 1$ .

A comparação das médias demonstra que a yateína e a podofilotoxina em média são produzidas em maior número quando submetidas a 30°C (Tabela 30).

Tabela 30:Valores médios de podofilotoxina e yateína em plantas de *Leptohyptis macrostachys* em função da temperatura.

Temperatura (°C)	PODOFILOTOXINA	YATEÍNA
25	0,4015 b	7,1839 b
30	0,8372 a	24,2097 a
<b>Média</b>	0,6193	15,6968

Médias seguidas pela mesma letra minúscula em cada coluna não diferem entre si nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

#### 4.2.6.4 Avaliação do efeito do fechamento dos tubos

Tanto a produção de podofilotoxina, quanto a yateína foram influenciadas significativamente pelo tipo de vedação ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey (Tabela 31).

Tabela 31:Resumo da análise de variância para podofilotoxina e yateína em plantas de *Leptohyptis macrostachys* em função de diferentes tipos de fechamento dos tubos de ensaio.

Fonte de variação	GL	Quadrados médios	
-------------------	----	------------------	--

		PODOFILOTOXINA	YATEÍNA
<b>Tipo de fechamento</b>	1	0,0752**	64,7237**
<b>Resíduo</b>	4	0,0003	0,0020
<b>CV (%)</b>		6,06	1,15

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey; \*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey; <sup>ns</sup> Não há diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos; <sup>z</sup> A estatística foi realizada em médias transformadas em  $\sqrt{x} + 1$ .

A comparação das média mostra que enquanto a podofilotoxina e a yateína tem sua produção favorecida pela vedação com filme PVC, para a  $\alpha$ -peltatina ocorre o inverso, apresentando maiores médias quando o fechamento utilizado foi tampa plástica (Tabela 32).

Tabela 32: Valores médios de podofilotoxina e yateína em plantas de *Leptohyptis macrostachys* em função do tipo de fechamento.

Tipo de fechamento	PODOFILOTOXINA	YATEÍNA
Filme de PVC	0,4015 a	7,1839 a
Tampa plástica	0,1777 b	0,6151 b
<b>Média</b>	0,2896	3,8995

Médias seguidas pela mesma letra minúscula em cada coluna não diferem entre si nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

#### 4.2.6.5 Avaliação do efeito do fotoperíodo

Todas as variáveis diferem estatisticamente ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de tukey(Tabela 33).

Tabela 33: Resumo da análise de variância para podofilotoxina e yateína em plantas de *Leptohyptis macrostachys* em função de diferentes fotoperíodos.

Fonte de variação	GL	Quadrados médios	
		PODOFILOTOXINA	YATEÍNA
Fotoperíodo	1	0,1415**	93,1983**
Resíduo	4	0,0000	0,0776
CV (%)		1,63	2,50

Médias seguidas pela mesma letra minúscula em cada coluna não diferem entre si nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

A comparação das médias mostra que a podofilotoxina em média é melhor produzida no fotoperíodo de 16h. Enquanto que a yateína é melhor produzidas no fotoperíodo de 8h (Tabela 34).

Tabela 34: Valores médios de podofilotoxina e yateína em plantas de *Leptohyptis macrostachys* em função do fotoperíodo.

Fotoperíodo (h)	PODOFILOTOXINA	YATEÍNA
16	0,4015 a	7,1839 b
8	0,0944 b	15,0663a

#### Média

Médias seguidas pela mesma letra minúscula em cada coluna não diferem entre si nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Dessa forma, a produção de podofilotoxina pode ser melhorada *in vitro* se mantida em meio MS com metade da concentração dos sais, suplementada com 1,5% de sacarose, vedada com filme PVC, mantida em sala de crescimento a 30°C com fotoperíodo de 16h. Com excessão a concentração dos sais no meio de cultivo e a concentração de sacarose, as demais condições favorecem o número de folhas e/ou brotos.

De acordo com Brandão (2010), espécimes de *Leptohyptis macrostachys* coletados na região da Capada diamantina, submetidos aos mesmos métodos de extração e quantificação apresentaram podofilotoxina nas folhas com rendimento de 0,089mg/g de planta seca. Cultivada *in vitro* em meio MS suplementado com 1,5% de sacarose, *Leptohyptis macrostachys* chegou a produzir 5,83mg/g (Figura 19).

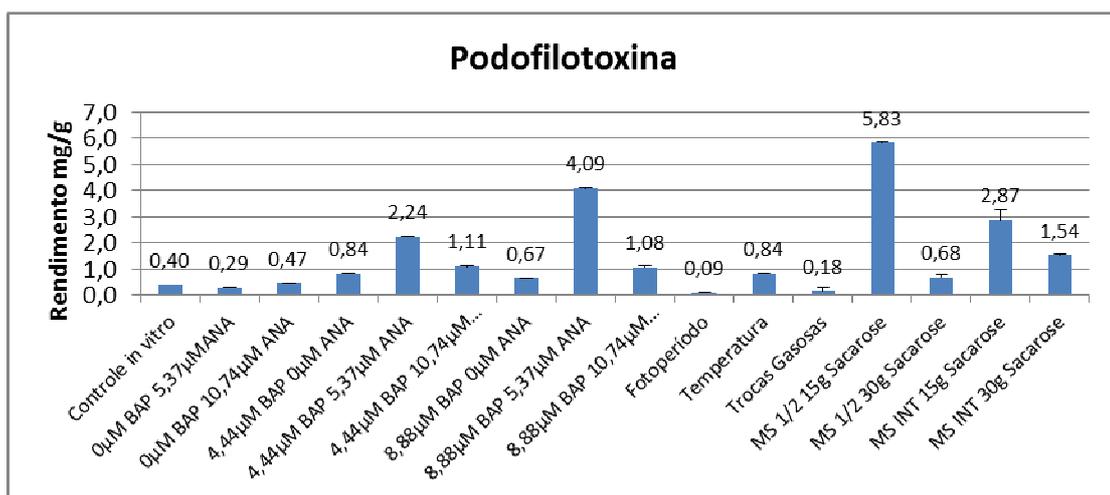


Figura 18: Comparativo do rendimento (mg/g de planta seca) de podofilotoxina em plantas de *Leptohyptis macrostachys* cultivadas *in vitro*.

Contudo a produção de podofilotoxina é muito baixa em relação a produção de yateína (Figura 20) Portanto, mais estudos são necessários

para que desloque o equilíbrio da reação de biossíntese no sentido da formação de podofilotoxina.

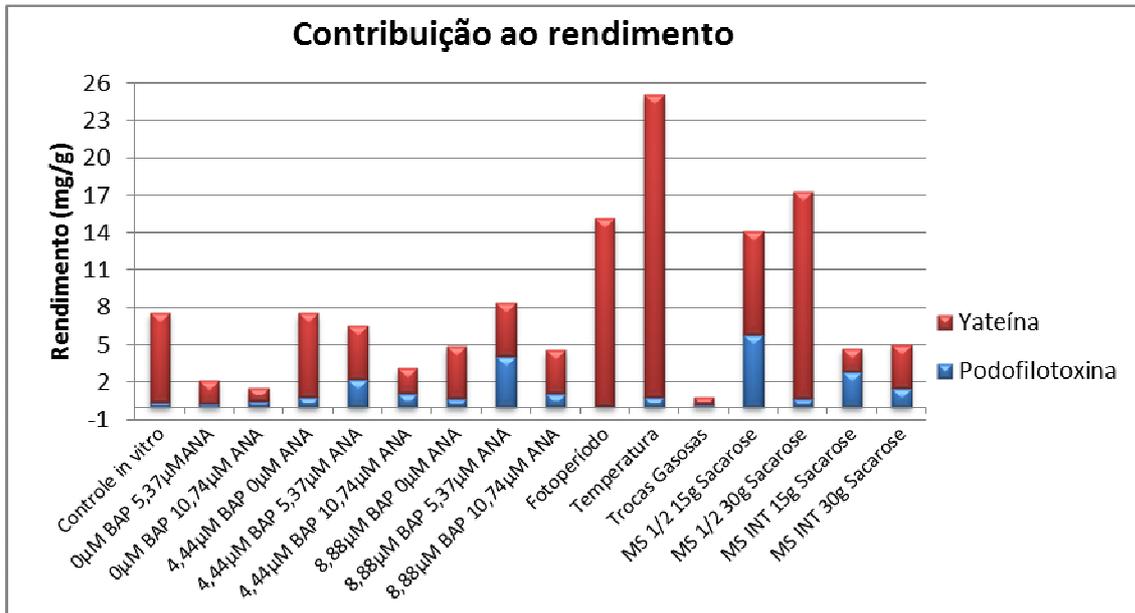


Figura 19: Comparativo de médias considerando o rendimento (mg/g de planta seca) de podofilotoxina x yateína em plantas de *Leptohyptis macrostachys* cultivadas *in vitro*.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

### 5.1 ESTABELECIMENTO IN VITRO DE *Leptohyptis macrostachys*

Foi estabelecido um protocolo de germinação *in vitro* de *Leptohyptis macrostachys* como os melhores parâmetros estudados observados para sementes germinadas em meio MS com metade da concentração dos sais suplementado com 1,5% de sacarose,  $11,55\mu\text{molL}^{-1}$  de  $\text{GA}_3$  solidificado com 0,7% de ágar e mantido em sala de crescimento com fotoperíodo de 16h a 25°C.

### 5.2 MULTIPLICAÇÃO IN VITRO DE *Leptohyptis macrostachys*

As plantas se desenvolveram de modo satisfatório após a multiplicação *in vitro*. Contudo, a regeneração completa da planta pode ser melhor alcançada em dois subcultivos: o primeiro favorecendo o crescimento da parte aérea e o posterior, o fortalecimento das raízes, haja vista que as condições que favorecem brotos e folhas e raízes divergem nas condições estudadas.

A formação de calos, importante para a produção de metabólitos secundários em larga escala, não foi satisfatória, possivelmente devido às concentrações de auxina serem baixas, uma vez que na maior concentração utilizada houve produção discreta de calos.

A concentração de podofilotoxina pode ser melhorada em cultivo *in vitro* de *Leptohyptis macrostachysse* mantida em meio MS com metade da concentração dos sais, suplementada com 1,5% de sacarose, vedada com filme PVC e mantida em sala de crescimento a 30°C com fotoperíodo de 16h. Também neste caso o subcultivo pode aumentar ainda mais os rendimentos, pois a concentração de yateína, o precursor da podofilotoxina, é favorecida em condições (fotoperíodo e temperatura, por exemplo) que são aversas à de podofilotoxina.

## 6 REFERÊNCIAS

- AFFONSO, V. R.; BIZZO, H. R.; LAGE, C. L. S.; SATO, E. Influence of growth regulators on biomass production and volatile profile of *in vitro* plantlets of *Thymus vulgaris* L. **Journal of food chemistry**. v. 57, p. 6392-6395.
- ANDRADE, A. M.; OLIVEIRA, J. P. R. SANTOS, A. L. L. M.; FRANCO, C. R. P.; ANTONIOLLI, A. R.; ESTEVAM, C. S.; THOMAZZI, S. M. Preliminary study on the anti-inflammatory and antioxidant activities of the leave extract of *Hyptis fruticosa* Salzm. ex Benth., Lamiaceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v.20, n.6, p.962-968. 2010
- AMARAL, C. L. F.; SILVA, A. B. Melhoramento biotecnológico de plantas medicinais. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. Ano VI, n. 30, jan-jun, 2003.
- ANTOLÍN, M. C.; , HEKNEBY, M. & SÁNCHEZ-DÍAZ, M. Contrasting responses of photosynthesis at low temperatures in different annual legume species. **PHOTOSYNTHETICA**. v. 43, n. 1 p. 65-74, 2005.
- AOYAMA, E.M.; ONO, E.O.; FURLAN, M.R. ESTUDO DA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE LAVANDA (*Lavandula angustifolia* Miller). *Sci. agric.*, Piracicaba, v. 53, n. 2-3, May 1996. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-90161996000200013&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-90161996000200013&lng=en&nrm=iso)>. Acessado em 08.08.2013.
- ASSIS, T. F. de; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Embrapa-SPI, v. 1, 1998. p. 261-296.
- AYRES, D. C.; LOIKE, J. D. Lignans: Chemical biological and clinical properties. 1 ed, New York, 1990, v 1 p 401.
- AZEVEDO N. R.; CAMPOS, I. F. P.; FERREIRA, H. D.; PORTES, T. A.; SERAPHIN, J. C.; PAULA, J. R. de; SANTOS, S. C.; FERRI, P. H. Essential oil chemotypes in *Hyptis suaveolens* from Brazilian Cerrado. **Biochemical Systematics and Ecology** v. 30, p. 205–216. 2002.
- BANDEIRA, J. M., LIMA, C. S. M., RUBIN S., RIBEIRO, M. V., FALQUETO, A. R., PETERS, J. A. & BRAGA, E. J. B. Diferentes tipos de vedações dos frascos e concentrações de sacarose na micropropagação de *Thymus vulgaris* L. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 472-474, jul. 2007.
- BARBOZA, S. B. S. C.; CALDAS, L. S. e SOUZA, L. A. C. Micropropagação do híbrido PExSC-52 e da cultivar Smooth Cayenne de abacaxizeiro. **Pesq. agropec. bras.** v.39, n.8, p.725-733, ago. 2004.
- BARIN, L. B.; LÉDO, A. S. & SILVA, A. V. C. Efeito de diferentes meios de cultura na germinação *in vitro* do cambuizeiro. In: III Ciclo de palestras de cultivo in vitro de plantas Sergipe –Se 11 a 12 de setembro 2012. [Online] Disponível em: <<http://ainfo>>.

cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/67875/1/Cambui.pdf> Acessado em: 25.07.2013.

BARROS, L. F. L. **Estudo químico, atividade antimicrobiana e antioxidante das folhas de *Taluma ovata* A. St. Hil (Magnoliaceae)**. 2008. 140p Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination: development, germination and growth. Berlin. Springer-Verlag, 1983. 306p

BLANK, M. F. A.; ANTONIOLLI, A. R.; CAETANO, L. C.; CAMPOS, D. A.; BLANK, A. F. ALVES, P. B. Antinociceptive activity of the volatile oils of *Hyptis pectinata* L. Poit. (Lamiaceae) genotypes **Phytomedicine**. v. 15, p. 334–339. 2008.

BOTREL, P. P. ; PINTO, J. E. B. P.; ARAÚJO, A. C. C. de; BERTOLUCCI, S. K. V.; FIGUEIREDO, F. C.; FERRI, P. H.; COSTA, D. P. da. Variações no teor e na composição volátil de *Hyptis marruboides* epl. cultivada no campo e em casa de vegetação. **Química Nova**. v. 33, n. 1, p.33-37. 2010.

BOTTA, B.; SILVESTRINI, A.; VITALI; MONACHE, G. D. Culturas de células vegetais: doze anos de experiência. In: YUNES, R. A. & CALIXTO, J. B.(Org.) **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001. p.353-379.

BRANDÃO, H. N. Determinação de podofilotoxina e outras lignanas em espécies dos gêneros *Eriope* e *Hyptis* (lamiaceae) por CLAE-DAD. 2010.125p. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal da Bahia, Salvador – Ba.

BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P. & DAVID, J. M. Química e farmacologia de quimioterápicos e antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**. v.33, n.6, p.1359-1369, 2010.

BRASIL, Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. Documentos. Princípios da cultura de tecidos vegetais. ISSN 1517 – 5111 Dez. 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília, DF, 2006. 61p.

BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**, Eds 2000, American Society of Plant Physiologists.

BULL, A. T.; WARD, A. C. & GOODFELLOW, M. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v.64, n. 3, p. 573–606, 2000

CANEL, C.; MORAES, R. M.; DAYAN, F. E.; FERREIRA, D.; Molecules of Interest – Podophylltoxin. **Phytochemistry**, v. 54, p. 115 – 120, 2000.

CASTRILLO, M.; VIZCAINO, D.; MORENO, E.; LATORRACA, Z. Chlorophyll content in some cultivated and wild species of the family *Lamiaceae*. **Biologia plantarum**. v. 44, n. 3, p. 423-425. 2001.

CATAPAN, E.; OTUKI, M. F. VIANA, A. M. *In vitro* culture of *Phyllanthus stipulatus* (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Botânica**. v. 24, n. 1, p. 25-34, 2001.

CID, L. P. B. A propagação *in vitro* de plantas. O que é isso? **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. n.19, p.6-21, Mar/Abril 2001. Disponível em: <[http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio19/bio\\_19.pdf](http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio19/bio_19.pdf)> Acessado em:16.08.2013.

CLARKSON, D. T., HOPPER, M. J. & JONES, L. H. P. 1986. The effect of root temperature on the uptake of nitrogen and the relative size of the root system in *Lolium perenne*. I. Solutions containing both  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$ . **Plant, Cell and Environment**. v.9, n.535-545.

CORRÊA, R. M.; PINTO, J. E. B. I. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; REIS, E. S.; SOUZA, A. V. Potencial do carvão ativado, filtro amarelo e interação fotoperíodo/temperatura na formação de raízes tuberosas de batata-doce *in vitro*. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.33, n.3, p.423-430, mai-jun, 2003.

DEGANI, A. L, CASS, Q. B., VIEIRA, P.C. Cromatografia: u belo ensaio. **Química Nova na escola**. V., 7, maio 1998.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A biosynthetic Approach**. 2 Ed. John Wiley & Sons LTDA, 2002.

Erig AC, Schuch MW & Chaves AC (2004) Enraizamento *in vitro* e aclimatização de mudas de marmeleiro Cvs. Mc e Adams, utilizadas como porta-enxerto para a pereira. **Scientia Agraria**, 5:61-68.

FALCÃO, D. Q. & MENEZES, F. S. Revisão etnofarmacológica, farmacológica e química do gênero *Hyptis*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 84, n. 3, p. 69-74. 2003.

FALCÃO, D.Q.; FERNANDES, S.B.O.; MENEZES, F.S. Triterpenos de *Hyptis fasciculata* Benth. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 13, supl., p. 81-83, 2003

FARIA, D. V. Indução *in vitro* de brotos em *Aechmea ramosa* var. *ramosa* Mart. ex Schult. F. (Bromeliaceae). 36p. 2011. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre – ES.

FARKYA, S.; BISARIA, V.S.; SRIVASTAVA. Biotechnological aspects of the production of the anticancer drug podophyllotoxin. **Appl Microbiol Biotechnol**. v. 65, p.504–519, 2004.

FERREIRA, D. F. SISVAR: A COMPUTER STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. **Ciência e Agrotecnologia** (UFLA), v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

FLORES, R. **Cultura de tecidos e produção de  $\beta$ -ecdisona EM *Pfaffia glomerata* E *Pfaffia tuberosa* (AMARANTHACEAE).** 168p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria – RS.

FUNASAKI, M. **Estruturas, atividade biológica e biossíntese de metabólitos secundários de *Ocotea catharinensis* Mez (Lauraceae).** 2006. 147p. Tese (Doutorado em Química) – Universidade de São Paulo.

FUSS, J.;ALFERMANN,E. A. Lignans from *Linum* species of sections *Syllinum* and *Linum*. **Nat. Prod. Res.**v. 21, p. 1-6. 2007

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. *Plant Propagation by Tissue Culture*. 3ª Edição. Springer. Netherlands. v. 1, 504p. 2008.

GOBBO-NETO, L.; OPES, N. P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**. v.30, n.2, p.374-381, 2007.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C., CALDAS, L. S.; BUSO, J, A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA CNPH, 1998. v.1, p. 183-260.

GUIMARÃES, D. N.; BERNARDINO, M. M.; RUBIO NETO, A.; PEREIRA, F. D. Germinação in vitro de macaúba [*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lood. ex Mart.]: Influência do volume e tipo de meio de cultivo. In: **I Congresso de Pesquisa e Pós-Graduação do Campus Rio Verde do IFGoiano**. 06 e 07 de novembro de 2012. Disponível em: < <http://rioverde.ifgoiano.edu.br/wp-content/uploads/dppg/resumos/iniciacao/agronomia/Germina%C3%A7%C3%A3o-in-vitro-de-maca%C3%BAbac-Acrocomia-aculeata-JACQ.-LOOD.-EX-MART.pdf>> Acessado em: 05.08.2013

HANGARTER, R.P.; STASINOPOULOS, T.C. Effect of Fe catalyzed photooxidation of EDTA on root growth in plant culture media. **Plant Physiology**. v.96, n. 3, p.843-847, 1991

HOLTON, R.; SOMOZA, C.; KIM, H. B.; LIANG, F.; BIEDIGER, R. J.; BOATMAN, P. D.; SHINDO, M.; SMITH, C. C.; KIM, S. C.; NADIZADEH, H.; SUZUKI, Y.; TAO, C. L.; VU, P.; TANG, S. H.; ZHANG, P. S.; MURTHI, K. K.;

IONKOVA, I. Biotechnological approaches for the production of lignans. **Pharmacognosy Review**. v.1 n.1, p.57-68, 2007.

KADKADE, P. G. Growth and podophyllotoxin production in callus tissues of *Podophyllum peltatum*. **Plant science letters**. v. 25, n. 1, p. 107-115.

KELLING, J.; SULLIVAN, K.; WILSON, L.; JORDAN, M. A. Suppression of centromere dynamics by taxol living osteosarcoma cells. **Cancer Research**. v. 63, p.2794-2801, 2003.

KUNHT, M.; RIMPLER, H.; HEINRICH, M. Lignans and other compounds from the mixed Indian medicinal plant *Hyptis verticillata*.**Phytochemistry**. v. 36, n. 2, p. 485-489. 1994.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE**. Campinas: Editora Átomo, 2009.

LEITE, V.C. A. & HEBLING, S. A. Efeito do ácido giberélico (GA3) e da luz na germinação in vitro de sementes de *Cattleya warnerii* T. Moore. *Natureza on line*. v.5, n. 2, p. 55-62 Disponível em: <[http://www.naturezaonline.com.br/natureza/conteudo/pdf/01\\_LeiteVCA\\_HeblingSA\\_5562.pdf](http://www.naturezaonline.com.br/natureza/conteudo/pdf/01_LeiteVCA_HeblingSA_5562.pdf)> acessado em 25.07.2013.

LIMA, G. P. P.; BARSALOBRES, C.; PIZA, I. M. T.; CEREDA, M. P. efeito do bap e ana e atividade da peroxidase em mandioca (*Manihot esculenta* Crantz cv mcol 22) cultivada in vitro. **Revista Brasileira de Agrociência**. v. 8, n. 2, p. 107-110, mai-ago, 2002.

LIEBSCH, Dieter; MIKICH, Sandra Bos. Fenologia reprodutiva de espécies vegetais da Floresta Ombrófila Mista do Paraná, Brasil. **Rev. bras. Bot.**, São Paulo, v. 32, n. 2, jun. 2009.

LOURENÇO, M. V. Palestra Biotecnologia de plantas medicinais: produção de biomoléculas. **Biológico**, São Paulo, v.65, n.1/2, p.63-65, jan./dez., 2003

MAJADA, J. P., TADEO, F., Fal, M. A. & SÁNCHEZ-TAMÉS, R. 2000. Impact of culture vessel ventilation on the anatomy and morphology of micropropagated carnation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v.63, p. 207-214.

MALDANER, J.; NICOLOSO, F. T.; SANTOS, E. S.; FLORES, R.; SKREBSKY, E. C. Sacarose e nitrogênio na multiplicação in vitro de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Ciência Rural**. v.36, n.4, p. 1201-1206. 2006.

MEDRADO, H. H. S. Podofilotoxina e derivados: das mandrágoras aos anticancerígenos. 2011. 77p. Monografia (Graduação em Química Industrial) – Universidade Federal da Bahia, Salvador – Ba.

MELO, J. T.; RIBEIRO, J. F; LIMA, V. L. G. F. Germinação de sementes de algumas espécies arbóreas nativas do Cerrado. *Revista Brasileira de Sementes*, Brasília, v.1, p.8-12, 1979.

MOURA, T. L.; ALMEIDA, W. A. B.; MENDES, B. M. J.; MOURÃO FILHO, F. A. A. Organogênese in vitro de citrus em função de concentrações de bap e seccionamento do explante **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal - SP, v. 23, n. 2, p. 240-245, agosto 2001.

MULAGABAL, V. & HSIN-SHENG, T. Plant Cell Cultures - An Alternative and Efficient Source for the Production of Biologically Important Secondary Metabolites. **International Journal of Applied Science and Engineering**. v. 2, n. 1, p. 29-48. 2004.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.15, p.473-479, 1962.

NAGAO, E. O.; PASQUAL, M. & RAMOS, J. D. Efeitos da sacarose e do nitrogênio inorgânico sobre a multiplicação "in vitro" de brotações de porta-enxerto de citros. **Bragantia**. v.53, n. 1, p. 25-31, 1994.

NICOLAU, K. C.; YANG, Z.; LIU, J. J.; UENO, H.; NANTERMET, P. G.; GUY, R. K.; CLAIBORNE, C. F.; RENAUD, J.; COULADOUROS, E. A.; PAULVANNAN, K.; SORENSEN, E. J. Total synthesis of taxol. **Nature**, v.367, p.630-634, 1994.

PAIVA-NETO, V. B.; OTONI, W. C. Carbon sources and their osmotic potential in plant tissue culture: does it matter? **Scientia horticultrae**. v. 97, n. 3-4, p. 193-202.

NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; CASTRO, A. H.; VIEIRA, C. V.; ABBADE, L. C.; ALVARENGA, A. A. Germinação in vitro de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciênc. agrotec., Lavras**, v. 28, n. 5, p. 1053-1059, set.out., 2004

NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; OLIVEIRA, L. M.; SOARES, G. A.; SOARES, F. P.; CASTRO, A. H. F. PAIVA, P. D. O. Calli induction from leaf explants of murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciênc. agrotec.**, v. 31, n. 2, p. 366-370, mar./abr., 2007.

OGATA, A.; TSURUGA, A.; MATSUNO, M.; MIZUKAMI, H. Elicitor-induced rosmarinic acid biosynthesis in *Lithospermim erythorhizon* cell suspension cultures: Activities of rosmarinic acid synthase and the final two cytochrome P450-catalyzed hydroxylations. **Plant Biotechnology**. v. 21, n. 5, p. 393-396, 2004.

OLIVEIRA, M. M. Aplicações e Avanços na Área da Biotecnologia Vegetal. In: Biotecnologia Molecular: Avanços e Aplicações. **Boletim de Biotecnologia**. Vol. 22, p. 22-27. 2000

PAN, J. Y. P.; CHEN, S. L.; YANG, . H.; WU, J.; SINKKONEN, J.; ZOU, K. An update on lignans: natural products and synthesis. **Natural Products Report**, v. 26, p. 1251-1292, 2009.

PASQUAL, M. **Textos acadêmicos**: meios de cultura. Lavras: FAEPE/UFLA, 2001. 127 p.

PASQUAL, M.; CARVALHO, G. R.; RIBEIRO, V. G.; SCARANTE, M. J. & CARVALHO, G. R. Efeitos da sacarose e do fotoperíodo na propagação in vitro do porta-enxerto de macieira "MM.111". **Revista UNIMAR**. v. 19, n. 3, p.787-796, 1997.

PASTORE, J. F. B.; HARLEY, R. M.; FOREST, F.; PATON, A. J.; BERG, C. V. D. Phylogeny of the subtribe Hyptidinae (Lamiaceae tribe Ocimeae) as inferred from nuclear and plastid DNA. **Taxon**. v. 60, p. 1317-1329, 2011

PEIXOTO, C. P.; SALES, F. J. S.; VIEIRA, E. L.; PASSOS, A. R.; SANTOS, J. M. S. Ação da giberelina em sementes pré-embebidas de mamoneira. **Comunicata Scientiae**. v. 2, n. 2), p. 70-75, 2011.

PEREIRA, A. M. S.. Cultura de Tecidos de Plantas Mediciniais. In: Maria de Fátima Barbosa Coelho; Plácido Costa Júnior; Jeferson Luiz Dallabona Dombroski. (Org.).

**Diversos olhares em Etnobiologia, Etnoecologia e Plantas Medicinais.** 1 ed. Cuiabá, MT: UNICEN - Editora da União das Faculdades do Centro-Norte, 2003, v. 1, p. 183-193.

PEREIRA, D. M. S., OLIVEIRA, L. M., NEPOMUCENO, C. F., SANTANA J. R. F., SILVA M. L. C., & KOBLITZ, M. G. B. Indução e caracterização morfológica e bioquímica de calos de *Hyptis leucocephala* (Lamiaceae). **Sitientibus série Ciências Biológicas.** v. 12, n.1, p. 151–156. 2012.

PEREZ, P., MORCUENDE, R., MOLINO, I. M., PUENTE, L. S. & MARTINEZ-CARRASCO, R. 2001. Contrasting responses of photosynthesis and carbon metabolism to low temperatures in tall fescue and cloves. **Physiologia Plantarum** v.112, n. 4, p. 478-486.

PINHEIRO, C. S. R.; MEDEIROS, D. N.; MACÊDO, E. C.; ALLOUFA, M. A. I. Germinação *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomez) em diferentes meios de cultura. **Revista Brasileira de fruticultura.** Jaboticabal-SP. v. 23, p. 413-416, 2001.

PINHEIRO, M. M. **A defesa dos vegetais contra doenças. 2000.** (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra). *Referências adicionais:* Brasil/Português; Local: ETFQ-RJ; Cidade: Rio de Janeiro; Inst. promotora/financiadora: Escola Técnica Federal do RJ. Parte do Programa: Conversando com os autores.

RAO, S.; RAVISHANKAR, G. A. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. **Biotechnology Advances.** v. 20, p. 101-153, 2002.

REIS, E. S.; PINTO, J. E. B. P.; ROSADO, L. D. S. & CORRÊA, R. M. Influência do meio de cultura na germinação de sementes *in vitro* e taxa de multiplicação de *Melissa officinalis* L. **Revista Ceres.** v. 55 n. 3, p. 160-167, 2008.

RIBEIRO, M. N. O.; PASQUAL, M.; SILVA, A. B.; e RODRIGUES, V. A. Diferentes concentrações de sais do meio MS e de sacarose na multiplicação *in vitro* de *Zantedeschia aethiopica* L. Spreng. (copo-de-leite). **Revista de Ciência Agrônômica.** v. 39, n. 01, p. 101-106, 2008.

RODRIGUES, M. V. N. et al. O emprego de técnicas hifenadas no estudo de plantas medicinais. **Multiciência,** v.7, 2006

SALES, R. L. **Efeitos do amendoim e da linhaça no perfil lipídico, composição corporal e processo inflamatório em indivíduos com excesso de peso.** 2009. 152p. Tese (Doutorado em Ciência e tecnologia de alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG.

SANTOS J. P.; DORNELES, A. L. C.; PEREIRA, F. D. & OLIVEIRA, L. M. Indução de calos em sempre-viva (*Syngonanthus mucugensis* Giulietti), utilizando diferentes tipos de explantes e concentrações de BAP. **Acta Scientiaru, Biological Science.** v.30, n. 2, p. 127-131. 2008.

SANTOS, P. O.; OLIVEIRA, L. M.; BRANDÃO, H. N. & NEPOMUCENO, C.F. Avaliação qualitativa de podofilotoxina em plantas *in vitro*, calos e plantas *ex vitro* de *Hyptis leucocephala* Mart. Ex Benth. In Seminário de iniciação científica-UEFS, 17 a 21 de outubro de 2011. Feira de Santana-Ba.

SILVA, E. Células Tronco. **Biotecnologia, ciência e desenvolvimento**. Vol. 36, p. 4-6. 2006.

SILVA, J. G. S.; FARIA, M. T.; OLIVEIRA, E. R.; REZENDE, M. H.; RIBEIRO, D. G.; FERREIRA, H. D.; SANTOS, S.C.; SERAPHIN, J. C. & FERRI, P. H. Chemotaxonomic significance of volatile constituents in *Hypernia* (Mart. Ex Benth.) R. Harley (Lamiaceae). vol. 22, n. 5, p. 955-960, 2011.

SOARES, F. P. PAIVA, R.; ALVARENGA, A. A.; , NOGUEIRA, R. C.; EMRICH, E. B.; MARTINOTTO, C. Direct organogenesis in nodal explants of mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) Ciênc. agrotec., Lavras, v. 31, n. 4, p. 1048-1053, jul./ago., 2007

SORACE, M.; FARIA, R. T.; DAMASCENO-JÚNIOR, C. V.; GOMES, G. P.; BARBOSA, C. M.; VIEIRA, F. G. N.; SILVA, G. L.; TAKAHASHI, L. S. A.; SCHNITZER, J. A. Crescimento *in vitro* de *Oncidium baueri* (Orchidaceae) em diferentes concentrações de macronutrientes e sacarose. **Semina: Ciências agrárias**. V. 29, n. 4, p. 775-782, 2008.

SOUZA, I. L. L.; PEREIRA, J. C.; CORREIA, A. C. C.; VASCONCELOS, L. H. C.; SILVA, M. C. C.; COSTA, V. C. O.; SILVA, M. S.; SILVA, B. A. Participação dos canais de cálcio no mecanismo de ação espasmolítica de *Hyptis macrostachys* Benth. Em íleo isolado de cobaia. **Revista de Fitoterapia**. v.12, n. s1, p.132, 2012.

SUZUKI, S.; UMEZAWA, T. Biosynthesis of lignans and norlignans. **Journal of wood Science**. v.53, p. 274-284, 2007.

TAYLOR, J.L.S. & STADEN, J. V. The effect of nitrogen and sucrose concentrations on the growth of *Eucomis autumnalis* (Mill.) Chitt. plantlets *in vitro*, and on subsequent anti-inflammatory activity in extracts prepared from the plantlets Plant Growth Regulation. v. 34, p. 49–56, 2001.

TEXEIRA, M. T. & TEIXEIRA, S. L. Estabelecimento de segmentos apicais de mamoeiro *in vitro*. **Revista Ceres**. v. LI, n. 296, 2004.

TISSERAT, B. & VAUGHN, S. F. Growth, morphogenesis, and essential oil production in *Mentha spicata* L. plantlets *in vitro* In **Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant**. Vol.44, p.40–50, 2008.

TONHI, E.; COLLINS, K. E.; JARDIM, I. C. S. F. & COLLINS, C. H. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE–FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Química Nova**. v. 25, n. 4, p. 616-623, 2002.

UHLE, E. S. B. Estudo sobre a síntese enantiosseletiva de lignano-lactonas naturais. 2006. 229p. Tese (Doutorado em Química) – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras, Ribeirão Preto – SP.

VALLE, R. de C. S. C. **Estratégias de cultivo de células de pimenta longa (*Piper hispidinervium*) determinação de parâmetros cinéticos.** 2003. 184p. Tese (Doutorado em engenharia química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

VEIGA JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C. & MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: Cura segura? **Química nova.** v. 28, n. 3, p. 519-528. 2005.

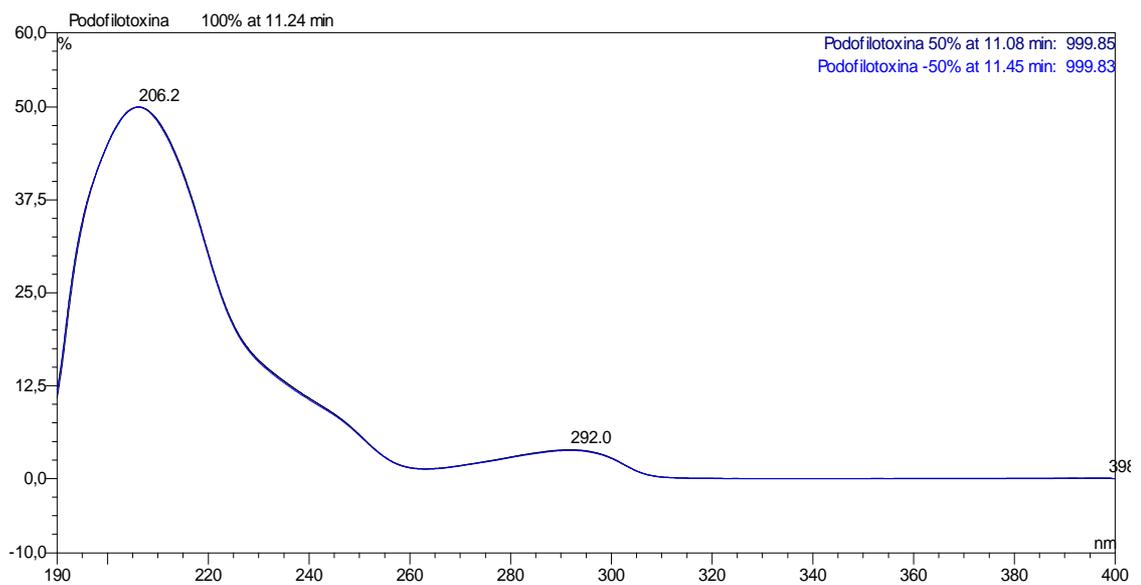
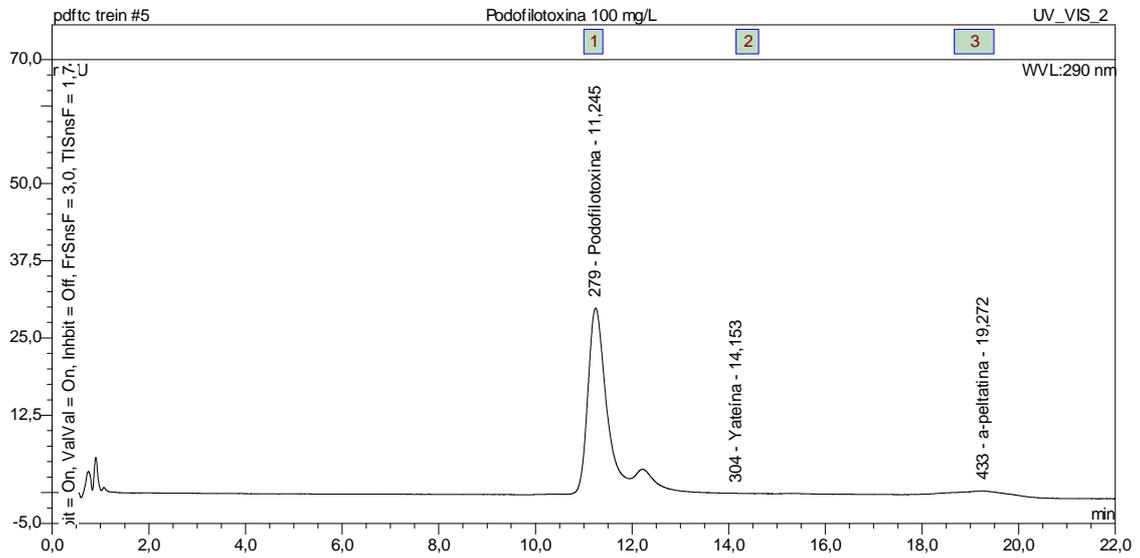
VERA, M. A. T., MIRANDA, R. P., & VILLARREAL, M. L. Identificación y cuantificación de lignanos análogos a la podofilotoxina en cultivos *in vitro* de *hyptis verticillata*. In: **XII Congreso Nacional de Biotecología y Bioingeniería.** 21 a 26 de Junho de 2009, Morélia Michoacán, México. Disponível em: <[http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/morelia07/TRABAJOS/Area\\_II/Carteles/CII-75.pdf](http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/morelia07/TRABAJOS/Area_II/Carteles/CII-75.pdf)> Acessado em: 15.08.2013.

VERPOORTE, R.; COLLIN, A.; MEMELINK, J. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. **Biochem.Rev.**, v.1, p.13-25, 2002.

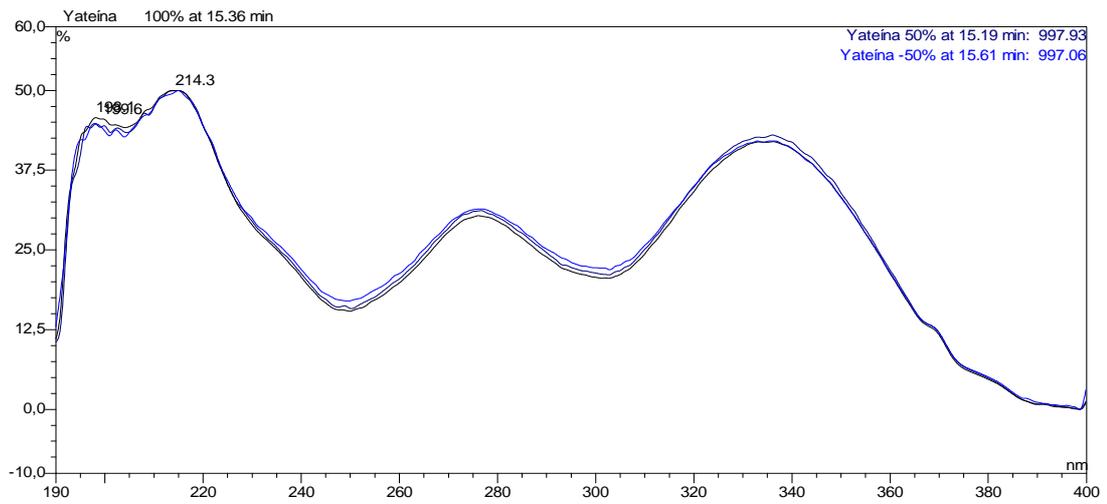
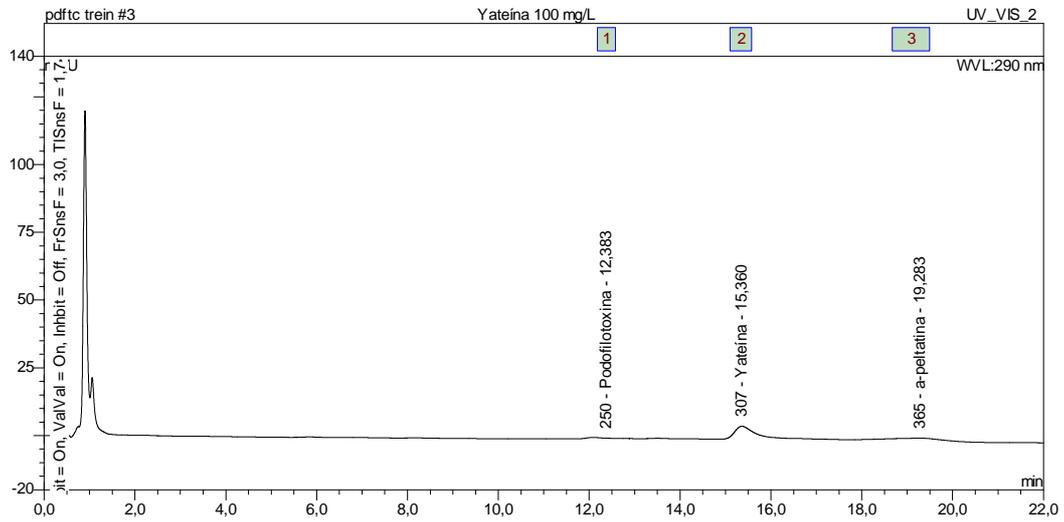
VIANNA, J. S. **Caracterização anatômica, morfológica e química de quimiotipos de *Ocimum gratissimum* Lineu.** 2009. 78p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de Brasília, Brasília.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. **Phytochemistry.** v. 64, p. 3-19, 2003.

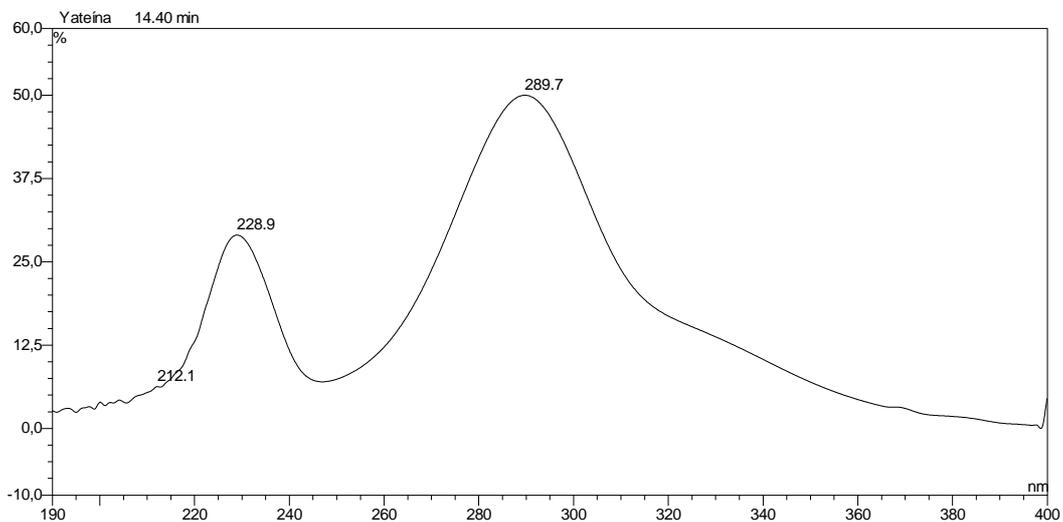
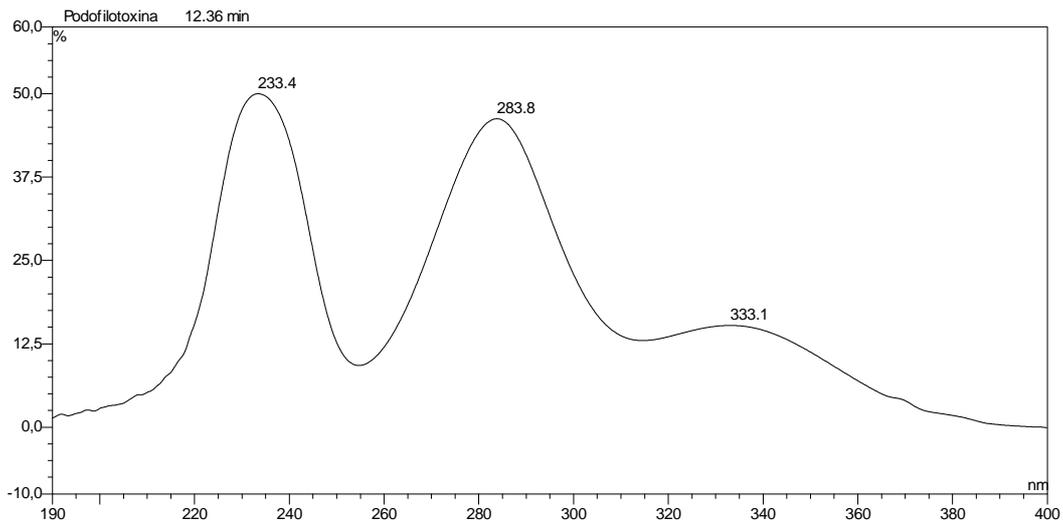
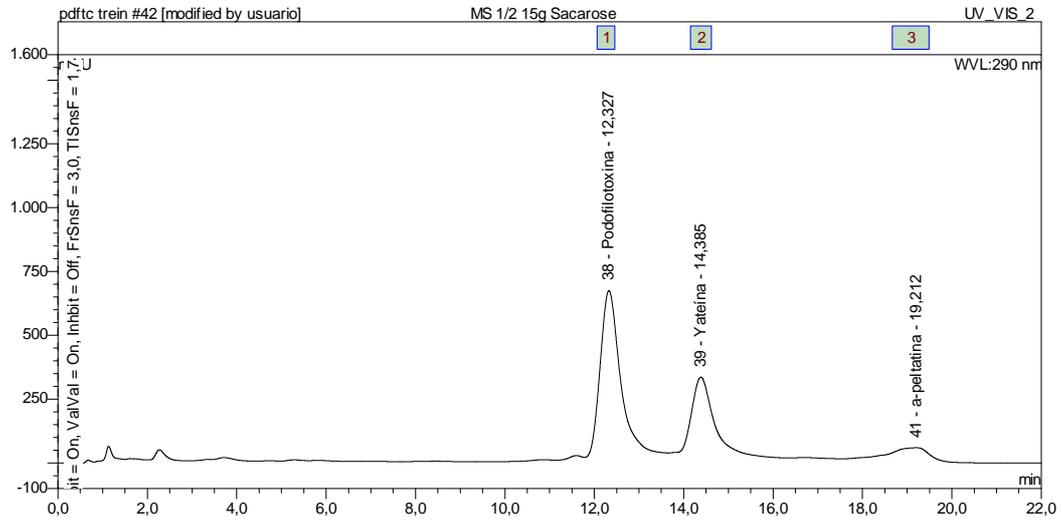
## APÊNDICE A – Cromatograma e espectro UV do padrão de podofilotoxina.



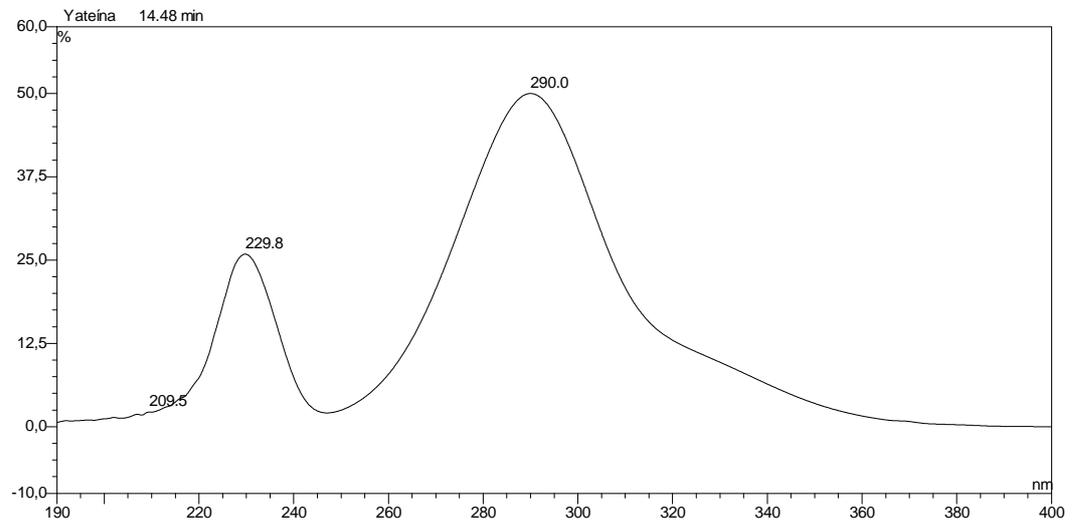
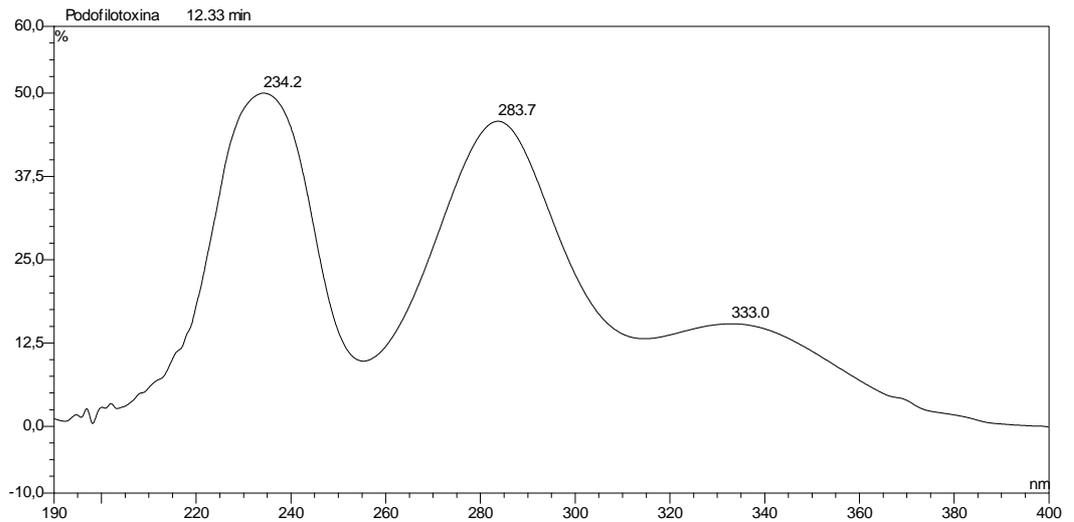
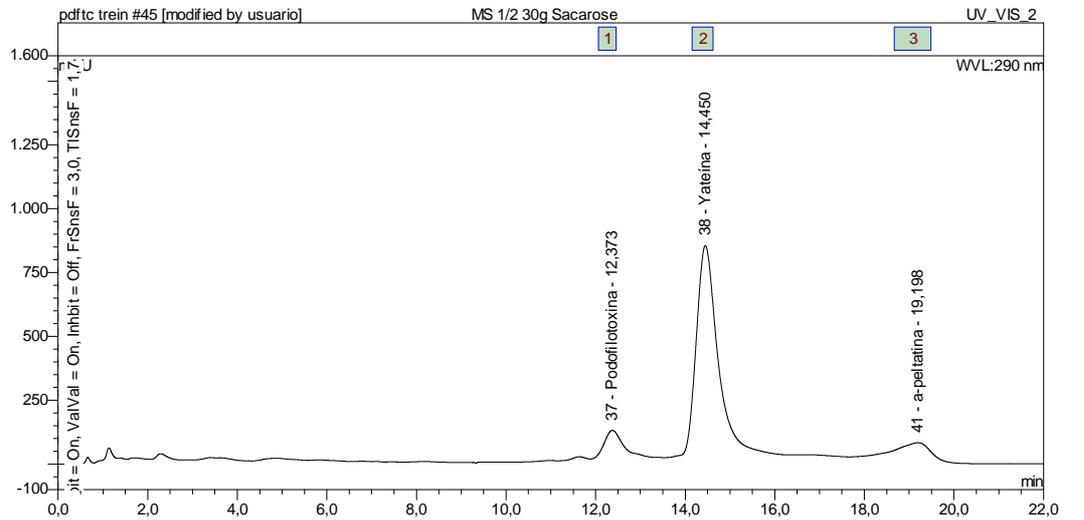
## APÊNDICE B – Cromatograma e espectro UV do padrão de yateína.



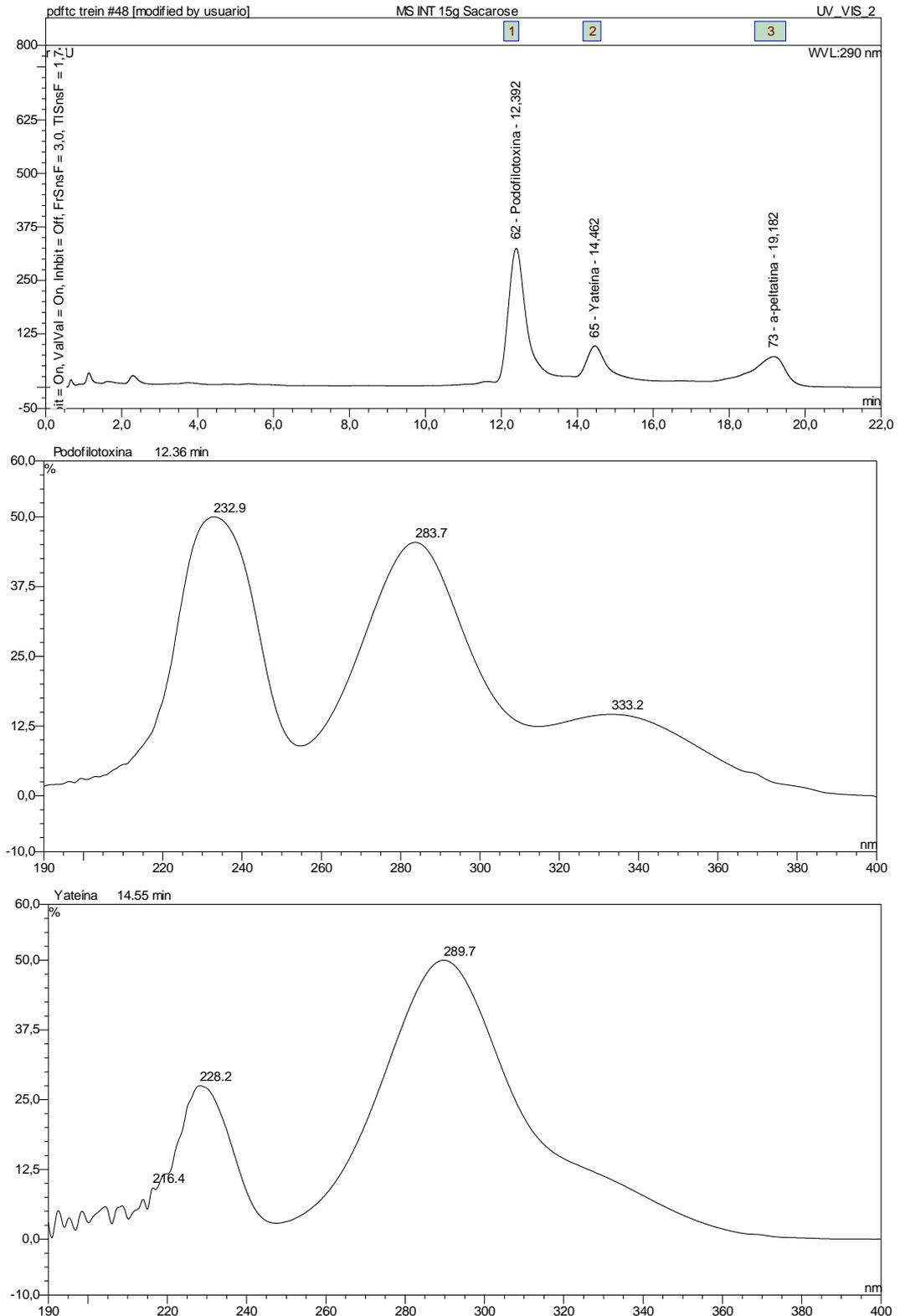
APÊNDICE C – Cromatograma e espectros UV de podofilotoxina e yateína, respectivamente, no extrato de plantas de *Leptohyptis macrostachys* cultivadas *in vitro* em meio MS ½ com 1,5% de sacarose.



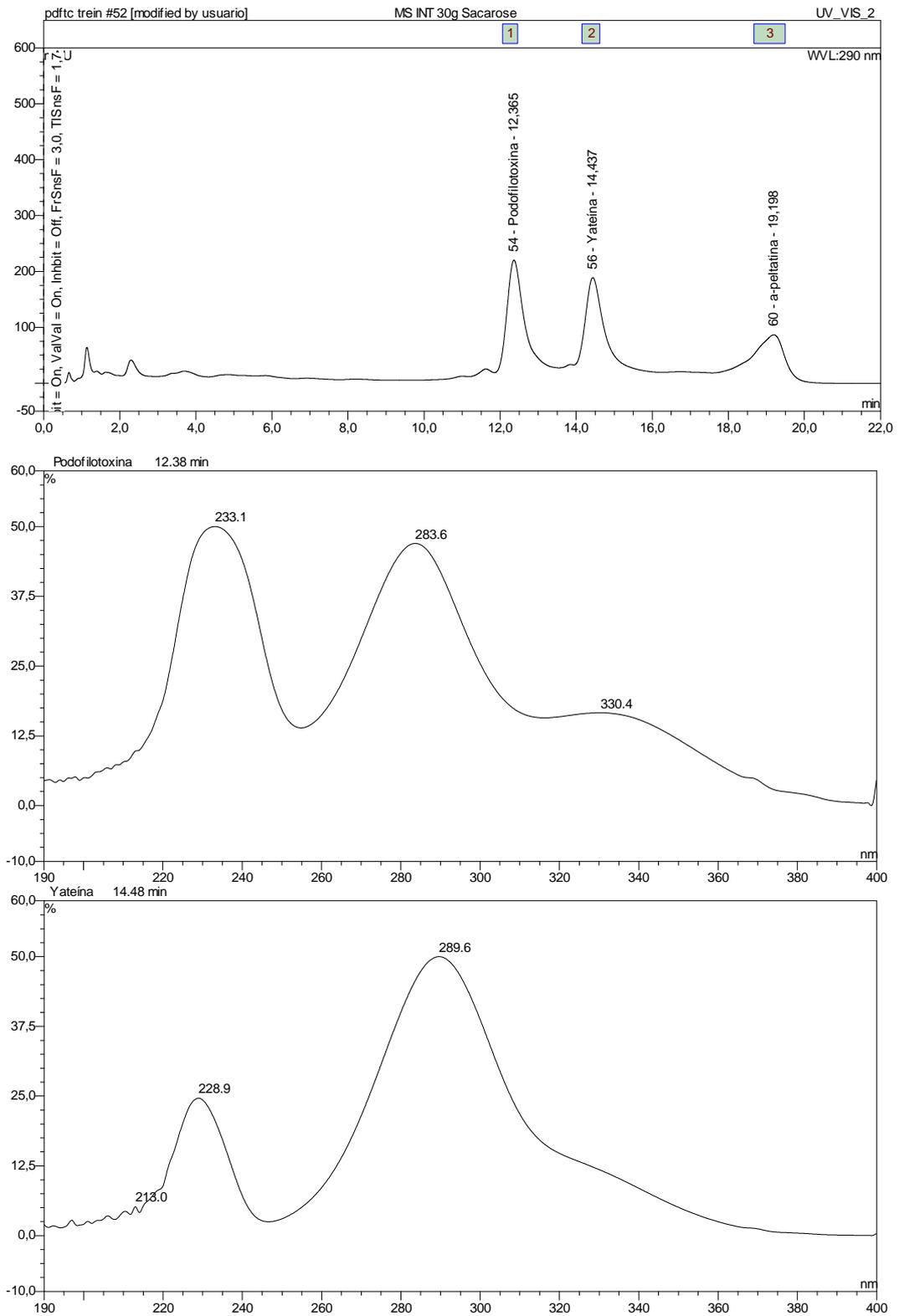
APÊNDICE D – Cromatograma e espectros UV de podofilotoxina e yateína, respectivamente, no extrato de plantas de *Leptohyptis macrostachys* cultivadas *in vitro* em meio MS ½ com 3,0% de sacarose.



APÊNDICE E – Cromatograma e espectros UV de podofilotoxina e yateína, respectivamente, no extrato de plantas de *Leptohyptis macrostachys* cultivadas *in vitro* em meio MS completo com 1,5% de sacarose.

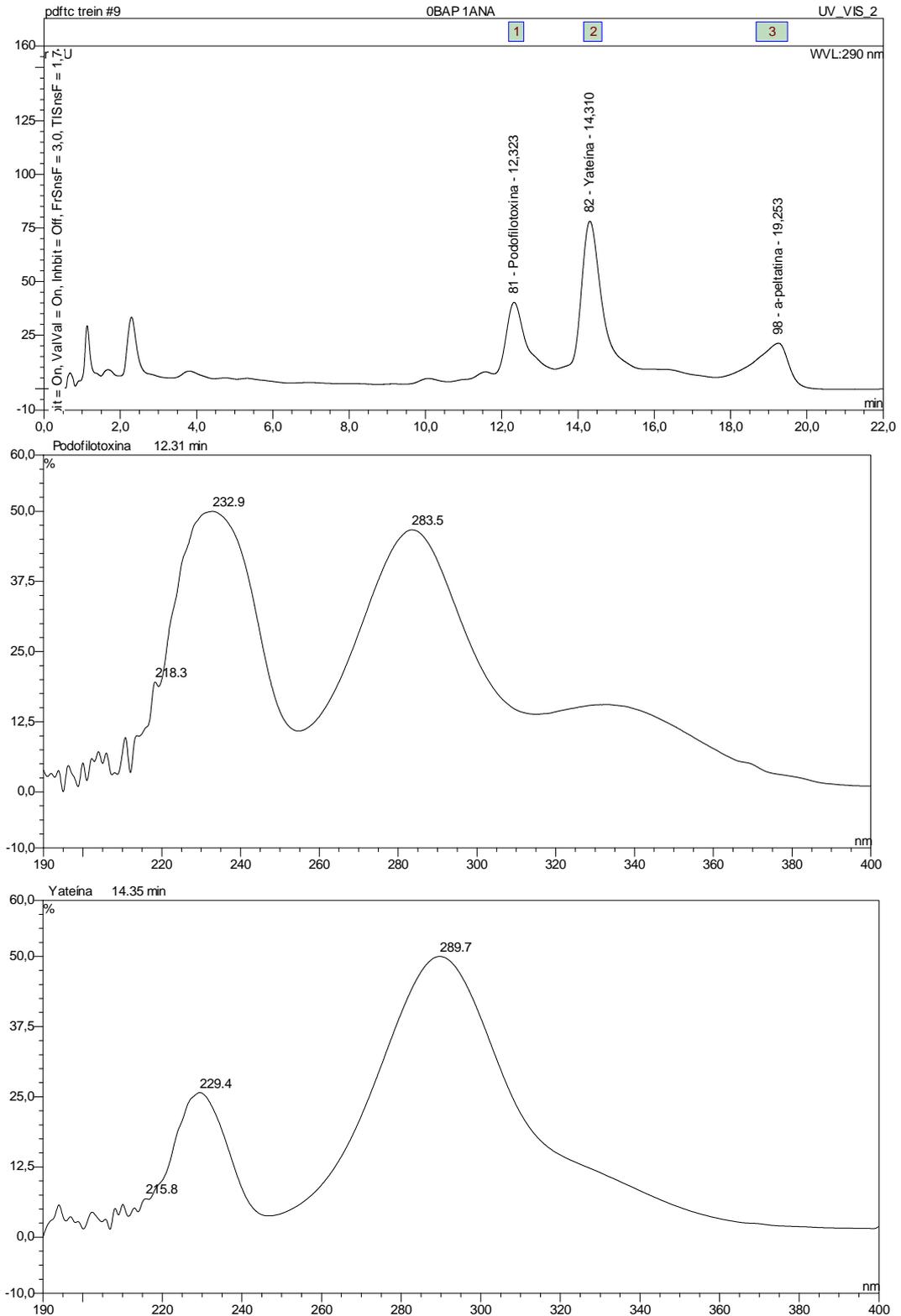


APÊNDICE F – Cromatograma e espectros UV de podofilotoxina e yateína, respectivamente, no extrato de plantas de *Leptochyptis macrostachys* cultivadas *in vitro* em meio MS completo com 3,0% de sacarose.

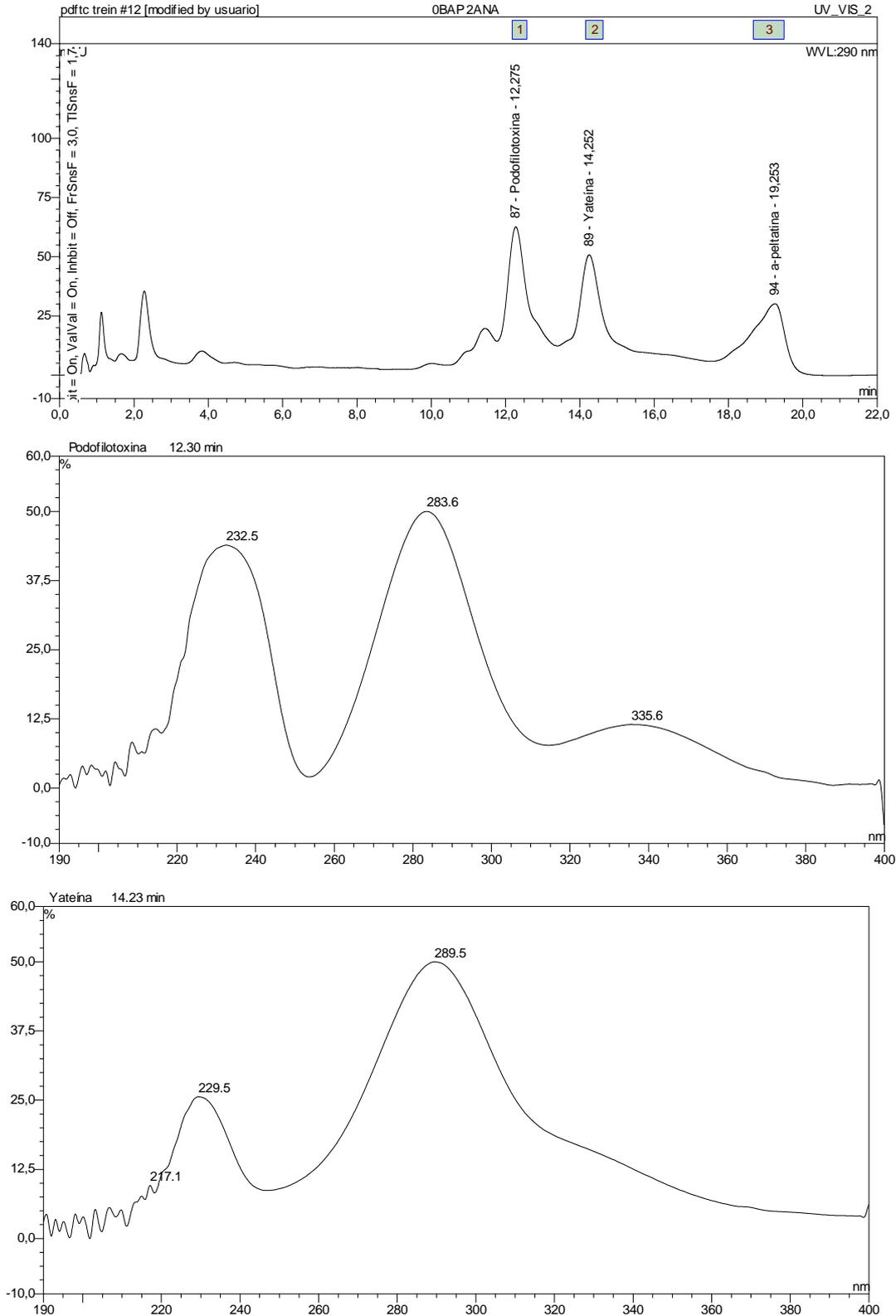




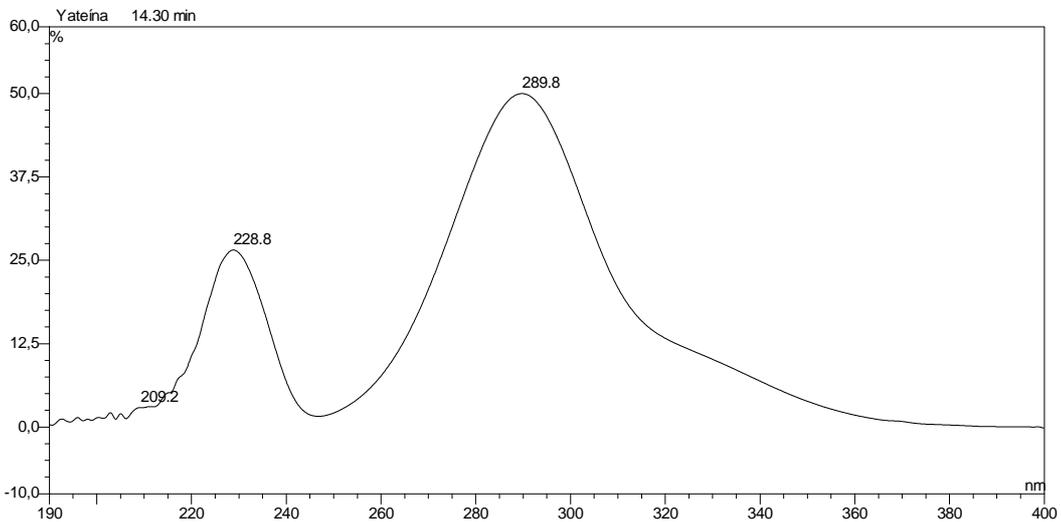
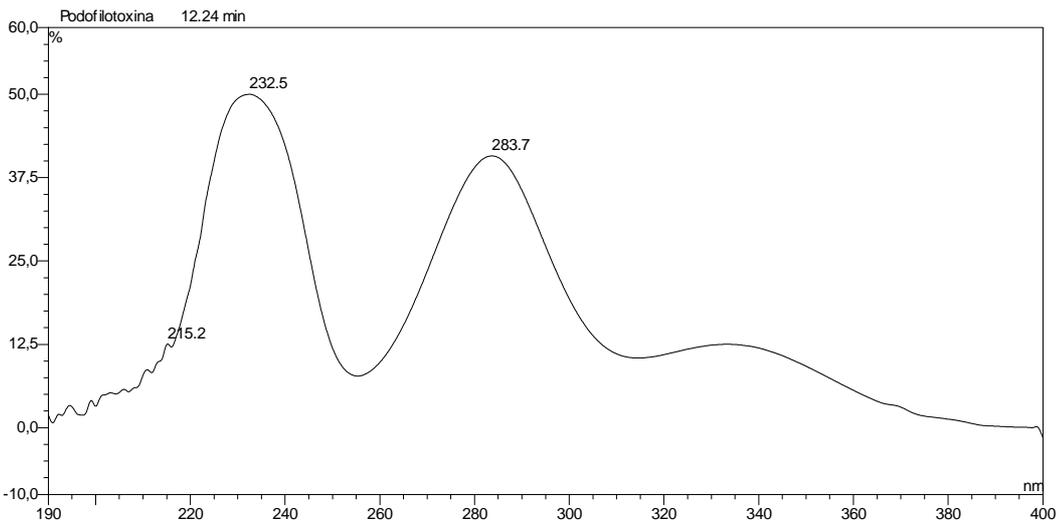
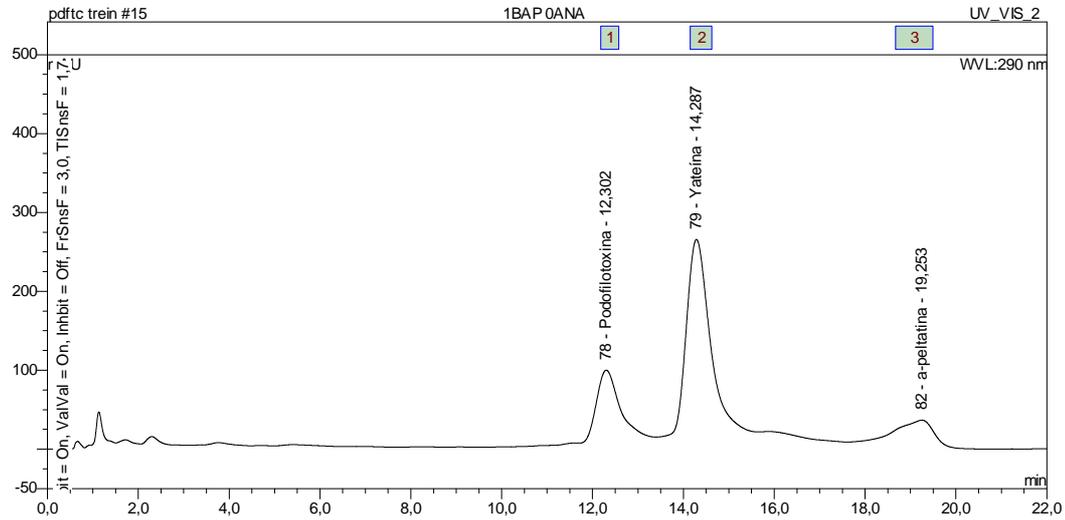
APÊNDICEH – Cromatograma e espectros UV de podofilotoxina e yateína, respectivamente, no extrato de plantas de *Leptohyptis macrostachys* cultivadas *in vitro* na presença de 5,37µM de ANA.



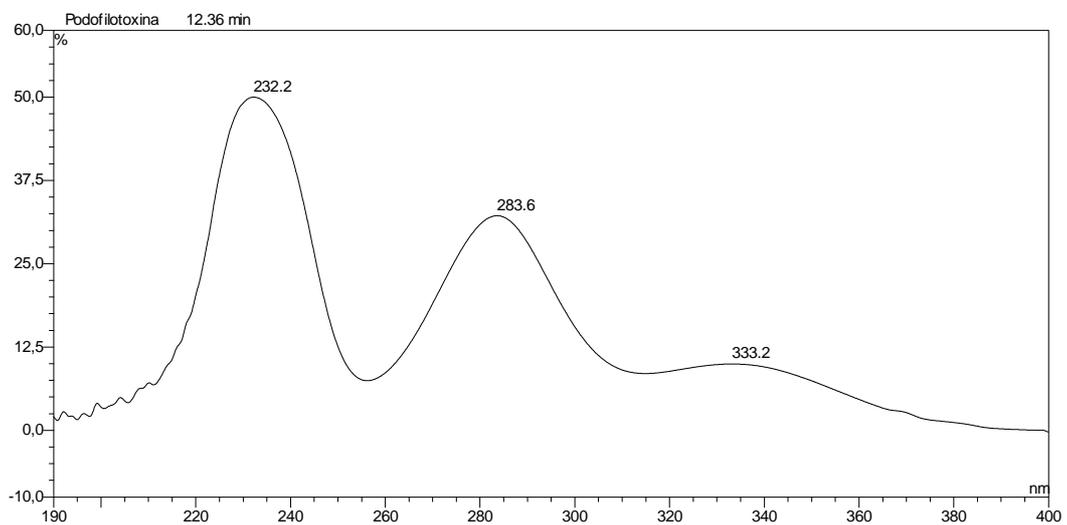
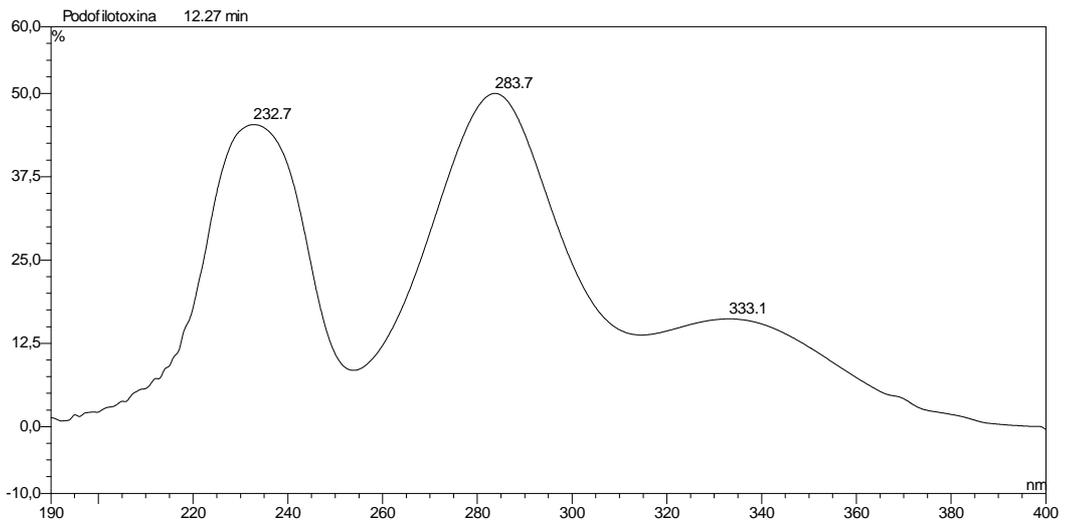
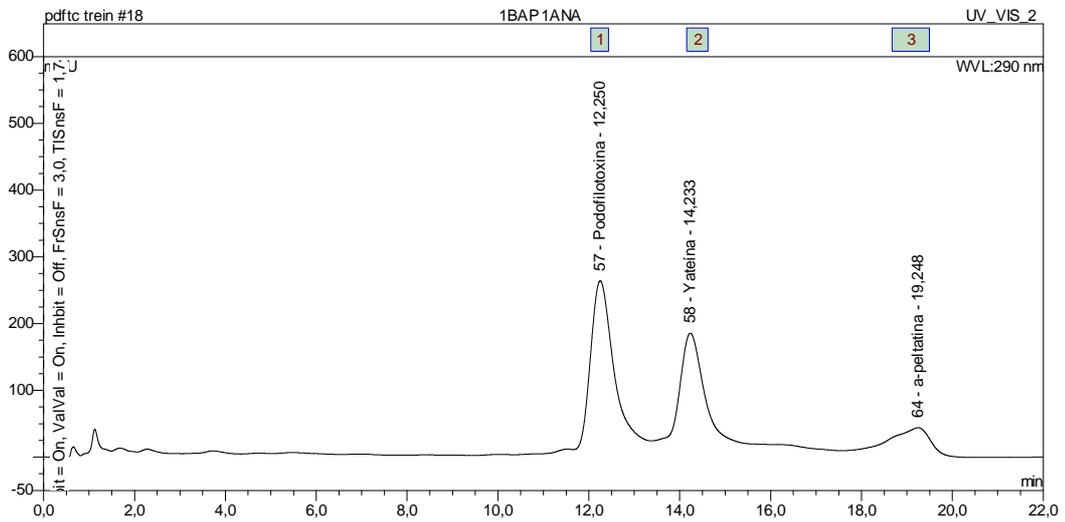
APÊNDICEI – Cromatograma e espectros UV de podofilotoxina e yateína, respectivamente, no extrato de plantas de *Leptohyptis macrostachys* cultivadas *in vitro* na presença de 10,74µM de ANA.



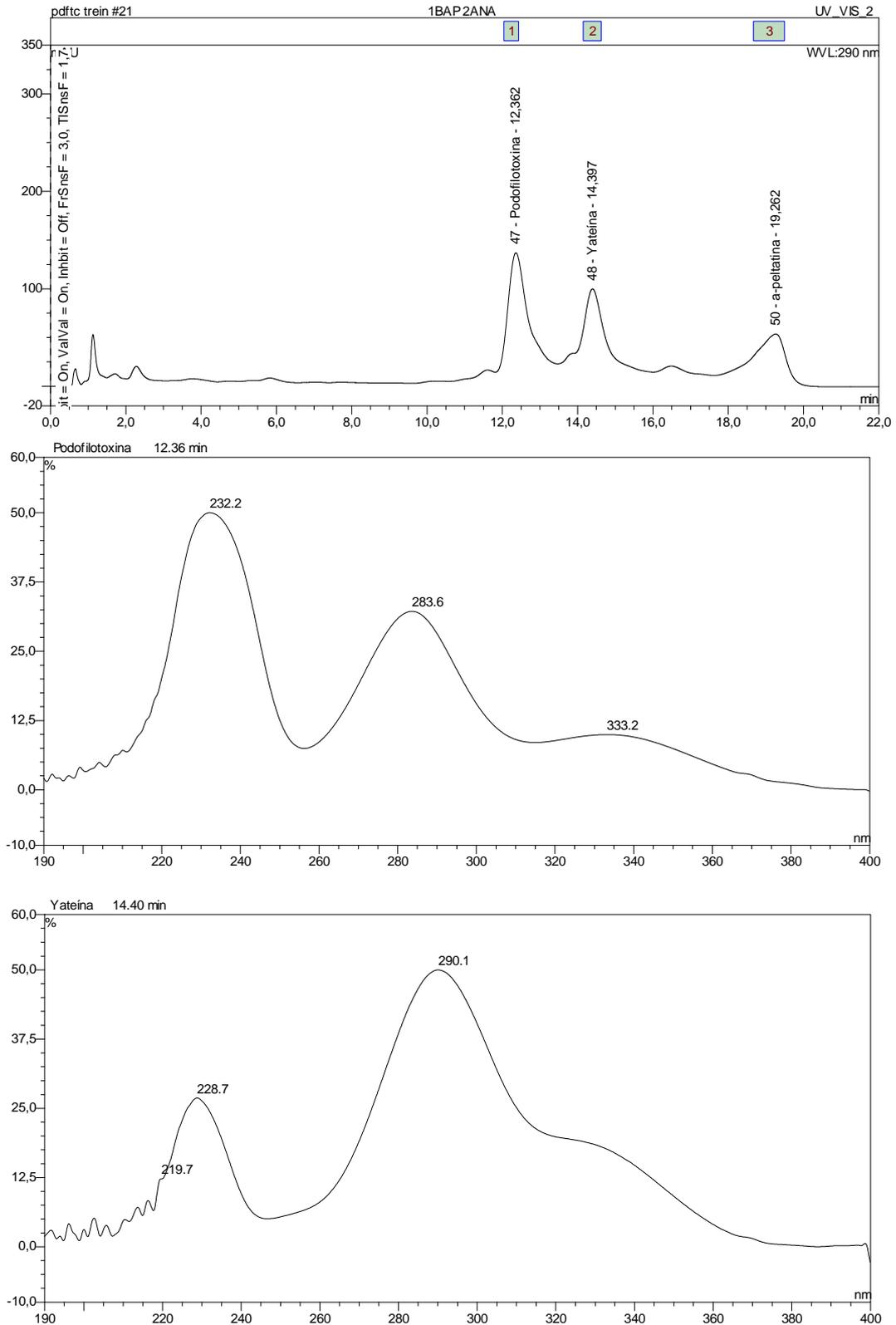
APÊNDICEJ – Cromatograma e espectros UV de podofilotoxina e yateína, respectivamente, no extrato de plantas de *Leptohyptis macrostachys* cultivadas *in vitro* na presença de 4,44µM de BAP.



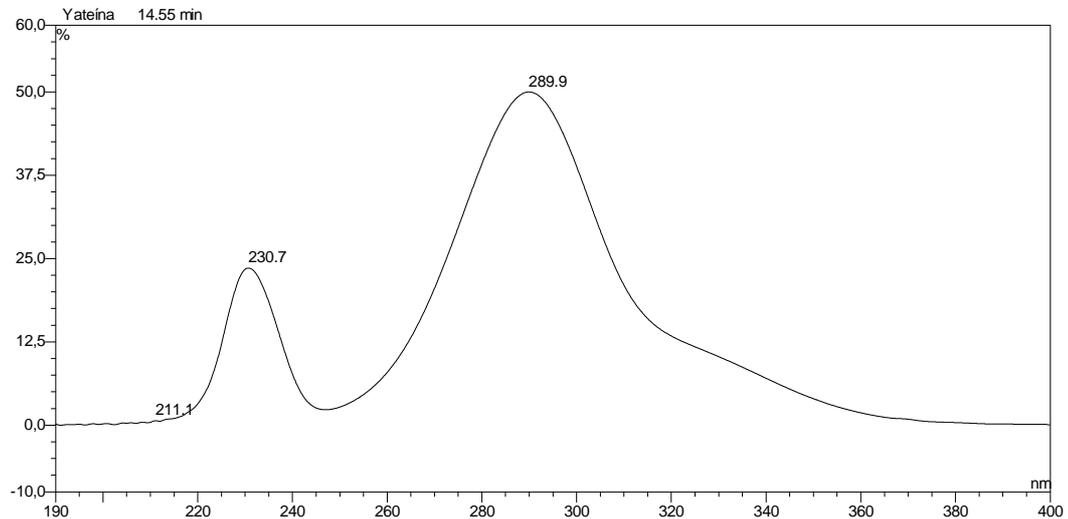
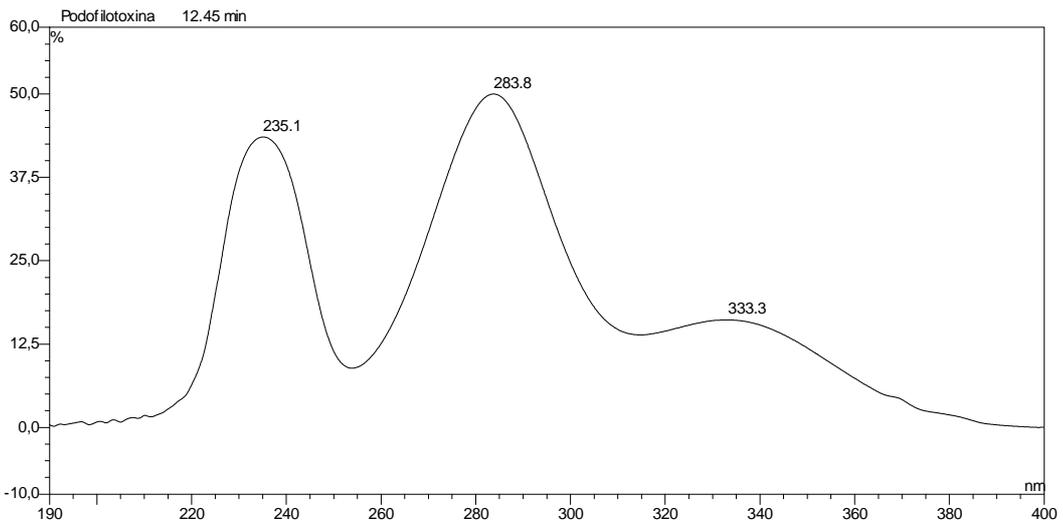
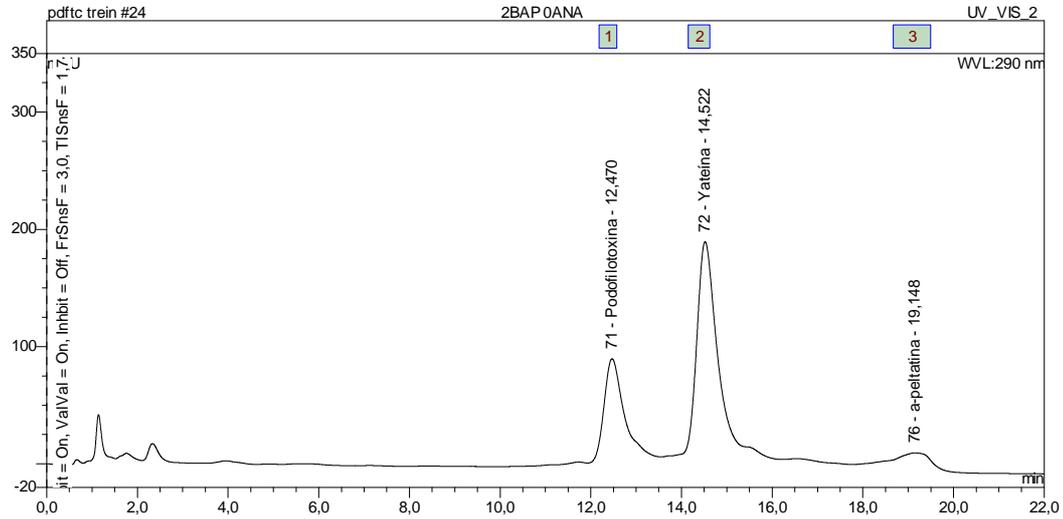
APÊNDICEK – Cromatograma e espectros UV de podofilotoxina e yateína, respectivamente, no extrato de plantas de *Leptohyptis macrostachys* cultivadas *in vitro* na presença de 4,44 $\mu$ M de BAP e 5,37 $\mu$ M de ANA.



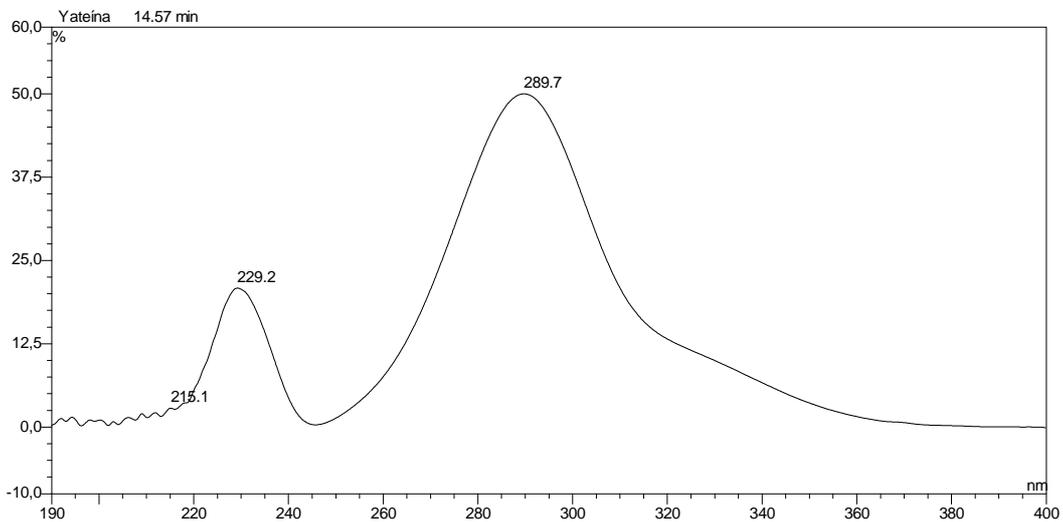
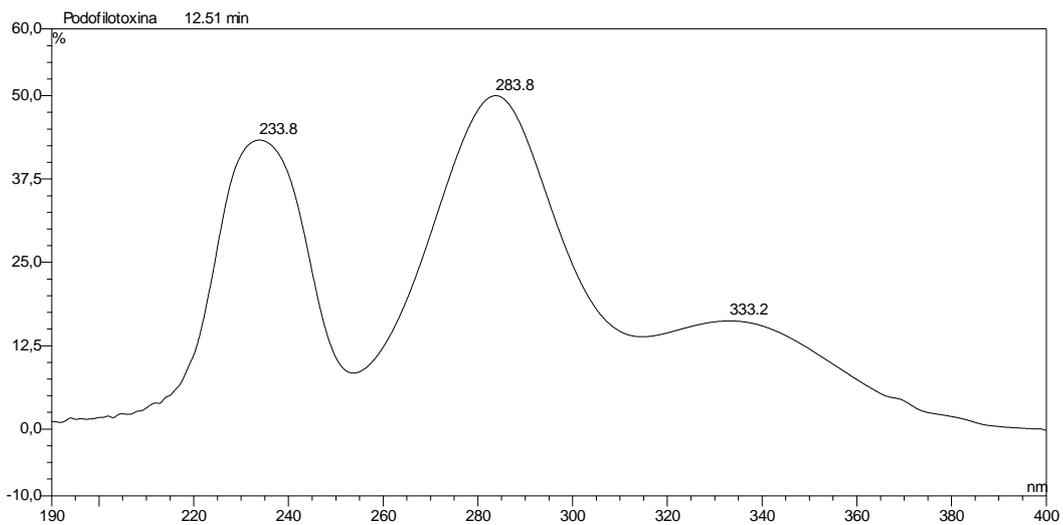
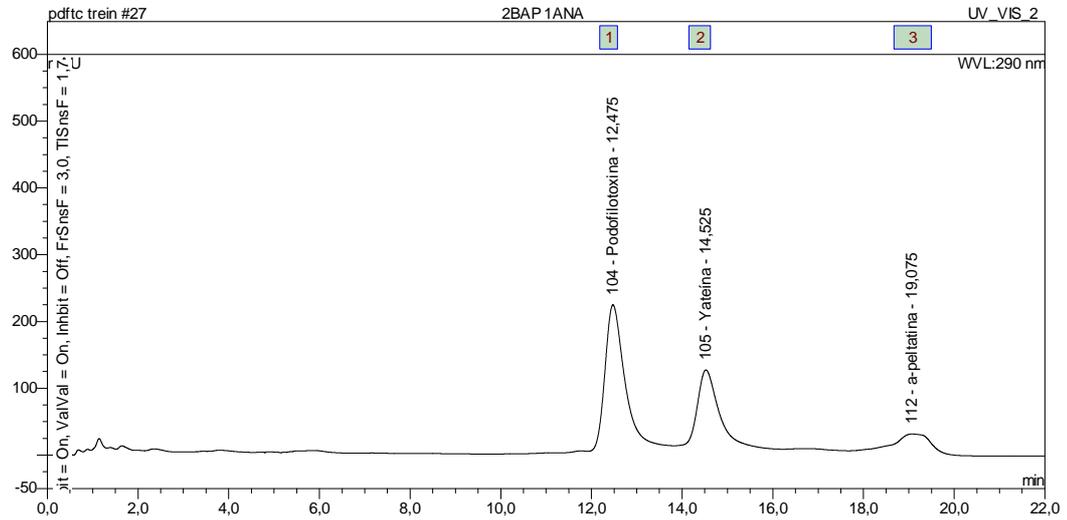
APÊNDICEL – Cromatograma e espectros UV de podofilotoxina e yateína, respectivamente, no extrato de plantas de *Leptohyptis macrostachys* cultivadas *in vitro* na presença de 4,44 $\mu$ M de BAP e 10,74 $\mu$ M de ANA.



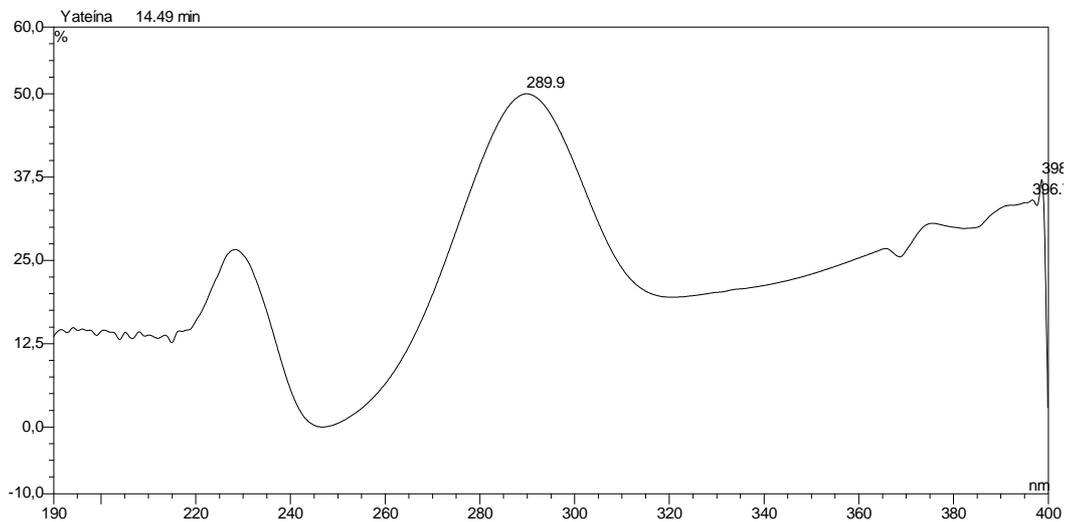
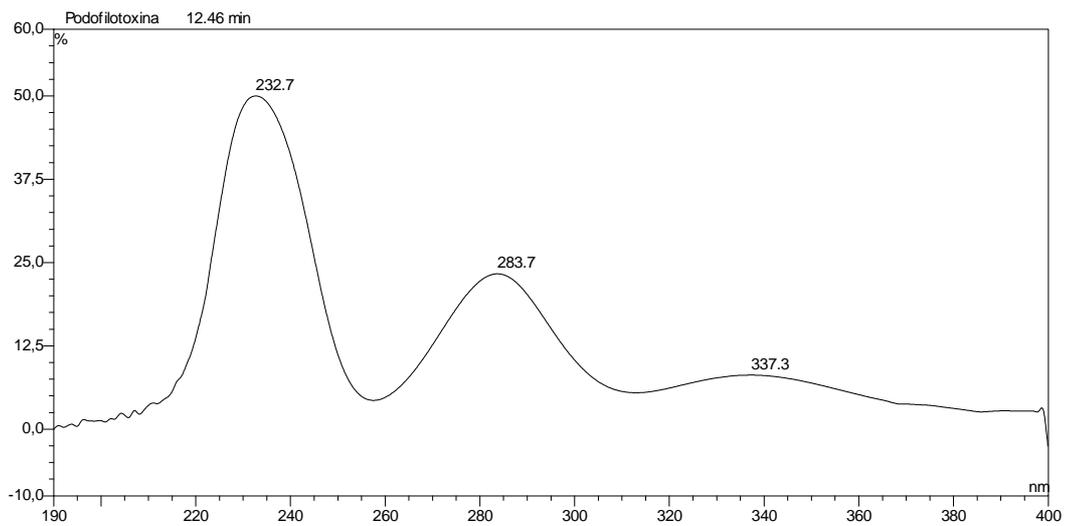
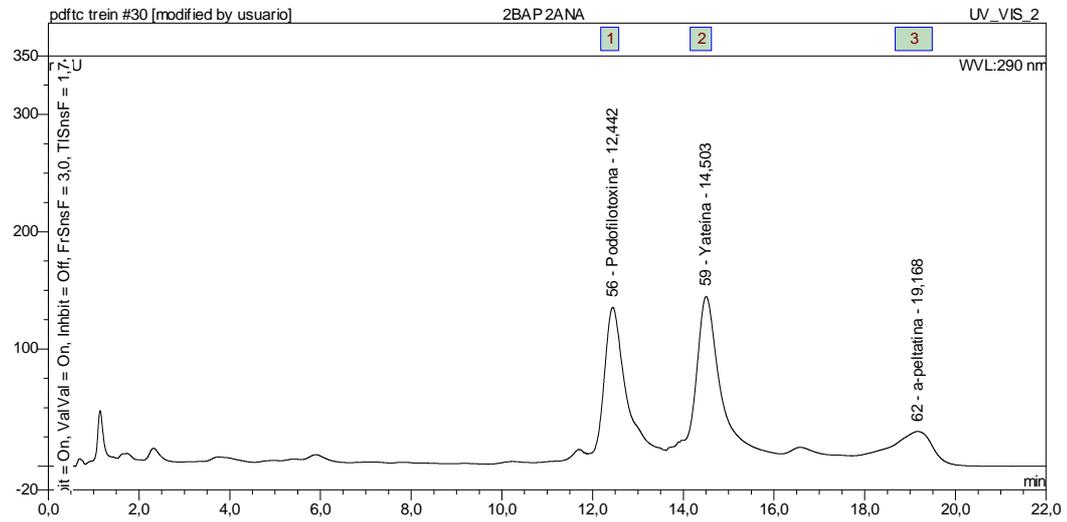
APÊNDICEM – Cromatograma e espectros UV de podofilotoxina e yateína, respectivamente, no extrato de plantas de *Leptohyptis macrostachys* cultivadas *in vitro* na presença de 8,88µM de BAP.



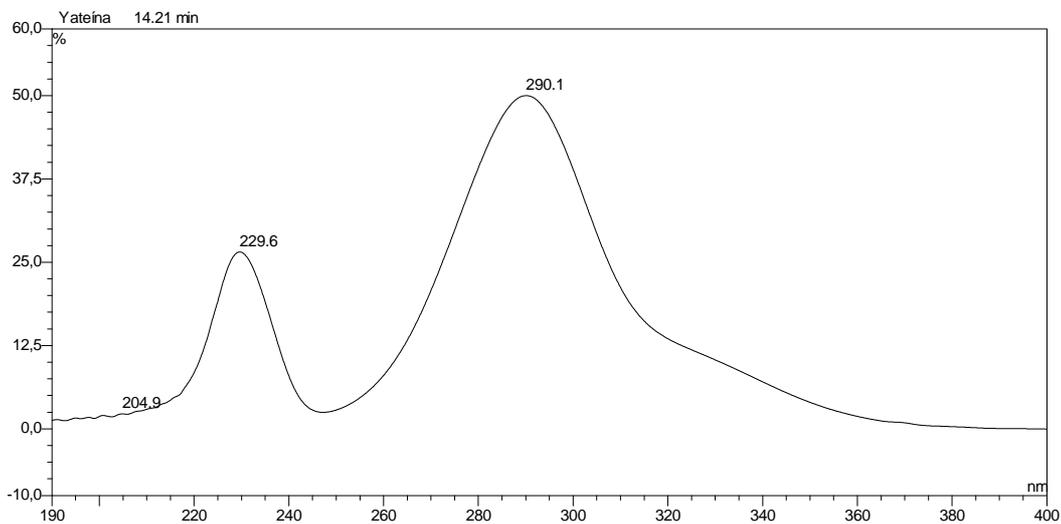
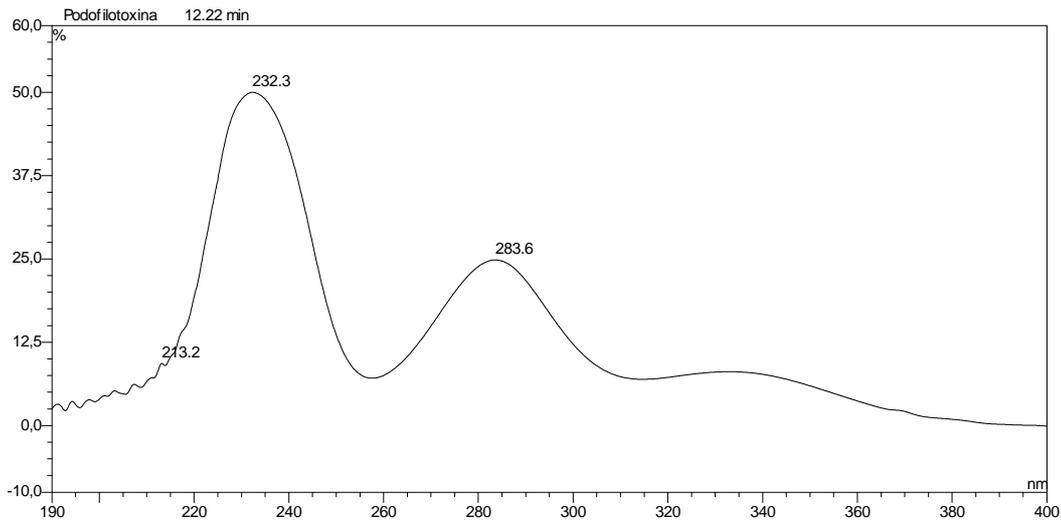
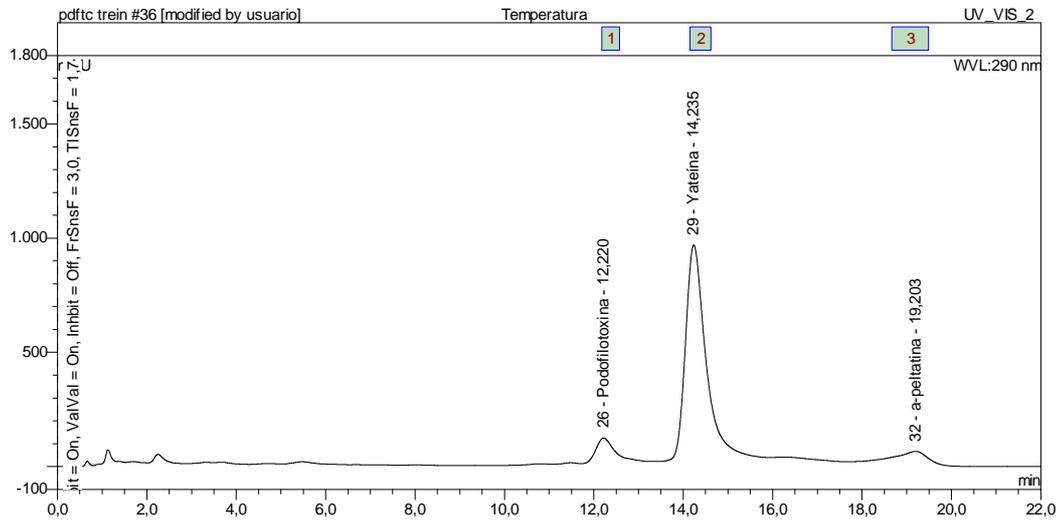
APÊNDICEN – Cromatograma e espectros UV de podofilotoxina e yateína, respectivamente, no extrato de plantas de *Leptohyptis macrostachys* cultivadas *in vitro* na presença de 8,88 $\mu$ M de BAP e 5,37 $\mu$ M de ANA.



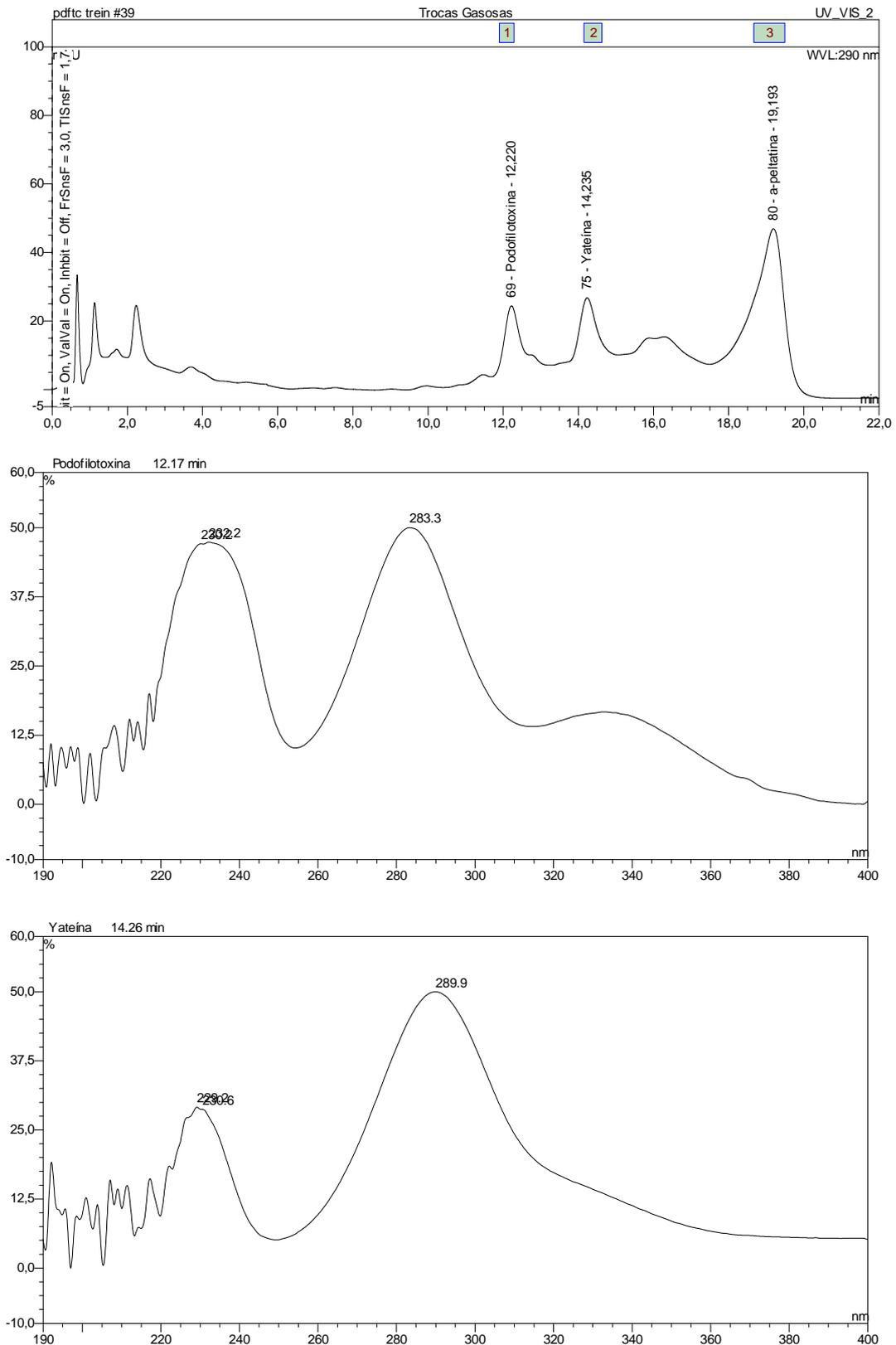
APÊNDICEO – Cromatograma e espectros UV de podofilotoxina e yateína, respectivamente, no extrato de plantas de *Leptohyptis macrostachys* cultivadas *in vitro* na presença de 8,88µM de BAP e 10,74µM de ANA.



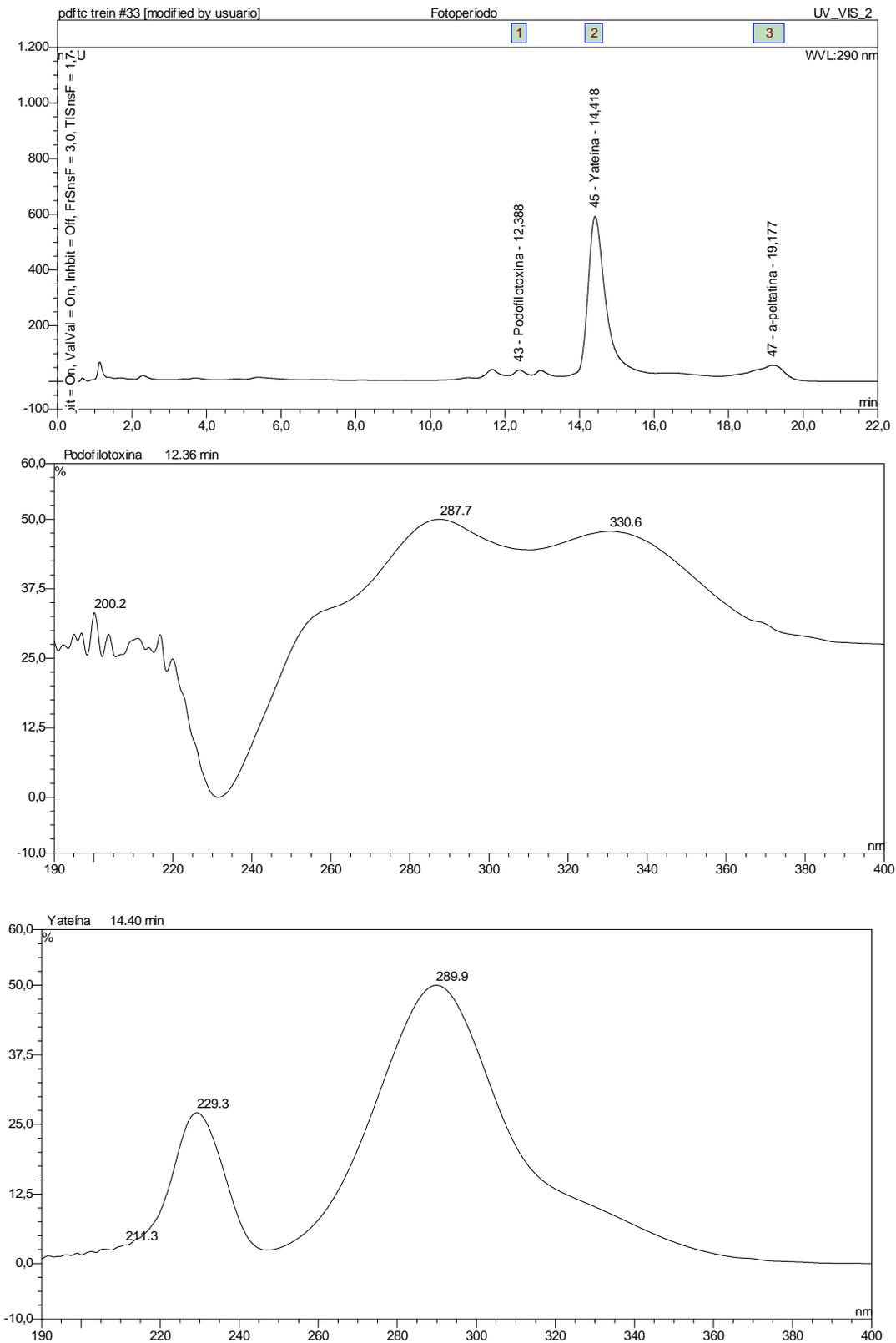
APÊNDICEP – Cromatograma e espectros UV de podofilotoxina e yateína, respectivamente, no extrato de plantas de *Leptohyptis macrostachys* cultivadas *in vitro* sob 30°C de temperatura.



APÊNDICEQ – Cromatograma e espectros UV de podofilotoxina e yateína, respectivamente, no extrato de plantas de *Leptohyptis macrostachys* cultivadas *in vitro* com tubos fechados com tampa plástica.



APÊNDICER – Cromatograma e espectros UV de podofilotoxina e yateína, respectivamente, no extrato de plantas de *Leptohyptis macrostachys* cultivadas *in vitro* sob fotoperíodo de 8h.



## ANEXO A – Constituintes do meio MS

<b>COMPONENTE</b>	<b>CONCENTRAÇÃO (mgL<sup>-1</sup>)</b>
<i>MACRONUTRIENTES</i>	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
KNO <sub>3</sub>	1900
CaCL <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	441
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
Na <sub>2</sub> EDTA	37,25
KI	0,83
<i>MICRONUTRIENTES</i>	
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,85
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	16,9
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,6
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025
<i>VITAMINAS</i>	
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	0,5
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> CINO <sub>2</sub>	0,5
C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub> OS	0,5
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	2
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	100